



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA



Produção biotecnológica de 2,3-butanodiol a partir de hidrolisados de casca de soja

Autor: Jonas Machado

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Mistruini Rossi

Co-Orientadores: Profa. Dra. Lilian Raquel Hickert

MSc. Paulo Roberto Dall Cortivo

Porto Alegre, janeiro de 2018

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Revisão Bibliográfica	3
2.1	O 2,3-butanodiol	3
2.2	Microrganismos produtores de 2,3-BD	5
2.3	Caminhos metabólicos de produção de 2,3-BD	7
2.4	Substratos alternativos	8
2.4.1	Biomassa não-celulósica	8
2.4.2	Biomassa lignocelulósica	9
2.5	Hidrólise da biomassa lignocelulósica.....	10
2.6	Condições de operação	11
2.6.1	Aeração.....	11
2.6.2	Potencial Hidrogeniônico	12
2.6.3	Temperatura	13
2.6.4	Concentração de substratos	14
3	Materiais e Métodos	16
3.1	Microrganismos, meios de cultivo e manutenções	16
3.2	Meio de cultivo	17
3.3	Ensaio de Fermentação	17
3.4	Metodologia analítica	18
3.4.1	Concentração dos produtos e consumo de açúcares.....	18
3.4.2	Crescimento celular.....	18
3.5	Cálculo de parâmetros cinéticos e Análises estatísticas	18
4	Resultados e Discussão.....	20
4.1	Caracterização dos hidrolisados	20
4.2	Fermentação em hidrolisado ácido	21
4.3	Fermentação em hidrolisado enzimático	24
4.4	Parâmetros cinéticos	26
5	Conclusões e Trabalhos Futuros.....	30
6	Referências	31

Agradecimentos

À minha família, em especial aos meus pais Carson e Gisele pela educação, amor, apoio, incentivo em todos os momentos da minha vida e por acreditarem no meu potencial. Ao meu irmão Lucas, que mesmo estando longe nos últimos 2 anos, sempre me apoiou, incentivou e aconselhou. Nada seria possível sem vocês.

À minha namorada, Carol, por todo o amor, companheirismo, estímulo e paciência em toda a nossa trajetória, compartilhando ótimos momentos e sempre me ajudando a superar os obstáculos.

Aos meus co-orientadores, doutorando Paulo Roberto Dall Cortivo e professora Lilian Raquel Hickert, pelos ensinamentos, pelo apoio, pela dedicação nos experimentos e por toda ajuda na construção desse trabalho.

À minha orientadora, professora Daniele Misturini Rossi, pela confiança, apoio, ensinamentos, dedicação e interesse dado ao meu trabalho, além da grande oportunidade dada à mim de conhecer ótimas pessoas, trabalhar em um ótimo laboratório e de realizar este trabalho.

Aos colegas do laboratório BiotecLab no Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA), pela parceria e auxílio quando precisei, em especial ao professor Marco Antônio Záchia Ayub, por disponibilizar seus laboratórios para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino de excelência, em especial ao Departamento de Engenharia Química e aos professores que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Aos meus amigos e aos colegas de curso, que tornaram essa jornada um tanto mais fácil, alegre e prazerosa, em especial aos que estiveram comigo em todos os momentos.

À todos os demais que, de alguma maneira, contribuíram para que este sonho pudesse se concretizar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro.

Resumo

A utilização de resíduos em processos biotecnológicos vem sendo muito estudada, frente a preocupação global quanto à sustentabilidade de processos, busca por inovação e reutilização de recursos energéticos. A biomassa lignocelulósica é um resíduo de grande abundância, que pode ser utilizado como substrato de baixo custo para produção de diversos compostos químicos, entre eles o 2,3-butanodiol (2,3-BD). O 2,3-BD é um composto de alto interesse comercial, uma vez que pode ser utilizado em diversos ramos da indústria química, tanto diretamente em processos químicos, quanto como intermediário químico para obtenção de outros compostos de interesse. Dessa forma, é de grande interesse a produção desse composto via processos de bioconversão, utilizando fontes de carbono alternativas. Neste trabalho, foi avaliada a capacidade de produção de 2,3-BD a partir da fermentação de hidrolisado resultante do tratamento ácido e enzimático da casca de soja por duas enterobactérias isoladas de um consórcio ambiental, *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 e *Pantoea agglomerans* BL1. Os experimentos foram realizados em agitador orbital, onde foi avaliada a capacidade de produção de 2,3-BD em duas diferentes temperaturas de fermentação, 30 °C e 37 °C, na condição de microaerofilia com os frascos vedados com bucha de algodão permeável ao oxigênio. Na fermentação do hidrolisado ácido, a maior produção de 2,3-BD (21,9 g.L⁻¹) foi obtida por *K. pneumoniae* na temperatura de 30°C, com rendimento (Y_{PS}) de 0,40 g.g⁻¹ e produtividade (Q_P) de 0,30 g.(L.h)⁻¹. Porém, não houve diferença estatística ($p < 0,05$) do cultivo a 37 °C desses mesmos parâmetros com o cultivo realizado pela *P. agglomerans*. Já na fermentação do hidrolisado enzimático, parâmetros cinéticos semelhantes foram obtidos por ambas as bactérias quando cultivadas na mesma temperatura. A fermentação a 30 °C resultou em Y_{PS} de 0,5 g.g⁻¹ e Q_P de 0,28 g.(L.h)⁻¹ para *K.pneumoniae* e Y_{PS} de 0,51 g.g⁻¹ e Q_P de 0,28 g.(L.h)⁻¹ para *P. agglomerans*. Porém houve diferença estatística ($p < 0,05$) a 37 °C, ocorrendo uma redução de rendimento e de produtividade, com Y_{PS} de 0,41 g.g⁻¹ e Q_P de 0,14 g.(L.h)⁻¹ para *K. pneumoniae*, e Y_{PS} 0,33 g.g⁻¹ e Q_P de 0,09 g.(L.h)⁻¹ para *P. agglomerans*. Esses resultados apontam uma resposta muito promissora quanto aos microrganismos utilizados e à utilização de hidrolisados de casca de soja como substrato para a fermentação. Além disso, a capacidade dessas enterobactérias de fermentarem as pentoses presentes nos hidrolisados é um resultado muito satisfatório, uma vez que esses açúcares estão presentes em grande abundância nas biomassas lignocelulósicas.

Lista de Figuras

Figura 1. Estereoisômeros do 2,3-butanodiol.....	3
Figura 2. Exemplos de aplicação do 2,3-BD	4
Figura 3. Rota para produção de 2,3-BD a partir de glicose e xilose.....	8
Figura 4. Influência da disponibilidade de oxigênio na síntese de produtos por <i>B. polymyxa</i>	12
Figura 5. Ensaio fermentativo de produção de 2,3-BD em hidrolisado ácido da casca de soja a temperatura de 30 °C com <i>K. pneumoniae</i>	22
Figura 6. Ensaio fermentativo de produção de 2,3-BD em hidrolisado ácido da casca de soja a temperatura de 37 °C com <i>K. pneumoniae</i>	22
Figura 7. Ensaio fermentativo de produção de 2,3-BD em hidrolisado ácido da casca de soja a temperatura de 30 °C com <i>P. aglomerans</i>	22
Figura 8. Ensaio fermentativo de produção de 2,3-BD em hidrolisado ácido da casca de soja a temperatura de 37 °C com <i>P. aglomerans</i>	23
Figura 9. Ensaio fermentativo de produção de 2,3-BD em hidrolisado enzimático da casca de soja a temperatura de 30 °C com <i>K. pneumoniae</i>	24
Figura 10. Ensaio fermentativo de produção de 2,3-BD em hidrolisado enzimático da casca de soja a temperatura de 37 °C com <i>K. pneumoniae</i>	25
Figura 11. Ensaio fermentativo de produção de 2,3-BD em hidrolisado enzimático da casca de soja a temperatura de 30 °C com <i>P. aglomerans</i>	25
Figura 12. Ensaio fermentativo de produção de 2,3-BD em hidrolisado enzimático da casca de soja a temperatura de 37 °C com <i>P. aglomerans</i>	25

Lista de Tabelas

Tabela 1. Produção 2,3-BD a partir de diferentes gêneros e espécies de bactérias.....	6
Tabela 2. Meio LB com glicose para crescimento de culturas.	16
Tabela 3. Composição do meio de manutenção de linhagens.....	16
Tabela 4. Composição do hidrolisado ácido.....	20
Tabela 5. Composição do hidrolisado enzimático.....	21
Tabela 6. Parâmetros cinéticos da fermentação em hidrolisado ácido.....	27
Tabela 7. Parâmetros cinéticos da fermentação em hidrolisado enzimático.....	27

Lista de Símbolos

D-(-)	Isômero Dextrógiro
L-(+)	Isômero Levógiro
J.g-1	Joule por grama
H ₂	Gás Hidrogênio
O ₂	Gás Oxigênio
CO ₂	Dióxido de Carbono
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
YPS	Rendimento
QP	Produtividade
g	Gramas
mg	Miligramas
L	Litro
mL	Mililitro
h	Hora
s	Segundo
vvm	Volume de ar por volume de meio de cultivo

Lista de Abreviaturas e Siglas

2,3-BD	2,3-butanodiol
PE	Ponto de Ebulição
MEK	Metil-Etil-Cetona
pH	Potencial Hidrogeniônico
DO	Densidade Ótica
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
sp.	Espécies (Referência a várias espécies de um gênero)
1,3-PD	1,3-propanodiol
ATP	Trifosfato de Adenosina
ADP	Difosfato de Adenosina
NAD	Nicotinamida-Adenina Dinucleótido
FAD	Flavina-Adenina Dinucleótido
HMF	Hidroximetilfurfural
M	Molar
UFC	Unidade Formadora de Colônias

1 Introdução

Com a futura escassez de recursos energéticos de origem fóssil e a constante busca por inovação, sustentabilidade e melhor aproveitamento dos recursos energéticos disponíveis, a produção de compostos químicos de interesse comercial a partir de fontes renováveis recebe interesse significativo. A alta disponibilidade de biomassa lignocelulósica proveniente de produções agrícolas e agroindustriais e a possibilidade de aproveitamento deste substrato em bioprocessos indicam promissora viabilidade econômica, visto que são matérias-primas de baixo custo e de disponibilidade abundante.

Nesse contexto, a produção biotecnológica de 2,3-butanodiol (2,3-BD) a partir de biomassa lignocelulósica vem sendo estudada, devido à alta empregabilidade comercial do composto, que pode ser utilizado desde intermediário para produção da borracha sintética até como aditivo na indústria alimentícia, trazendo alta importância ao estudo de sua produção biotecnológica.

A soja (*Glycine max*) é a oleaginosa mais cultivada mundialmente, sua importância econômica vai desde a alimentação animal e humana até diversas aplicações na indústria química. O Brasil é o segundo maior produtor e exportador de soja no mundo, sendo superado apenas pelos EUA. No ano de 2016, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), foram colhidas 9543 milhões de toneladas de soja no Brasil. A casca de soja é a primeira camada que recobre o grão e é retirada durante a extração do óleo. O aproveitamento principal da casca de soja é na alimentação animal como alimento volumoso, mas frente à grande produção mundial, acaba sendo um subproduto abundante. Muitos trabalhos já mostraram que a casca de soja é um ótimo substrato para bioprocessos devido à baixa concentração de lignina, composto que quando degradado gera substâncias tóxicas à maioria dos microrganismos.

Para o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos desse tipo em processos biotecnológicos, estes devem ser tratados por processos físicos, químicos ou enzimáticos em uma etapa chamada de pré-tratamento. Essa etapa é responsável por realizar a dissociação da fração hemicelulósica do material, liberando açúcares fermentescíveis para posteriormente serem utilizados como substrato por microrganismos. A utilização de um determinado pré-tratamento varia de acordo com a natureza da biomassa lignocelulósica a ser hidrolisada e com a finalidade de aproveitamento do caldo resultante. Após essa etapa, é necessária a realização de um tratamento enzimático (sacarificação), para que seja dissociada a fração celulósica do material, liberando os açúcares presentes no polímero de celulose.

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria anaeróbia facultativa, amplamente utilizada em estudos que envolvem bioconversão a 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol e etanol. É uma

bactéria metabolicamente versátil, ou seja, é capaz de metabolizar diferentes tipos de substratos em diferentes condições de operação. *Pantoea aglomerans* é pouco discutida na literatura quando se trata de biconversão em 2,3-BD. No entanto, alguns trabalhos recentes indicam que esta se mostrou altamente capaz de produzir o composto em meio sintético.

Levando-se em consideração o que foi explanado, o presente trabalho tem como objetivo estudar a fermentação em hidrolisados ácido e enzimático de casca de soja visando a produção de 2,3-BD, testando duas bactérias entéricas como biocatalisadores, *Klebsiella pneumoniae* (linhagem BLh-1) e *Pantoea aglomerans* (linhagem BL1), além das condições de operação do processo.

Os objetivos específicos são:

- ✓ Realizar a fermentação das enterobactérias *K. pneumoniae* e *Pantoea aglomerans* em dois tipos de hidrolisados de casca de soja.
- ✓ Investigar a capacidade de produção de 2,3-BD por esses dois microrganismos
- ✓ Avaliar a influência da temperatura na produção de 2,3-BD.
- ✓ Quantificar a produção de 2,3-BD, o consumo dos açúcares presentes nos hidrolisados e a quantidade de células viáveis no caldo fermentativo, registrando a variação do pH durante os ensaios de fermentação.
- ✓ Calcular o rendimento e produtividade dos processos, com o objetivo de inferir quanto a influência dos parâmetros estudados nos resultados.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 O 2,3-butanodiol

O 2,3-BD é um composto orgânico biodegradável, usualmente conhecido também com 2,3-butilenoglicol e de nome IUPAC butano-2,3-diol. Sua fórmula molecular é $C_4H_{10}O_2$ e seu peso molecular é $90,121 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. O 2,3-BD possui 3 estereoisômeros, todos líquidos viscosos incolores, sendo eles: D-(-), L-(+) e meso, todos representados pela Figura 1. Apesar de muito parecidos, os três isômeros possuem pontos de ebulição ligeiramente diferentes, variando entre $177 \text{ }^\circ\text{C}$ e $182 \text{ }^\circ\text{C}$. Como os seus PE são mais altos do que da água, é necessária uma grande quantidade de água para a recuperação do 2,3-BD do caldo fermentativo (VOLOCH et al., 1985), fazendo com que essa etapa corresponda a 50 % do custo do processo (SUN et al., 2009a). Diante disso, novas técnicas de recuperação do composto vêm sendo estudadas nos últimos anos (XIU e ZENG, 2008; ANVARI e KHAYATI, 2009; SUN et al., 2009a; LI et al., 2016).

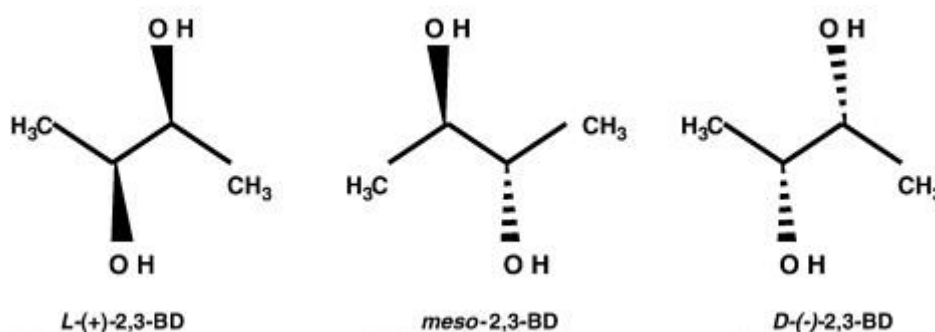


Figura 1. Estereoisômeros do 2,3-butanodiol (CELÍŃSKA e GRAJEK, 2009).

O 2,3-BD foi produzido pela primeira vez a partir de microrganismos por Harden e Walpole no ano de 1906, e desde então a sua produção biotecnológica vem sendo estudada como o uso de diversos microrganismos e a partir de diferentes fontes de carbono e nutrientes. Uma atenção especial foi dada para a produção de 2,3-BD no período da 2ª Guerra Mundial, quando começou a se suspeitar da possível escassez futura de 1,3-Butadieno, composto utilizado na produção da borracha sintética e que pode ser obtido através do 2,3-BD, uma das diversas aplicações possíveis do diol. Devido ao baixo ponto de congelamento ($-60 \text{ }^\circ\text{C}$) do isômero levogiro, o mesmo também pode ser utilizado como agente anti-congelante.

A possível utilização do 2,3-BD como uma substância polimérica também aumenta o interesse na produção desse composto, podendo ser utilizado em plásticos, resinas e solventes. A desidrogenação de 2,3-BD produz diacetil, flavorizante de gosto amanteigado

(BARTOWSKY e HENSCHKE, 2004) utilizado como aditivo e agente antimicrobiano em produtos alimentares, uma vez que inibe o crescimento de alguns microrganismos.

Devido à sua alta octanagem e poder calorífico ($27\,198\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) o diol se torna também um interessante aditivo de combustíveis, podendo ser combinado, por exemplo, com etanol (Poder calorífico de $29\,055\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) sem que essa mistura prejudique a utilização do 2,3-BD, visto que uma mistura equimolar dos dois resulta em um poder calorífico de $27\,660\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ (YU e SADDLER, 1982b). Além disso, a partir de sua condensação em metil-etil-cetona (MEK ou butan-2-ona) e subsequente hidrogenação, é possível produzir isômeros de octano, produzindo combustível de aviação de alta qualidade.

O 2,3-BD se mostrou um composto com potencial aplicação nas indústrias de polímeros, tintas, perfumes, explosivos, resinas plásticas e como transportadores de fármacos (GARG e JAIN, 1995). A Figura 2 exemplifica de forma dinâmica os possíveis usos do 2,3-butanodiol.

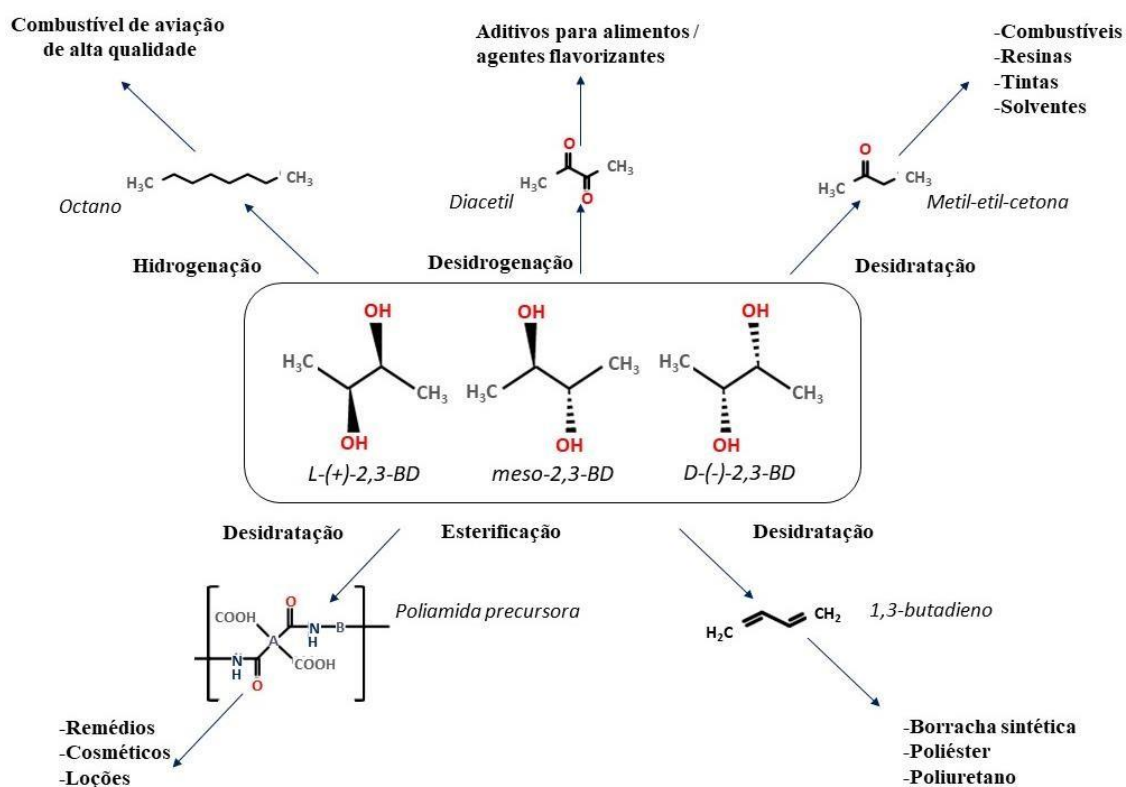


Figura 2. Exemplos de aplicação do 2,3-BD (traduzido e adaptado de Bialkowska, 2016).

2.2 Microrganismos produtores de 2,3-BD

Vários microrganismos já se mostraram capazes de produzir 2,3-BD, mas apenas alguns o fazem em quantidades que possam ser consideradas significantes. Leveduras que tem capacidade de sintetizar 2,3-BD, por exemplo, em geral o fazem com produtividade muito baixa (GARG e JAIN, 1995). Diversas espécies de bactérias de variados gêneros se mostraram capazes de transformar o piruvato em 2,3-BD, entre elas: *Klebsiella oxytoca* (MOTWANI et al., 1993; CHENG et al., 2010; GURAGAIN e VADLANI, 2017); *Klebsiella pneumoniae* (GROVER et al., 1990; SONG et al., 2012; JUNG et al., 2014); *Bacillus (Paenibacillus) polymyxa* (DZIEWULSKI et al., 1986; HÄSSLE et al., 2012; OKONKWO et al., 2017); *Bacillus subtilis* (ANDRADE et al., 2016); algumas bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas* e a microalga marinha, *Chlamydomonas perigranulata* (HON-NAMI, 2006).

Das bactérias citadas, *Klebsiella* sp. e *B. polymyxa* normalmente apresentam boa produtividade em relação ao 2,3-BD. Algumas outras espécies têm se mostrado promissoras para essa aplicação, mas em condições específicas e controladas, como é o caso da *Enterobacter aerogenes*, que em condições de microaerofilia apresenta bom rendimento para 2,3-BD. Na Tabela 1 estão citados alguns exemplos de estudos já realizados com diferentes microrganismos e substratos, assim como os respectivos resultados obtidos. *K. pneumoniae* é comumente escolhida para a síntese de 2,3-BD devido à sua capacidade de metabolizar os principais tipos de açúcares (hexoses, pentoses e alguns dissacarídeos) e também o ácido urônico, derivado de hidrolisados de materiais hemicelulósicos e celulósicos. Os açúcares presentes na lignocelulose da madeira podem ser eficientemente utilizados após pré-tratamento por hidrólise ácida (YU et al., 1982) e enzimática (SADDLER et al., 1983).

Tabela 1. Produção 2,3-BD a partir de diferentes gêneros e espécies de bactérias (traduzido e adaptado de Ji et al., 2011).

Microrganismos	Estereoisômeros formados ^a	Produção microbiana de 2,3-BD ^b					Referências	
		Substratos	Métodos ^c	Concentração de diol (g L ⁻¹)		Produtividade [g (L h) ⁻¹]		Rendimento (g g ⁻¹)
				2,3-BD	Acetoína			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Glicose	Batelada alimentada	150,0	10,0	4,21	0,43	Ma et al. (2009)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Glicose	Batelada alimentada	92,4	13,1	2,10	0,49	Qin et al. (2006)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Melaço de milho	Batelada alimentada	78,9	3,6	1,35	0,41	Wang et al. (2010)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Glicerol	Batelada alimentada	49,2	-	0,18	0,36	Petrov e Petrova (2009)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Glicerol	Batelada alimentada	70,0	-	0,47	0,39	Petrov e Petrova (2010)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Tubérculo de alcachofra ^f	Batelada alimentada	84,0	7,6	2,29	0,32	Sun et al. (2009b)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Tubérculo e talo de alcachofra	Batelada alimentada; SSF	67,4	13,1	1,18	1,81 ^d	Li et al. (2010a)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	meso-(9/1), L-(+)-	Hidrolisado de espiga de milho	Batelada alimentada; SSF	35,7	-	0,59	0,50	Cheng et al. (2010)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	meso-(9), L-(+)-(1)	Glicose	Batelada alimentada	130,0	1,4	1,64	0,48	Ji et al. (2010)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	meso-(9), L-(+)-(1)	Glicose	Batelada	95,5	1,9	1,74	0,49	Ji et al. (2009a)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	meso-(9), L-(+)-(1)	Melaço	Reciclo de célula	118,0	2,3	2,40	0,42	Afschar et al. (1991)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	meso-(9), L-(+)-(1)	Celulose de espiga de milho	Batelada; SSF	25,0	-	0,36	0,31	Cao et al. (1997)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	meso-(9), L-(+)-(1)	Glicose	Batelada alimentada	85,5	6,4	3,22	0,50	Qureshi e Cheryan (1989b)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	meso-(9), L-(+)-(1)	Glicose	Batelada alimentada	110,0 ^e	-	5,40	0,49	Zeng et al. (1991)
<i>Serratia marcescens</i>	meso-	Sacarose	Batelada alimentada	152,0	0,0	2,67	0,41	Zhang et al. (2010a)
<i>Serratia marcescens</i>	meso-	Sacarose	Batelada alimentada	139,9	6,7	3,49	0,47	Zhang et al. (2010b)
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	D-(-)-	Tubérculo de alcachofra	Batelada	36,9	-	0,88	0,50	Gao et al. (2010)
<i>Bacillus subtilis</i>	D-(-)-(3), meso-(2)	Glicose	Batelada	2,5	0,6	0,33	0,38	Moes et al. (1985)
<i>Bacillus licheniformis</i>	D-(-)-, meso-	Glicose	Frasco sem agitação	8,7	-	0,47	0,12	Nilegaonkar et al. (1992)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	D-(-)-, meso-	Glicose	Batelada	33,0	-	-	0,33	Alam et al. (1990)

^a Baseado em Celínska e Grajek (2009) e Maddox (1996); entre parênteses consta a proporção dos isômeros.

^b Diol: 2,3-butanodiol + acetoína.

^c SSF: *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (Fermentação e sacarificação simultânea).

^d g de diol por (3 g de talo + 4 g de tubérculo).

^e Produção total de 2,3-BD e acetoína.

^f Alcachofra de Jerusalém.

2.3 Caminhos metabólicos de produção de 2,3 -BD

Variados monossacarídeos (hexoses e pentoses) podem ser utilizados para a produção de 2,3-BD; os mesmos são convertidos a piruvato, o qual é metabolizado pelos microrganismos em uma fermentação ácido-mista de produtos intermediários, como α -acetolactato, diacetil e acetoína. Além do 2,3-BD, diversos outros bioprodutos podem ser sintetizados, como etanol, acetato, lactato e succinato, dependendo do microrganismo utilizado e das condições aplicadas. Na Figura 3 é possível verificar ambas as rotas a partir da glicose e da xilose.

A partir da glicose, o piruvato é formado a partir da glicólise de maneira relativamente simples (rota Embden-Meyerhof). Já a partir de pentoses, é necessária uma combinação da rota pentose-fosfato e Embden-Meyerhof.

Para a biossíntese do 2,3-BD a partir do piruvato, são empregadas três enzimas: a α -ALS (α -acetolactato sintase), a α -ALD (α -acetolactato descarboxilase) e a BDH (2,3-BD hidrogenase, também conhecida como AR (acetoína redutase)).

A enzima α -ALS tem seletividade ótima em pH levemente ácido (pH=6,0). Ela age em condições anaeróbias em uma reação de 2 etapas: primeiramente o piruvato é complexado com tiamina pirofosfato (TPP) para formar acetil-TPP; esse composto é então condensado com uma segunda molécula de piruvato para formar α -acetolactato (MAGEE e KOSARIC, 1987). Em condições aeróbias, a enzima α -ALS é rapidamente e irreversivelmente desativada, cessando a produção de 2,3-BD. Nesse caso, o piruvato é convertido (pela ação do complexo multienzimático piruvato desidrogenase (PDH), que não é sintetizada em meios anaeróbios e é normalmente inibida por NADH (GOTTSCHALK, 1986)) em acetilcoenzima A (acetil-CoA), sendo utilizada no ciclo ácido tricarboxílico (TCA), formando etanol e acetato. Já quando as condições não são completamente aeróbias, as enzimas lactato desidrogenase (LDH), piruvato-formato liase (PF) e α -ALS agem em conjunto, gerando lactato, formato e 2,3-BD, respectivamente.

A enzima α -ALD é responsável por converter α -acetolactato em acetoína, o que ocorre em condições anaeróbias. Na presença de O_2 , α -acetolactato pode sofrer descarboxilação e gerar diacetil. Nesse caso, a enzima diacetil redutase (DAR) converte o diacetil em acetoína.

Por último, BDH é responsável por reduzir a acetoína a 2,3-BD. Já foi comprovado que o acetato é um indutor das 3 principais enzimas envolvidas no processo. Todas as enzimas e componentes produzidos na rota de fermentação do 2,3-BD são normalmente produzidos durante a fase *log* e estacionária de crescimento celular, quando o oxigênio é limitante (MALLONEE e SPECKMAN, 1988).

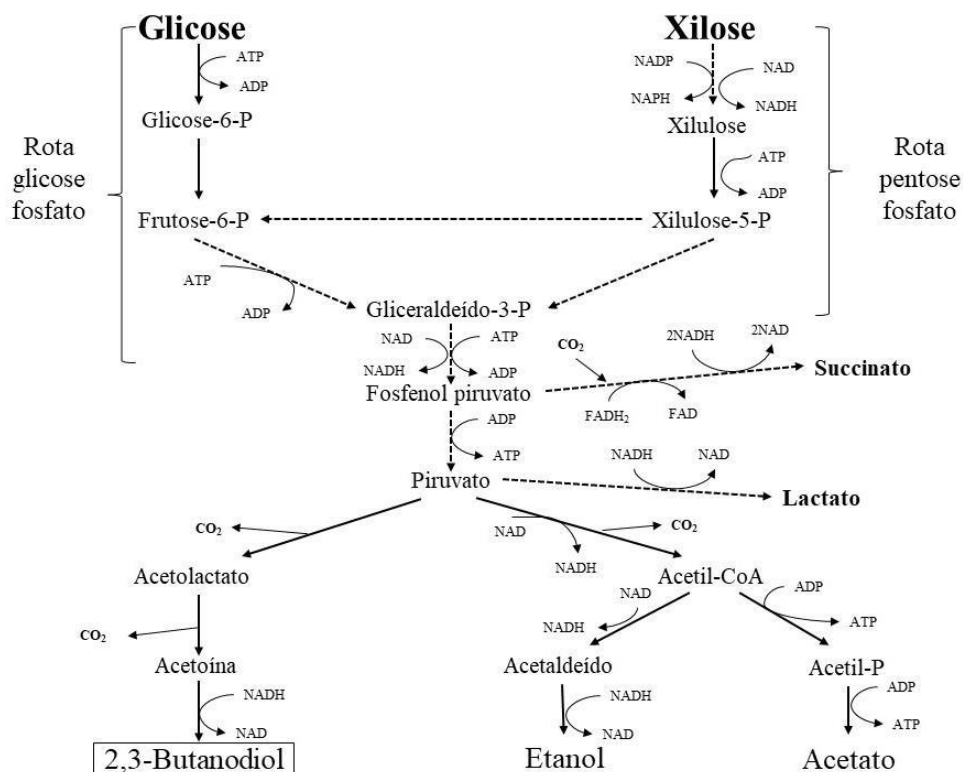


Figura 3. Rota para produção de 2,3-BD a partir de glicose e xilose (traduzido e adaptado de GURAGAIN e VADLANI, 2017).

2.4 Substratos alternativos

Como a matéria-prima é uma grande fatia dos custos na fermentação microbiana para produção de 2,3-BD, vários trabalhos que fazem a reutilização de materiais como fontes de carbono têm se mostrado promissores. Nas últimas décadas, o alto custo das fontes convencionais de amido e açúcares mostraram impactar diretamente na viabilidade do uso da fermentação de 2,3-BD em larga escala. Dessa forma, o uso de matérias-primas alternativas e mais baratas tem sido estudadas, indicando que 2,3-BD pode ser formado a partir de substratos alternativos, divididos entre não-celulósicos e lignocelulósicos (JI et al., 2011).

2.4.1 Biomassa não-celulósica

Um exemplo de substrato não-celulósico é resíduo de indústria alimentícia. Prego e colaboradores (2000, 2003) selecionaram resíduos desse tipo devido ao seu alto teor de açúcares e compatibilidade com processos biológicos. Os resíduos analisados incluem hidrolisado de amido proveniente do processamento do milho, resíduos da extração de açúcar da beterraba e soro proveniente da indústria de queijos. À parte dos resíduos, substratos de baixo custo e ricos em hexoses, como a alcachofra de Jerusalém e a cana de açúcar, são materiais com potencial uso nessa área. Sun e colaboradores (2009)

desenvolveram com sucesso um processo para produção de 2,3-BD usando *K. pneumoniae* e alcachofra de Jerusalém.

Ainda na linha dos não-celulósicos, um potencial substrato de baixo custo é o glicerol gerado na produção do biodiesel. Normalmente, em fermentações usando o glicerol, o principal produto é o 1,3-propanodiol (ROSSI et al., 2013). No entanto, já foi comprovado que é possível reduzir a proporção de 1,3-PD e aumentar a síntese de 2,3-BD em condições de baixo pH e microaerofilia (BIEBL et al., 1998). Petrov e Petrova (2009;2010) mostraram que o pH é o principal fator que afeta a produção de 2,3-BD nesse caso.

2.4.2 *Biomassa lignocelulósica*

A lignocelulose é a biomassa mais abundante no planeta (JI et al.,2011). Kim e Yun (2006) estimaram que mundialmente são gerados cerca de 1,5 trilhões de toneladas de biomassa lignocelulósica anualmente. Esse fato traz considerável atenção a essa matéria-prima como alternativa para os bioprocessos, visto que é um recurso energético naturalmente disponível e renovável. Os principais componentes da lignocelulose são a lignina, a celulose e a hemicelulose. A celulose é um polímero de glicose, enquanto que a hemicelulose é um polímero que contém principalmente pentoses, como a arabinose, a xilose e a ribose (YAN et al., 2009). A produtividade não é tão alta comparado aos bioprocessos usando glicose, mas o fato de ser uma matéria prima barata e abundante a torna uma alternativa economicamente atrativa.

A espiga de milho, por exemplo, é um tipo de material lignocelulósico derivado do processamento do milho, é um resíduo altamente disponível e de baixo custo proveniente da agricultura. Após um pré-tratamento com amônia e hidrólise ácida, a fração celulósica presente no material pode ser convertida em 90 % de glicose, servindo de substrato para a produção de 2,3-BD (CAO et al., 1997). Para fazer com que a conversão de biomassa lignocelulósica seja praticável economicamente, é essencial que a fração hemicelulósica também seja eficientemente convertida em 2,3-BD. Outros materiais já foram testados, como a fibra de milho (SAHA e BOTHAST, 1999), melaço de milho (WANG et al., 2010), hidrolisado de madeira (YU et al., 1982; GROVER et al., 1990), hidrolisado de bagaço de cana (UM et al., 2017) e palha de milho (MA et al., 2018; YAN et al., 2009), mostrando que é possível se obter 2,3-BD a partir de diversos tipos de materiais residuais.

A soja é um dos grãos mais cultivados no mundo, com uma produção global em torno de 351 milhões de toneladas (Embrapa, safra 2016/2017), gerando milhões de toneladas de casca, o principal subproduto gerado no processamento do grão, que pode ser utilizada como matéria-prima lignocelulósica em bioprocessos. A composição química da casca de soja

depende da cultivar plantada e das condições edafoclimáticas de cultivo. Cassales et al. (2011) fizeram a caracterização da casca do grão de soja (fração mássica em base úmida), mostrando que a mesma contém aproximadamente 40 % de celulose, 26 % de xilose, 9 % de lignina e 13 % de proteínas. Os resultados sugerem uma composição interessante da casca de soja para uso em bioprocessos, devido à baixa concentração de lignina, uma vez que a degradação dessa macromolécula produz compostos tóxicos à maioria dos microrganismos. A fração mássica de açúcares fermentescíveis presentes na casca de soja excede 60 %, valor muito similar ao encontrado em bagaço de cana-de-açúcar (65 %) (LASER et al., 2002) e palha de arroz (66 %) (ROBERTO et al., 2003); e superior ao encontrado em palha de trigo (57 %) (CANILHA et al., 2008) e grão de cevada (46 %) (MUSSATTO e ROBERTO, 2006). Esses resultados mostram que a casca de soja é um substrato muito promissor para a bioconversão em produtos de alto valor agregado.

2.5 Hidrólise da biomassa lignocelulósica

Para que resíduos lignocelulósicos possam ser utilizados em bioprocessos, estes devem passar por processos de tratamento físicos, químicos ou enzimáticos, de forma a liberar fermentescíveis presentes na fração de hemicelulose e aumentar a suscetibilidade da fração de celulose à hidrólise enzimática (LEE, 1997). O pré-tratamento se faz necessário para aumentar a acessibilidade da área de superfície, redução da cristalização da celulose, despolimerização parcial da celulose e solubilização das frações de hemicelulose e lignina (MARGEOT et al., 2009).

Além disso, os pré-tratamentos e tratamentos de hidrólise realizados nos materiais lignocelulósicos viabilizam a fermentação dos açúcares presentes nesses materiais pelos microrganismos. Diversos tipos de pré-tratamento já foram estudados, cada um com suas vantagens e desvantagens.

Dentre os pré-tratamentos, o realizado com ácido diluído e temperatura intermediária (60-160 °C) é considerado um dos mais eficientes em relação à liberação dos açúcares, embora possa haver liberação de compostos secundários e de lignina, que podem ser inibidores ao crescimento de microrganismos fermentadores. Além disso, xilose e arabinose podem ser degradados à furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF), respectivamente, juntamente com outros compostos fenólicos oriundos da degradação da lignina.

Após o pré-tratamento é realizado o processo de hidrólise enzimática (sacarificação), para a liberação dos monômeros de glicose. Normalmente, hidrólises enzimáticas possuem um rendimento de açúcar menor que 20 % sem a realização da etapa de pré-tratamento

enquanto que, quando esta etapa é realizada, o rendimento pode alcançar mais de 90 % (HOLM e LASSI, 2011).

2.6 Condições de operação

2.6.1 Aeração

Na produção de 2,3-BD via processos fermentativos, a quantidade de oxigênio fornecido ao meio é um fator crítico, visto que a maioria das bactérias utilizadas nos estudos são dos gêneros *Klebsiella* e *Bacillus*, microrganismos que são geralmente anaeróbios facultativos, ou seja, obtém energia tanto via fermentação quanto via respiração. O 2,3-BD é produzido principalmente em meios com moderada limitação de O₂. No entanto, quando demasiada, essa limitação pode impactar diretamente no crescimento celular e, conseqüentemente, diminuir a produção de 2,3-BD, predominando a formação de lactato; enquanto que um aumento excessivo do fornecimento de oxigênio favorece o crescimento da biomassa e liberação de CO₂, em detrimento da produção de 2,3-BD e predominante formação de acetato (SABLAYROLLES e GOMA, 1984; CONVERTI et al., 2003).

A necessidade ou não de aeração para produção de 2,3-BD é uma contradição discutida por Voloch e colaboradores (1985). Quando o fornecimento de O₂ é limitado, as mesmas utilizam as duas vias para a obtenção de energia, de modo que a produção de 2,3-BD depende das atividades relativas a cada via, podendo ser maximizada através da diminuição de fornecimento de oxigênio. Isso está relacionado à manutenção do equilíbrio NAD⁺/NADH no meio, que varia em cada condição. Se o processo é aeróbio, esse equilíbrio se mantém por meio da regeneração de NADH (consumido na glicólise) na respiração celular. Já em um meio anaeróbio, a formação de 2,3-BD e outras rotas de fermentação servem ao mesmo propósito. A relação de fornecimento de oxigênio e formação de produtos resultantes do processo de fermentação podem ser observados na Figura 4.

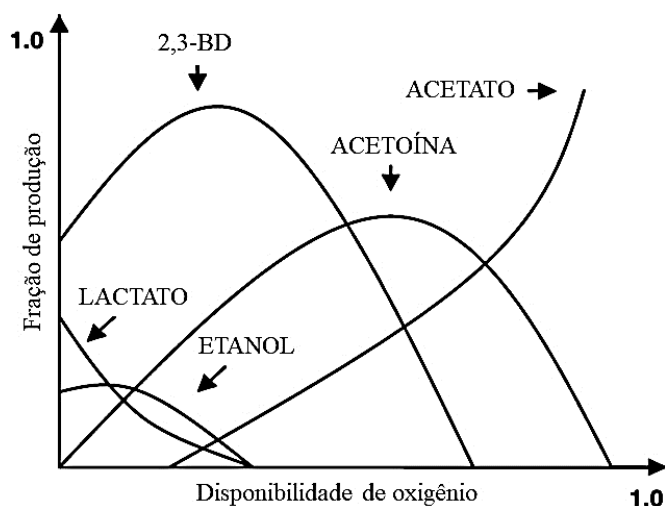


Figura 4. Influência da disponibilidade de oxigênio na síntese de produtos por *B. polymyxa* (modificado de DE MAS et al., 1988).

2.6.2 Potencial Hidrogeniônico

O pH é um parâmetro fundamental na regulação do metabolismo das bactérias e essa influência é especialmente pronunciada em processos que envolvem múltiplos produtos. A condição ótima de pH depende diretamente do microrganismo e do substrato utilizado no processo.

De maneira geral, condições alcalinas (acima de pH 6,5) favorecem a formação de ácidos orgânicos, diminuindo a produção de 2,3-BD. Em condições ácidas, a produção de ácidos orgânicos é reduzida mais de 10 vezes enquanto que a produção de diol aumenta de 3 a 7 vezes.

A formação de ácidos ocorre na maioria dos processos de fermentação anaeróbia, o que acaba por diminuir o pH do meio fermentativo durante o processo, frente ao aumento da concentração de ácidos tóxicos não dissociados. Sem que isso seja controlado, o crescimento celular e o consumo de açúcares cessa gradualmente e a cultura é inativada pelos próprios produtos formados (BIEBL et al., 1998).

Alguns microrganismos desenvolvem estratégias defensivas, como alterar o próprio metabolismo para produzir compostos menos tóxicos, como álcoois e glicóis (VAN HOUTDT et al., 2007). Maddox (1996) explicou este fenômeno, postulando que o que causa a indução da rota para 2,3-BD é o acúmulo de componentes ácidos no meio fermentativo ao invés da alteração do pH interno. O gradiente de pH transmembrana resulta no acúmulo de acetato, o qual induz as enzimas envolvidas na produção de 2,3-BD. Ao diminuir o pH da cultura, o gradiente de pH é elevado, produzindo 2,3-BD antes de o pH do meio externo se tornar muito elevado, inativando a cultura.

Este fenômeno foi observado em *Klebsiella* sp., no estudo de Biebl et al. (1998), utilizando glicerol como fonte de carbono. Em pH neutro, esse grupo de bactérias costuma produzir etanol e ácido acético, enquanto que abaixo de 6,0 são produzidos 2,3-BD e etanol. Os autores observaram que se o pH da cultura é fixo (no experimento em questão 5,0; ou alternativamente 7,0), quanto mais baixo o pH, maior a concentração final de 2,3-BD. Curiosamente, a maior concentração de 2,3-BD foi encontrada, no entanto, quando o pH do meio não era controlado (declínio gradativo de 7,0 para 5,0). O que foi inferido pelos autores é que isso é explicado pelo fato de que não é o pH que induz a produção do diol, mas sim a presença de ácido acético. Afirmaram ainda que é importante observar que não é só a presença de ácido acético que induz a produção de 2,3-BD, visto que o mesmo é formado em pH neutro sob excesso de glicerol.

2.6.3 Temperatura

A eficiência de bioprocessos é extremamente dependente da temperatura, visto que essa variável é responsável pela regulação da atividade enzimática e da manutenção celular (GARG e JAIN, 1995). Normalmente, o intervalo de temperatura entre 30-35 °C deveria ser o ideal para fermentação com bactérias, visto que em condições aeróbias esse é o intervalo em que o crescimento celular é máximo; mudando essa condição para microaerofilia, serão obtidos os produtos da fermentação ao invés de biomassa. Acima desse intervalo de temperatura a degradação celular se torna dominante no meio, enquanto que abaixo, a regulação e a taxa de metabolismo tendem a decair.

Nos estudos de Biebl (1998), em culturas com *K. pneumoniae*, a diminuição da temperatura de 35 °C para 30 °C resultou em decaimento da síntese de etanol, em favor da formação de 2,3-BD. É possível afirmar, portanto, que a condição ótima de operação para fermentação utilizando *K. pneumoniae* seria à temperatura de 30 °C, em meio sem controle de pH (acidificação descontrolada, referenciada acima), a partir de um pH não inferior a 7,0, condição também utilizada por Yu e colaboradores (1982, 1985).

Para investigar o efeito da temperatura em uma cultura com *E. aerogenes*, Perego e colaboradores (2000) realizaram um estudo utilizando o intervalo entre 23 °C a 46 °C. A taxa de conversão da glicose em 2,3-BD e acetoína, assim como a concentração final de produtos, se mostraram inversamente correlacionados com a temperatura. Devido à aceleração dos processos enzimáticos, o tempo de fermentação diminuía de acordo com o aumento da temperatura. A produtividade de 2,3-BD aumentou gradualmente até a temperatura de 39 °C e decaiu acima desse limite. Uma vez que o objetivo do trabalho era determinar uma temperatura ótima para a produção de 2,3-BD, os autores inferiram que, para este processo,

a temperatura de 39 °C é a ideal, sendo utilizada posteriormente no trabalho de Converti e colaboradores (2003).

2.6.4 Concentração de substratos

Na maioria dos processos de produção de 2,3-BD a partir de resíduos lignocelulósicos, a concentração inicial de açúcares varia no intervalo de 5-10 % (GARG e JAIN, 1995). Essa baixa concentração se deve principalmente à presença de substâncias tóxicas na matéria-prima, especialmente em hidrolisados de madeira, cuja concentração aumenta com o aumento da concentração da fonte de carbono. Frazer e McCaskey (1991) avaliaram o efeito da presença de substâncias tóxicas no hidrolisado de madeira na produção de 2,3-BD, utilizando *K. pneumoniae*. O estudo mostrou que a concentração de sulfato acima de 0,2 % (massa/volume) reduziu a produção de 2,3-BD em 30 %, embora o crescimento celular não tivesse sido afetado. Resultados semelhantes foram encontrados para o furfural, composto tóxico às células presente no hidrolisado lignocelulósico, mas com um rendimento para o 2,3-BD ligeiramente mais alto. Compostos fenólicos inibiram a produção de 2,3-BD e o crescimento celular.

Altas concentrações de açúcar (acima de 50 g · L⁻¹) inibem a produção de 2,3-BD e a metabolização de açúcares (YU e SADDLER, 1983). McCall e Georgi (1954) demonstraram que em baixas concentrações de açúcares (de 4 a 6 %), a fermentação de sacarose do melão de beterraba foi completa em 24 h, enquanto que em concentrações altas (acima de 17 %), a fermentação foi incompleta e menos eficiente no mesmo período.

Em meios sintéticos suplementados com açúcares puros, tais como glicose, xilose e arabinose, não há a presença de compostos inibidores, permitindo que a concentração inicial de açúcares possa ser superior a 200 g · L⁻¹, e o aumento na concentração inicial leva a um melhor rendimento para a produção de 2,3-BD. No entanto, observou-se que concentrações iniciais de açúcar superiores a 20 g · L⁻¹ ocasionam uma diminuição na taxa de crescimento específico, o que é possivelmente um resultado de uma queda na atividade da água. Converti et al. (2002) realizaram estudos com *E. aerogenes* para a concentração inicial de glicose, mostrando pouca influência da mesma (num intervalo de 9 à 72 g · L⁻¹) na produção de 2,3- BD. Em outro estudo (DE MAS et al., 1988), realizado com *B. polymyxa*, a inibição do crescimento ocorreu em concentrações de substrato superiores a 150 g · L⁻¹. A influência da concentração de xilose em 2,3-BD parece ser espécie específico, visto que há informações divergentes sobre esse assunto (GARG e JAIN, 1995). Em geral, esta parece ser influência do tipo de substrato, e a concentração na produção de 2,3-BD é espécie dependente.

Biebl e colaboradores (1998) relataram que, para qualquer condição utilizada, excesso de glicerol na cultura aumentou a produtividade de 2,3-BD. Em seus estudos com *E. aerogenes*, Perego e colaboradores (2000) testaram valores de concentração inicial de açúcares entre 20 e 100 g·L⁻¹, demonstrando que o tempo de fermentação aumentava gradualmente com o aumento da disponibilidade inicial de açúcares, diminuindo gradativamente o rendimento na produção de 2,3-BD.

A fim de testar a suplementação de alguns componentes no meio fermentativo, Nakashimada e colaboradores (2000) descobriram que a suplementação de acetato, propionato, piruvato e succinato aumentaram a produção de 2,3-BD pela bactéria *B. polymyxa*, enquanto que com a adição de butirato, valerato, formato, lactato e malato não se pode observar nenhum efeito. Dentre os compostos testados, acetato parece ser o melhor aditivo para o aumento do rendimento para 2,3-BD, visto que nesse estudo os maiores rendimentos e concentração final foram obtidos com suplementação de 0,9 % de acetato. Com a adição de acetato, também diminui a produção de etanol, lactato e hidrogênio. No entanto, a adição de mais do que 1,2 % de acetato inibiu o crescimento celular e a produção de 2,3-BD.

3 Materiais e Métodos

3.1 Microrganismos, meios de cultivo e manutenções

Neste estudo, duas bactérias isoladas por Rossi et al. (2011), *Klebsiela pneumoniae* (linhagem BLh-1) e *Pantoea agglomerans* (linhagem BL1), foram testadas como biocatalizadores de conversão de açúcares de hidrolisados de biomassa lignocelulósica em 2,3-butanodiol. Os estoques de microrganismos foram mantidos em meio Luria-Bertrani (LB) com 50 % de glicerol, em *ultrafreezer* a -80 °C no laboratório BiotecLab, situado no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

Os microrganismos foram transferidos do glicerol para um meio de cultura líquido, cuja composição consta na Tabela 2, e crescidos *overnight* em agitador orbital a 30 °C em 120 rpm. Após, foi realizada a técnica de esgotamento em placa de Petri cujo meio está descrito na Tabela 3. As colônias puras foram utilizadas para a realização dos inóculos que foram utilizados nos experimentos de fermentação.

Tabela 2. Meio LB com glicose para crescimento de culturas.

Composição	Concentração (g · L ⁻¹)
Triptona	10
NaCl	10
Extrato de Levedura	5
Glicose	20

Tabela 3. Composição do meio de manutenção de linhagens.

Composição	Concentração (g · L ⁻¹)
Triptona	10
NaCl	10
Extrato de Levedura	5
Ágar bacteriológico	15
Glicose	50

3.2 Meio de cultivo

Os meios utilizados para a fermentação foram os hidrolisados resultantes do tratamento ácido e enzimático da casca de soja. A casca de soja foi adquirida da companhia Solae do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos (atual DuPont), localizada no município de Esteio-RS e o teor de umidade foi determinado em Balança de Infravermelho.

O hidrolisado ácido foi obtido a partir da solubilização da fração de hemicelulose da casca de soja por tratamento ácido diluído, com 1 % em volume de H₂SO₄, na relação sólido:líquido de 1:10, autoclavado por 40 minutos na temperatura de 121 °C seguindo a metodologia descrita em Cassales et al. (2011).

O sólido resultante do processo de tratamento ácido foi lavado em água corrente e utilizado para a obtenção do hidrolisado enzimático (solubilização da fração de celulose). Para este processo, utilizou-se a enzima comercial Novozymes CELLUCLAST® 1.5L com celulase ativa de *Trichoderma reesei*. O sólido foi incubado juntamente com a enzima e tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 4,7, na relação sólido:líquido de 1:20 em agitador orbital a 50 °C. Utilizou-se a concentração de enzima de 15 FPU · g⁻¹ com tempo de reação de 96 horas, segundo metodologia descrita em Dall Cortivo (2017).

Ambos os hidrolisados foram concentrados em concentrador a vácuo visando o aumento das quantidades finais de açúcares. Após, tiveram o seu pH ajustado e foram centrifugados para a remoção de impurezas. Por fim, os hidrolisados foram armazenados a -4 °C, para evitar a degradação dos açúcares presentes no meio.

3.3 Ensaio de Fermentação

Os ensaios de fermentação foram realizados em agitador orbital em Erlenmeyers de 500 mL, com volume útil de meio fermentativo de 250 mL. Quanto à oxigenação dos meios de cultura, vedou-se os Erlenmeyers com buchas de algodão permeáveis ao oxigênio, simulando uma condição de microaerofilia, com agitação de 120 rpm visando a transferência de oxigênio para os meios de cultura. Avaliou-se a fermentação dos hidrolisados ácido e enzimático separadamente pelas duas bactérias em duas temperaturas, 30 °C e 37 °C. Ambos os ensaios foram realizados em duplicata.

O inóculo foi realizado com os microrganismos citados no item 3.1, os quais cresceram *overnight* em meio de cultura líquido. Após, o meio de cultura foi centrifugado por 15 minutos, a 4 °C e 3000 ×g, retirando o sobrenadante que possivelmente continha produtos de fermentação. As células centrifugadas foram ressuspensas (diluídas) em meio de cultura estéril (Tabela 2), para ajustar a densidade ótica (DO) igual a 1, e inoculadas nos Erlenmeyers contendo os hidrolisados. Utilizou-se volume de inóculo igual a 10 % do

volume do meio de fermentação. A biorreação foi monitorada pela retirada de uma alíquota de 3 ml a cada 3 horas nas primeiras 12 horas de cultivo e após, o mesmo volume foi retirado a cada 12 horas até atingir o tempo final de cultivo de 72 horas.

3.4 Metodologia analítica

3.4.1 Concentração dos produtos e consumo de açúcares

A concentração de produtos de fermentação (2,3-BD, etanol e ácido acético) e açúcares foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), 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 foi utilizada uma solução de 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. 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 4 °C e 3000 ×g por 15 min, a fim de precipitar as células em suspensão, procedendo-se então a filtração da porção sobrenadante em filtro *Sepac* e após em filtro *Holder*, com membranas de acetato de celulose (porosidade 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 de pureza de cromatografia (superior a 99,5 %) foram utilizados.

3.4.2 Crescimento celular

Para o preparo do inóculo, foi adotado o método de espectrofotometria, as concentrações celulares foram determinadas por turbidimetria em espectrofotômetro (Ultraspec 3100 PRO) no comprimento de onda de 600 nm. O crescimento celular durante as fermentações com hidrolisado foram determinados pela contagem em placa de unidade formadora de colônias (UFC), utilizando a metodologia de diluições seriadas onde o meio fermentativo foi diluído em solução salina (NaCl) de 1 %.

3.5 Cálculo de parâmetros cinéticos e Análises estatísticas

Os valores de conversão de substrato a produtos em relação ao 2,3-BD foram obtidos a partir da Equação 1.

$$Y_{PS} = \frac{P_{2,3-BD}}{(S_0 - S)} \quad (1)$$

Onde:

Y_{PS} é o valor para a conversão de substrato em produtos (rendimento), em $g \cdot g^{-1}$;

$P_{2,3-BD}$ é a quantidade máxima de 2,3-BD produzida, em $g \cdot L^{-1}$;

S_0 é a concentração inicial de substrato (açúcares totais) em $g \cdot L^{-1}$;

S é a concentração final de substrato (açúcares totais) em $g \cdot L^{-1}$.

A produtividade dos ensaios fermentativos foi determinada de acordo com a Equação 2.

$$Q_P = \frac{P_{2,3-BD}}{t} \quad (2)$$

Onde:

Q_P é a produtividade, em $[g \cdot (L \cdot h)^{-1}]$;

t é o tempo necessário para atingir a maior concentração de 2,3-BD.

A análise estatística foi realizada utilizando o Microsoft Excel. A análise de significância foi realizada pelo teste T de Student, considerando como diferença significativa valores de $p < 0.05$. Para os cálculos, foram utilizadas as médias das duplicatas obtidas durante as experiências de fermentação.

4 Resultados e Discussão

4.1 Caracterização dos hidrolisados

Através do processo de hidrólise ácida diluída com ácido sulfúrico (H_2SO_4), ocorre solubilização da lignina e liberação dos açúcares presentes na fração de hemicelulose, os quais são predominantemente xilose e arabinose, com uma pequena quantidade de glicose liberada, mostrando perfil de liberação de açúcares semelhante ao mostrado por Cassales et al. (2011). O hidrolisado resultante do tratamento ácido foi concentrado a vácuo para aumentar o teor de açúcares e a caracterização do perfil final de açúcares deste hidrolisado antes do início do processo fermentativo se encontra na Tabela 4. Após o processo de tratamento ácido diluído, a cristalinidade da fração de celulose é reduzida, podendo passar por um tratamento enzimático para a liberação da glicose. Neste trabalho, utilizou-se a enzima Novozymes CELLUCLAST 1.5[®], contendo complexos enzimáticos de endoglúcanases e β -glucosidase, com eficiência completa de conversão da celulose em glicose (DALL CORTIVO, 2017).

Como no caldo resultante do tratamento ácido, o hidrolisado resultante do tratamento enzimático também passou por processo de concentração a vácuo, e o perfil de açúcares anterior ao início do processo fermentativo é mostrado na Tabela 5. É observada uma pequena concentração de xilose no hidrolisado enzimático que é residual da fração de hemicelulose que não foi totalmente solubilizada durante o tratamento ácido diluído.

Apesar de os hidrolisados terem sido concentrados com o intuito de obter um valor padrão para a concentração inicial de açúcares, o processo de esterilização por autoclave pode acarretar em leve degradação dos mesmos, havendo variação na sua concentração inicial no tempo anterior ao início da fermentação. Esta variação está descrita nos valores de médias e desvio padrão mostrados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Composição do hidrolisado ácido.

Composição	Concentração ($g \cdot L^{-1}$)
Xilose	26,50 \pm 0,82
Glicose	7,53 \pm 1,63
Arabinose	21,12 \pm 1,52

Tabela 5. Composição do hidrolisado enzimático.

Composição	Concentração (g · L ⁻¹)
Xilose	9,62 ± 1,15
Glicose	41,03 ± 1,61

4.2 Fermentação em hidrolisado ácido

Neste meio de fermentação, as pentoses (xilose e arabinose) apresentaram concentração predominante. A glicose presente no meio representava cerca de 13 % dos açúcares totais, o que explica a não incidência de repressão catabólica pela glicose, como foi confirmado com as duas bactérias, ocorrendo consumo simultâneo dos três açúcares, como pode ser observado nas Figuras 5, 6, 7 e 8. Este perfil de consumo de açúcar já foi caracterizado na literatura no trabalho de Ma e colaboradores (2018), com a bactéria *Paenibacillus polymyxa* ATCC 12321, a qual tem ótimo potencial de produção de 2,3-BD em meio sintético. Neste estudo foram testadas diferentes proporções de xilose e glicose, e foi observado que quanto maior a concentração de xilose e menor a concentração de glicose no meio, menor o efeito da repressão catabólica.

No presente trabalho, após o esgotamento da glicose, a arabinose e a xilose presentes no meio são rapidamente metabolizadas, sendo que no tempo final de 72 h o consumo de açúcares foi maior na temperatura de 30 °C pela bactéria *K. pneumoniae*, enquanto que nessa mesma temperatura o consumo foi ligeiramente inferior com a *P. aglomerans*. Já na temperatura de 37 °C, observou-se o contrário, com um consumo de açúcares e produção de 2,3-BD levemente superior com a bactéria *P. aglomerans*. Deve-se ressaltar que não foi possível medir com precisão os dados referentes a crescimento celular da bactéria *K. pneumoniae* na temperatura de 30 °C nesse hidrolisado. Dessa forma, esses dados não aparecem nos resultados apresentados.

As Figuras 5 e 6 representam as cinéticas realizadas com a bactéria *K. pneumoniae*, dos experimentos realizados a 30 °C e 37 °C, respectivamente, enquanto que as Figuras 7 e 8 representam os experimentos nas mesmas temperaturas com a bactéria *P. aglomerans*. As Figuras apresentam as cinéticas referentes a consumo de açúcares, formação de produtos, variação do pH e células viáveis ao longo do processo fermentativo.

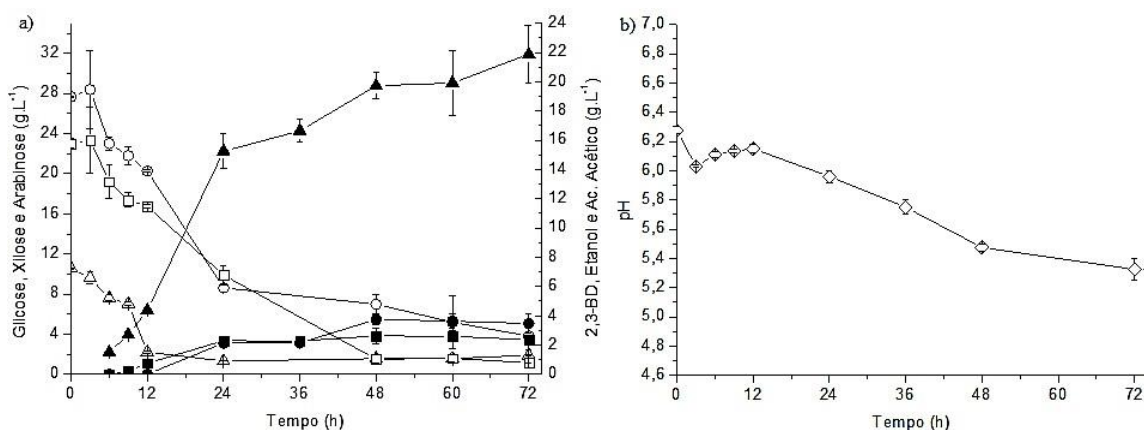


Figura 5. Ensaio fermentativo de produção de 2,3-BD em hidrolisado ácido da casca de soja a temperatura de 30 °C com *K. pneumoniae*. Em a) Consumo de açúcares: (-Δ-) glicose, (-○-) xilose e (-□-) arabinose; e formação de produtos: (-▲-) 2,3-butanodiol, (-●-) Ácido acético e (-■-) etanol; e em b) (-◇-) pH.

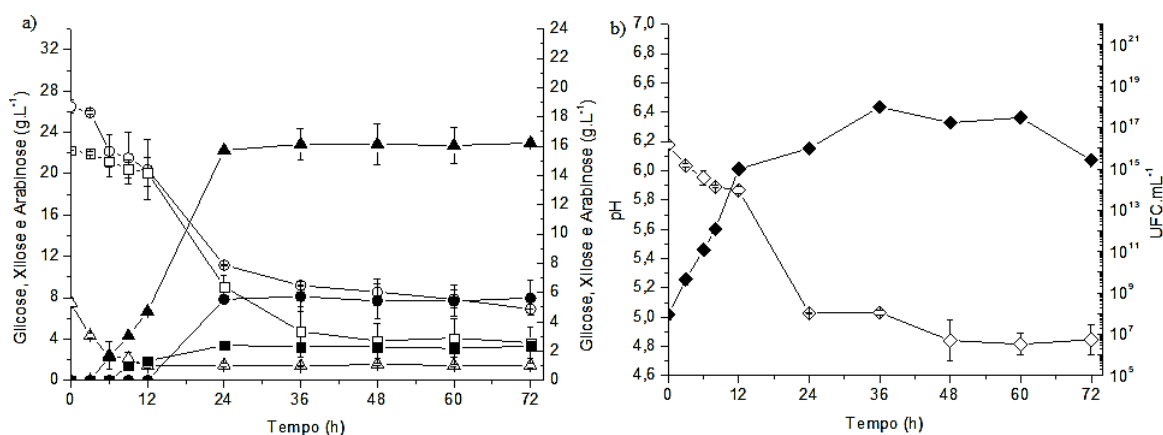


Figura 6. Ensaio fermentativo de produção de 2,3-BD em hidrolisado ácido da casca de soja a temperatura de 37 °C com *K. pneumoniae*. Em a) Consumo de açúcares: (-Δ-) glicose, (-○-) xilose e (-□-) arabinose; e formação de produtos: (-▲-) 2,3-butanodiol, (-●-) Ácido acético e (-■-) etanol; e em b) (-◇-) pH e (-◆-) Crescimento celular (UFC).

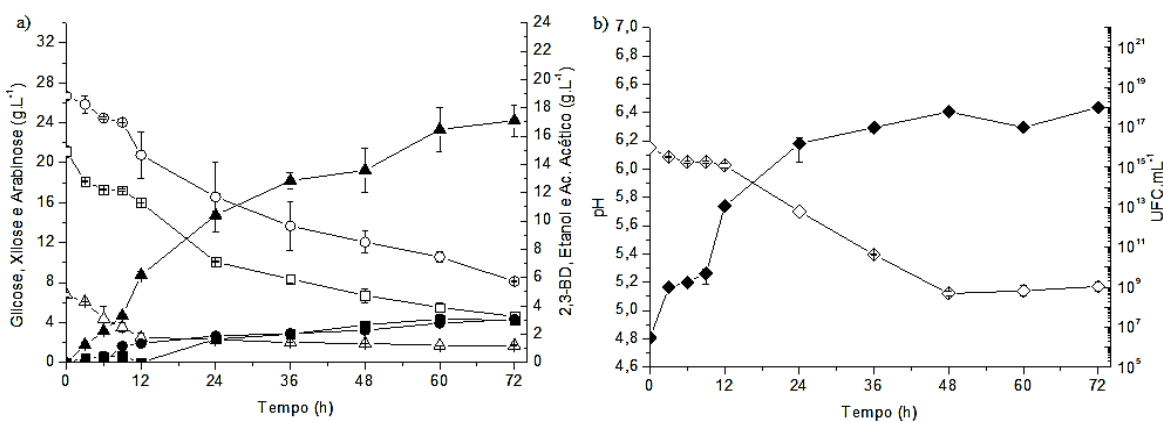


Figura 7. Ensaio fermentativo de produção de 2,3-BD em hidrolisado ácido da casca de soja a temperatura de 30 °C com *P. agglomerans*. Em a) Consumo de açúcares: (-Δ-) glicose, (-○-) xilose e (-□-) arabinose; e formação de produtos: (-▲-) 2,3-butanodiol, (-●-) Ácido acético e (-■-) etanol; e em b) (-◇-) pH e (-◆-) Crescimento celular (UFC).

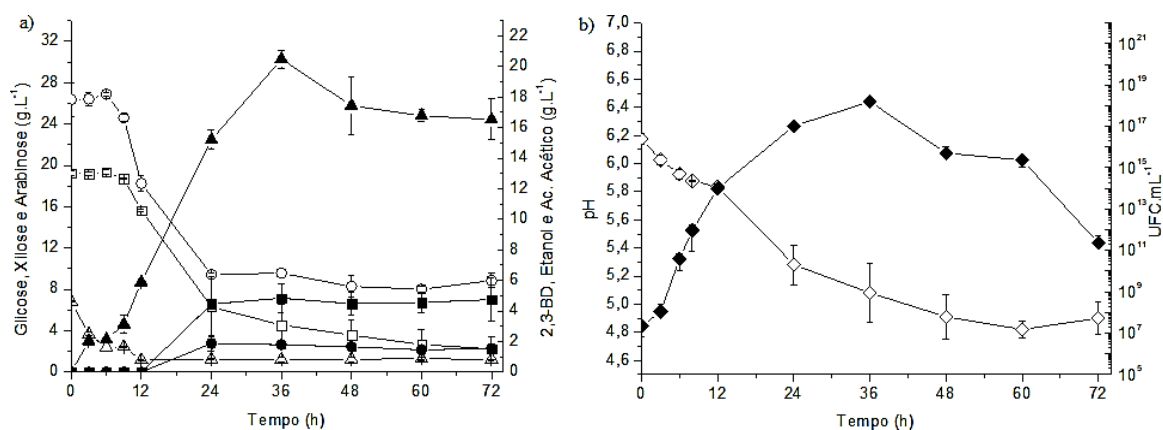


Figura 8. Ensaio fermentativo de produção de 2,3-BD em hidrolisado ácido da casca de soja a temperatura de 37 °C com *P. agglomerans*. Em a) Consumo de açúcares: (-Δ-) glicose, (-○-) xilose e (-□-) arabinose; e formação de produtos: (-▲-) 2,3-butanodiol, (-●-) Ácido acético e (-■-) etanol; e em b) (-◇-) pH e (-◆-) Crescimento celular (UFC).

Ambas as bactérias mostraram rápida adaptação ao hidrolisado. Também para ambas as bactérias é possível observar que houve preferência ao consumo de arabinose comparado ao de xilose no hidrolisado ácido. Kang e colaboradores (1998) relataram a repressão dos genes envolvidos no metabolismo da xilose quando as células foram cultivadas em um meio contendo arabinose e xilose. Em um estudo com a bactéria *E. coli*, Hernández-Montalvo e colaboradores (2001) observaram fenômeno parecido, em que a bactéria prefere consumir arabinose à xilose. O mesmo efeito repressivo pode ser observado com a bactéria *K. oxytoca* ATCC 8724 (GURAGAIN e VADLANI, 2017), também em meio hidrolisado. Embora existam estudos que indiquem estratégias para eliminar a repressão catabólica mediada pela glicose ao metabolismo de pentoses (JI et al., 2011), ainda não há referências para a repressão mediada pela arabinose ao metabolismo de xilose, como ocorrido no presente trabalho. A repressão catabólica em enterobactérias vem sendo muito estudada, uma vez que esse fenômeno diz respeito à habilidade da glicose de bloquear a indução de genes para o uso de outros substratos, o que acaba por tornar os processos de bioconversão menos eficientes, uma vez que para iniciar o consumo dos outros açúcares, as bactérias precisam primeiro metabolizar toda a glicose presente no meio (JI et al., 2011).

É possível observar pelos resultados obtidos que a formação de 2,3-BD é verificada principalmente durante a fase *log* de crescimento celular. Isso já era esperado, uma vez que as enzimas e componentes responsáveis pela produção de 2,3-BD são produzidas nessa fase do crescimento celular, quando o oxigênio é limitante (MALLONEE e SPECKMAN, 1988). As condições de operação utilizadas favorecem principalmente o uso da rota de produção para 2,3-BD, pois as bactérias, dessa forma, regulam o balanço energético através do equilíbrio de NADH/NAD⁺ no meio fermentativo.

O ácido acético apesar de ser um produto do metabolismo das bactérias, quando produzido em quantidades maiores, a sua forma não dissociada pode entrar na célula por difusão, através da membrana plasmática, e desencadear vários efeitos tóxicos, como desacoplamento e abaixamento do pH intracelular. Apesar disso, a presença de ácido acético já foi relatada como benéfica para melhorar a produtividade de etanol e outros metabólitos, desde que a concentração de ácido acético não exceda a concentração que possa ser letal ao crescimento celular (LARSSON et al., 1999). Neste trabalho a fermentação por ambas as bactérias na temperatura de 37 °C gerou ácido acético, causando abaixamento do pH e deixando o meio fermentativo abaixo do pH ótimo para a produção de 2,3 BD. Na temperatura de 37 °C observou-se que o pH diminuiu a valores mais baixos, próximo de 4,9. Com o pH do meio estando abaixo do ideal, o crescimento celular chega em sua fase estacionária, parando de consumir os açúcares, mesmo que ainda disponíveis, e cessa a produção de 2,3-BD.

4.3 Fermentação em hidrolisado enzimático

Diferentemente do que foi observado nos experimentos com o hidrolisado ácido, quando as pentoses são a principal fonte de carbono, no hidrolisado enzimático, a principal fonte de carbono era a glicose, sendo muito superior à concentração inicial de xilose. Com isso, foi observado o fenômeno repressão catabólica e a xilose não foi consumida. As Figuras 9 e 10 apresentam os resultados obtidos nos experimentos realizados com a bactéria *K. pneumoniae* nas duas temperaturas de trabalho, enquanto que as Figuras 11 e 12 apresentam os resultados obtidos com a bactéria *P. agglomerans*.

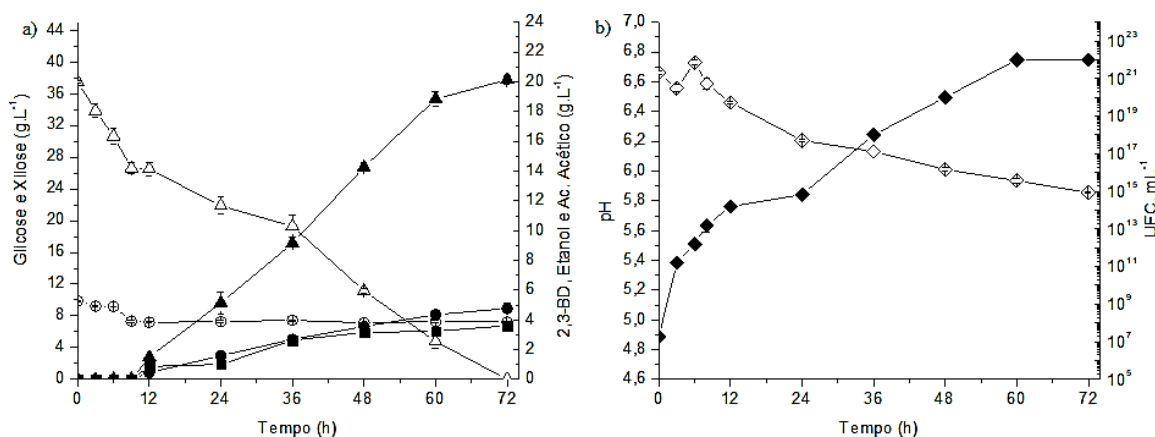


Figura 9. Ensaio fermentativo de produção de 2,3-BD em hidrolisado enzimático da casca de soja a temperatura de 30 °C com *K. pneumoniae*. Em a) Consumo de açúcares: (-Δ-) glicose e (-○-) xilose; e formação de produtos: (-▲-) 2,3-butanodiol, (-●-) Ácido acético e (-■-) etanol; e em b) (-◇-) pH e (-◆-) Crescimento celular (UFC).

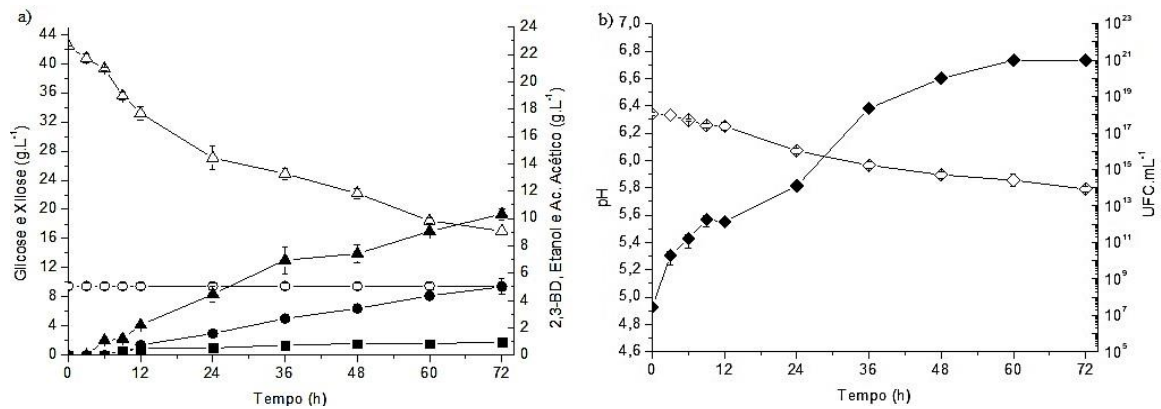


Figura 10. Ensaio fermentativo de produção de 2,3-BD em hidrolisado enzimático da casca de soja a temperatura de 37 °C com *K. pneumoniae*. Em a) Consumo de açúcares: (- Δ -) glicose e (- \circ -) xilose; e formação de produtos: (- \blacktriangle -) 2,3-butanodiol, (- \bullet -) Ácido acético e (- \blacksquare -) etanol; e em b) (- \diamond -) pH e (- \blacklozenge -) Crescimento celular (UFC).

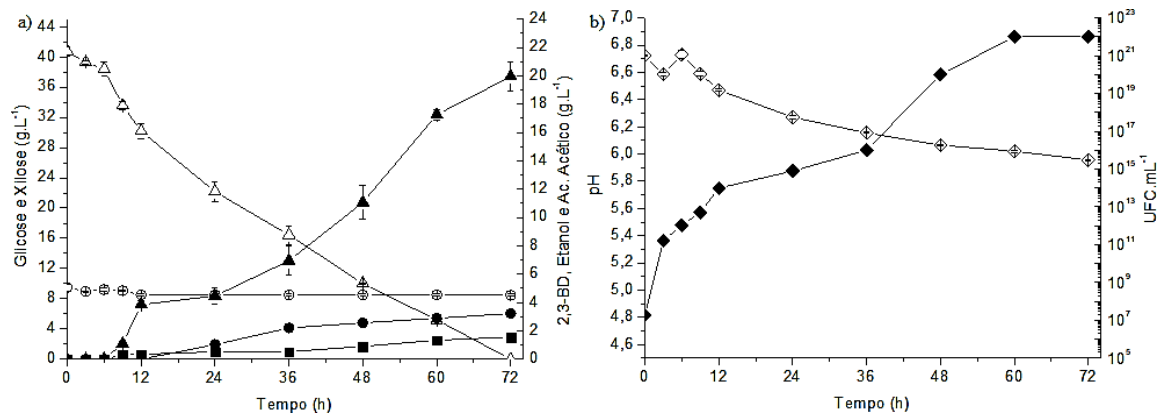


Figura 11. Ensaio fermentativo de produção de 2,3-BD em hidrolisado enzimático da casca de soja a temperatura de 30 °C com *P. agglomerans*. Em a) Consumo de açúcares: (- Δ -) glicose e (- \circ -) xilose; e formação de produtos: (- \blacktriangle -) 2,3-butanodiol, (- \bullet -) Ácido acético e (- \blacksquare -) etanol; e em b) (- \diamond -) pH e (- \blacklozenge -) Crescimento celular (UFC).

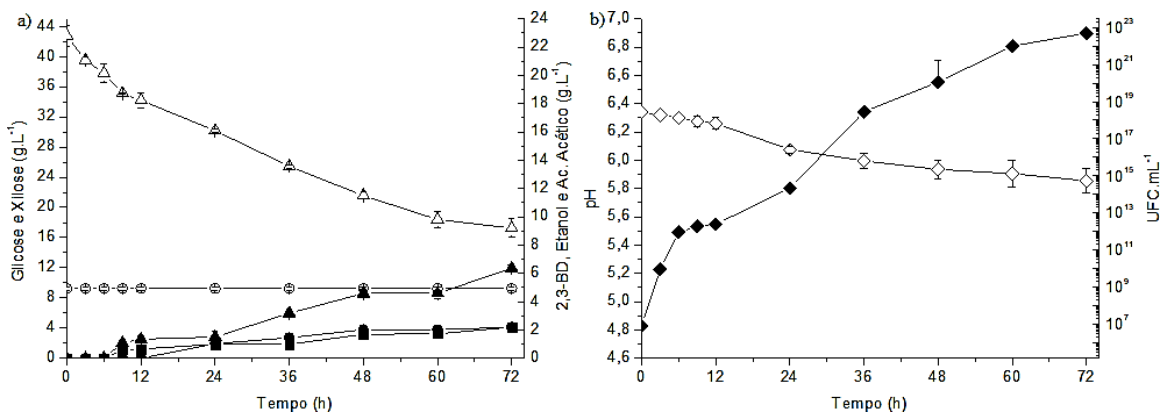


Figura 12. Ensaio fermentativo de produção de 2,3-BD em hidrolisado enzimático da casca de soja a temperatura de 37 °C com *P. agglomerans*. Em a) Consumo de açúcares: (- Δ -) glicose e (- \circ -) xilose; e formação de produtos: (- \blacktriangle -) 2,3-butanodiol, (- \bullet -) Ácido acético e (- \blacksquare -) etanol; e em b) (- \diamond -) pH e (- \blacklozenge -) Crescimento celular (UFC).

Como é possível verificar nas cinéticas apresentadas, a 30 °C a glicose é completamente consumida quando o experimento chega ao tempo final de 72 h, o que não ocorre na temperatura de 37 °C. De maneira geral a glicose é consumida de uma maneira lenta quando comparada com cinéticas de consumo de meio sintético contendo glicose, o que está relacionado ao fato relatado por Dall Cortivo (2017) e Hickert e colaboradores (2014), onde hidrolisados de casca de soja com concentrações acima de 30 g.L⁻¹ de glicose mostram pressões osmóticas elevadas atrasando a fermentação da glicose por várias leveduras. Esta mesma explicação pode ser utilizada para as bactérias utilizadas.

Uma redução drástica no consumo de açúcares foi observada nos cultivos de ambas bactérias a 37 °C. Isso possivelmente ocorre devido a uma menor solubilização do oxigênio disponível no meio, levando-se em consideração que a solubilidade desse gás diminui conforme a temperatura aumenta. Com isso, mesmo com a alta disponibilidade de glicose, o crescimento celular foi mais lento, assim como a produção de 2,3-BD foi muito menor. Além disso, o hidrolisado enzimático é um meio tamponado, o que retarda o decaimento do pH. Como a produção de 2,3-BD é maior em pH próximo a 6,0 (valor atingido apenas na fase final da fermentação), esse fator, juntamente com o efeito da temperatura, pode ter dificultado o crescimento celular, diminuindo a produção de 2,3-BD

4.4 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros para Y_{PS} e Q_P , avaliados a partir dos valores máximos de produção de 2,3-BD e quantidade consumida de açúcares totais, são mostrados nas Tabelas 6 e 7. São também mostrados nas tabelas os valores percentuais de cada açúcar consumido na fermentação e dos coprodutos formados com maior expressão, etanol e ácido acético. Em nenhum meio de cultivo ou temperatura houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as bactérias. Isso mostra que, por se tratarem de enterobactérias geneticamente muito semelhantes, realizam as rotas fermentativas também de maneira semelhante. No entanto, houve diferença significativa quanto à temperatura de cultivo para a mesma bactéria.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos da fermentação em hidrolisado ácido.

Microorganismo	Temp. (°C)	Glicose consumida (%)	Xilose consumida (%)	Arabinose consumida (%)	2,3-BD máx. (g·L ⁻¹)	Etanol máx. (g·L ⁻¹)	Ácido Acético		Q _F [g·(L·h) ⁻¹]
							máx. (g·L ⁻¹)	Y _{PS 2,3-BD} (g·g ⁻¹)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30	82,1	86,2	95,0	21,9	2,3	3,5	0,40	0,30
	37	80,5	73,9	83,6	16,2	2,1	5,1	0,41	0,22
<i>Pantoea agglomerans</i>	30	80,6	69,4	80,3	17,0	3,0	3,0	0,42	0,24
	37	82,0	70,1	88,4	18	1,5	4,7	0,44	0,25

* Valores mostraram diferenças significativas (p<0,05) quando comparados ao parâmetro da mesma bactéria no cultivo a 30 °C e a 37 °C.

Tabela 7. Parâmetros cinéticos da fermentação em hidrolisado enzimático.

Microorganismo	Temp. (°C)	Glicose consumida (%)	Xilose consumida (%)	2,3-BD máx. (g·L ⁻¹)	Etanol máx. (g·L ⁻¹)	Ácido Acético		Q _F [g·(L·h) ⁻¹]
						máx. (g·L ⁻¹)	Y _{PS 2,3-BD} (g·g ⁻¹)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30	100	26,7	20,1	3,6	4,8	0,50*	0,28*
	37	59,8	0,00	10,3	1,8	4,4	0,41*	0,14*
<i>Pantoea agglomerans</i>	30	100	10,7	19,9	2,9	3,2	0,51*	0,28*
	37	59,6	0,00	6,4	2,2	2,2	0,25*	0,09*

* Valores mostraram diferenças significativas (p<0,05) quando comparados ao parâmetro da mesma bactéria no cultivo a 30 °C e a 37 °C.

Embora nesse trabalho tenham sido utilizados hidrolisados da casca de soja, os parâmetros fermentativos foram semelhantes aos mostrados por Binotto (2016), que também utilizou *K. pneumoniae* e *P. aglomerans*, mas para fermentar soluções de açúcar (xilose e glicose) suplementadas com meio sintético.

Guragain e Vadlani (2017) compararam a fermentação por *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 em meio sintético contendo solução de glicose e xilose e em hidrolisados de várias gramíneas e madeiras, não encontrando diferenças significativas nos parâmetros fermentativos entre os meios estudados, sugerindo que o rendimento e produtividade de fermentação para 2,3-BD se utilizando hidrolisados podem ser os mesmos obtidos na fermentação de meios sintéticos.

Os maiores valores para rendimento e produtividade obtidos neste trabalho foram no cultivo em hidrolisado enzimático a 30 °C, porém não foram resultados com diferença significativa de parâmetros cinéticos entre as duas bactérias, apenas diferenças significativas entre as temperaturas de cultivo. Guragain e Vadlani (2017) obtiveram rendimento de 0,47 g.g⁻¹ e produtividade de 0,91 g.(L.h)⁻¹ utilizando glicose como substrato na fermentação realizada em biorreator aerado com 1 vvm. Já Ji et al. (2009) mostraram rendimento de 0,49 g.g⁻¹ e produtividade de 1,74 g.(L.h)⁻¹ para uma fermentação contendo glicose como fonte de carbono em modo batelada, com *Klebsiella oxytoca*. Outra bactéria produtora de 2,3-BD, *Enterobacter aerogenes*, mostrou rendimento de 0,49 g.g⁻¹ e produtividade de 1,74 g.(L.h)⁻¹ fermentando glicose no trabalho de Lee et al. (2017).

Neste trabalho, embora os rendimentos observados sejam semelhantes aos dos trabalhos descritos acima, a produtividade foi inferior. Porém, deve ser levado em conta o que foi relatado no trabalho de Hickert et al. (2014), onde os autores descrevem que os hidrolisados de casca de soja possuem altas pressões osmóticas. A pressão osmótica é diretamente relacionada com a atividade de água no meio, sendo esta inversamente proporcional à concentração de solutos no meio, ou seja, a pressão osmótica aumenta quanto maior for a concentração de açúcares do meio, afetando diretamente na produção de 2,3-BD. Em organismos como *K. pneumoniae*, relatada por possuir baixa osmotolerância, a atividade de água (ou pressão osmótica) do meio é um parâmetro de extrema importância (GARG e JAIN, 1995). Isso, juntamente com a presença de compostos tóxicos como furfural e hidroximetilfurfural, cuja presença já foi descrita em hidrolisados de casca de soja (CASSALES et al., 2011), pode ser o motivo da lenta produção de 2,3-BD em hidrolisados de casca de soja.

Os valores de Y_{PS} no hidrolisado ácido se mostraram ligeiramente inferiores aos obtidos no hidrolisado enzimático. Isso possivelmente se deve ao fato de o principal substrato

disponível no hidrolisado ácido ser principalmente pentoses, com predominância de xilose e seguida por arabinose. Neste caso, a exigência de cofatores das enzimas responsáveis pelo metabolismo das pentoses é diferente da necessária para o metabolismo da glicose. Além disso, a fermentação da xilose segue a via das pentoses fosfato, que possui um equilíbrio energético diferenciado da via glicose fosfato, o que, conseqüentemente, gera parâmetros cinéticos diferentes.

Os valores de rendimento (Y_{PS}) não diferiram significativamente ($p < 0,05$) na fermentação do hidrolisado resultante do tratamento ácido por ambas as bactérias e em ambas as temperaturas, ficando com Y_{PS} entre $0,40 \text{ g.g}^{-1}$ e $0,44 \text{ g.g}^{-1}$. O mesmo ocorreu com o fator de produtividade Q_P , o qual variou de $0,22 \text{ g.(L.h)}^{-1}$ a $0,30 \text{ g.(L.h)}^{-1}$. Apesar de a temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ já ter sido relatada na literatura como sendo a ideal para a produção de 2,3-BD por enterobactérias, neste trabalho foi observada boa resposta semelhante no hidrolisado ácido na temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os valores mostrados aqui para a fermentação do hidrolisado ácido foram semelhantes aos já mostrados na literatura para a fermentação por enterobactérias em hidrolisados, com matérias-primas e perfis de açúcares semelhantes. Grover et al. (1990), utilizaram *K. pneumoniae* para fermentar hidrolisados de madeira em agitador orbital, com um rendimento de $0,29 \text{ g.g}^{-1}$ e produtividade de $0,28 \text{ g.(L.h)}^{-1}$. Em outro estudo utilizando *K. oxytoca* para fermentar hidrolisado ácido de espiga de milho, também em agitador orbital, Cheng et al. (2010) observaram valores para rendimento de $0,5 \text{ g.g}^{-1}$ e produtividade de $0,59 \text{ g.(L.h)}^{-1}$. Com a fermentação de hidrolisado de biomassa de resíduos de arroz por *K. pneumoniae*, em método batelada, Saratale e colaboradores (2016) obtiveram rendimento de $0,38 \text{ g.g}^{-1}$ e produtividade de $0,48 \text{ g.(L.h)}^{-1}$.

A fermentação para 2,3-BD utilizada nesse trabalho pode ser otimizada utilizando-se outras técnicas de fermentação, como batelada alimentada ou biorreator contínuo. Dessa forma, pode-se controlar os níveis de aeração do meio de cultura, mantendo em níveis adequados. Os métodos controlados permitem também a manutenção dos níveis basais de açúcares como a glicose, o que poderia fornecer melhor equilíbrio dos cofatores envolvidos na produção de 2,3-BD. Essas metodologias já foram testadas em outros trabalhos na literatura (WANG et al., 2010; LI et al., 2014; MA et al., 2018) e mostraram melhorias significativas nos parâmetros de produção de 2,3-BD por enterobactérias quando comparadas com a fermentação em agitador orbital ou batelada em biorreator.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

A produção de 2,3-BD a partir dos hidrolisados, provenientes tanto do tratamento ácido quanto do tratamento enzimático da casca de soja, se mostrou viável por ambas as bactérias utilizadas neste trabalho e mostrou parâmetros de rendimento e produtividade semelhantes a outras bactérias entéricas produtoras de 2,3-BD já descritos na literatura. A capacidade dos microrganismos descritos nesse trabalho de fermentarem a xilose e a arabinose (com preferência por arabinose) presentes nos hidrolisados é um fator muito relevante, uma vez que são açúcares muito abundantes na natureza e poucos microrganismos são descritos na literatura com capacidade de fermentação dos mesmos.

No hidrolisado proveniente do tratamento ácido, as bactérias tiveram resposta bem semelhante em relação à produção de 2,3-BD em ambas as temperaturas, sem que houvesse diferença estatística significativa entre ambas as bactérias e ambas as temperaturas em tal meio. No hidrolisado enzimático, no entanto, a produção de 2,3-BD foi bem inferior na temperatura de 37 °C, sendo possivelmente afetada pelos fatores de alta pressão osmótica, baixa aeração e pH fora do ideal.

A resposta desses microrganismos nos meios utilizados é muito promissora, reiterando que os hidrolisados da casca de soja são viáveis substratos para processos fermentativos com microrganismos, devido à alta concentração de açúcares dissociados no processo de hidrólise. Espera-se obter melhores resultados para a produtividade para a produção de 2,3-BD com o uso de métodos controlados que garantam as condições ótimas para a fermentação.

6 Referências

- AFSCHAR, A. S. et al. The production of 2,3-butanediol by fermentation of high test molasses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 582–585, 1991.
- ALAM, S. et al. Kinetics of 2, 3-Butanediol Fermentation by *Bacillus amyloliquejizciens*: Effect of Initial Substrate Concentration and Aeration. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 47, p. 71–84, 1990.
- ANDRADE, C. J. DE et al. Optimizing alternative substrate for simultaneous production of surfactin and 2,3-butanediol by *Bacillus subtilis* LB5a. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 209–218, 2016.
- ANVARI, M.; KHAYATI, G. In situ recovery of 2,3-butanediol from fermentation by liquid-liquid extraction. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 313–317, 2009.
- 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.
- BIALKOWSKA, A. M. Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 12, 2016.
- BIEBL, H. et al. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 50, p. 24–29, 1998.
- BINOTTO, N. Seleção de potenciais microrganismos produtores de 2,3-butanodiol utilizando diferentes meios sintéticos. **Trabalho de Diplomação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2016.
- CANILHA, L. et al. Xylitol bioproduction from wheat straw: Process engineering and technical feasibility. **Journal of Biotechnology**, v. 136S, p. S51–S75, 2008.
- CAO, N. et al. Production of 2,3- butanediol from pretreated corn cob by *Klebsiella oxytoca* in the presence of fungal cellulase. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 63–65, p. 129–139, 1997.
- CASSALES, A. et al. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4675–4683, 2011.
- 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. et al. Improved 2,3-butanediol production from corncob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 613–616, 2010.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Avaliação da safra agrícola 2015/2016. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Brasília, 2016.

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

DALL CORTIVO, P. R. Produção de etanol e xilitol por linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* e novas espécies de *Spathaspora* a partir de hidrolisados da casca de aveia e soja. **Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente**, n. Porto Alegre, p. 49 f, 2017.

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.

DZIEWULSKI, D. M. et al. Fed-batch with biomass recycle and batch production of 2,3-butanediol from glucose by *Bacillus polymyxa*. **Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 171–180, 1986.

EMBRAPA LONDRINA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, **Embrapa Soja**, Dados Econômicos safra 2016/2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 26 nov. 2017.

FRAZER, F. R.; MCCASKEY, T. A. Effect of components of acid- hydrolysed hardwood on conversion of *Klebsiella pneumoniae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, p. 110–115, 1991.

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

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

GOTTSCHALK, G. **Bacterial metabolism**, Neew York, 1986.

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

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, n. May, p. 25–34, 2017.

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

HERNÁNDEZ-MONTALVO, V. et al. Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1–2, p. 186–191, 2001.

HICKERT, L. R. et al. Fermentation kinetics of acid – enzymatic soybean hull hydrolysate in immobilized-cell bioreactors of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehatae*, *Spathaspora arborariae*, and their co-cultivations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 88, p. 61–67, 2014.

HOLM, J.; LASSI, U. Ionic liquids in the pretreatment of lignocellulosic biomass, In: A. Kokorin (ed.) **Ionic Liquids: Applications and Perspectives**, InTech publishing, n 24, p. 545-560.

HON-NAMI, K. A unique feature of hydrogen recovery in endogenous starch-to-alcohol fermentation of the marine microalga, *Chlamydomonas perigranulata*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 131, n. 1–3, p. 808–28, 2006.

Ji, X. J. et al. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3410–3414, 2009a.

Ji, X. J. et al. Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2, 3-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde dehydrogenase gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1751–1758, 2010.

Ji, X. J. et al. Elimination of carbon catabolite repression in *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,3-butanediol production from glucose-xylose mixtures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 1119–1125, 2011.

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.

JUNG, M. Y. et al. 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.

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, J.; YUN, S. Discovery of Cellulose as a Smart Material. **Macromolecules**, v. 39, p. 4202–4206, 2006.

LARSSON, S. et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3–4, p. 151–159, 1999.

LASER, M. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, n. 1, p. 33–44, 2002.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 1–24, 1997.

LEE, S. J. et al. Process strategy for 2,3-butanediol production in fed-batch culture by acetate addition. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, p. 6–11, 2017.

LI, D.; DAI, J. Y.; XIU, Z. L. A novel strategy for integrated utilization of Jerusalem artichoke stalk and tuber for production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8342–8347, 2010a.

LI, L. et al. Efficient production of 2,3-butanediol from corn stover hydrolysate by using a thermophilic *Bacillus licheniformis* strain. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 256–261, 2014.

- LI, Y. et al. Separating 2,3-butanediol from fermentation broth using n-butylaldehyde. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 20, p. S495–S502, 2016.
- MA, C. et al. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 1, p. 49–57, 2009.
- MA, K. et al. Improvement of (R, R)-2,3-butanediol production from corn stover hydrolysate by cell recycling continuous fermentation. **Chemical Engineering Journal**, v. 332, n. July 2017, p. 361–369, 2018.
- MADDOX, I. S. Microbial production of 2,3-butanediol. **Biotechnology: Products of primary metabolism**, v. 6, p. 269–291, 1996.
- MAGEE, R.; KOSARIC, N. The microbial production of 2, 3-butanediol. **Advances in Applied Microbiology**, v. 32, p. 89–161, 1987.
- MALLONEET, 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.
- MARGEOT, A. et al. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 372–380, 2009.
- MCCALL, K. B.; GEORGI, C. E. The production of 2,3-butanediol by fermentation of sugar beet molasses. **Applied microbiology**, v. 2, n. 6, p. 355–359, 1954.
- MOES, J. et al. A microbial culture with oxygen sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 482–489, 1985.
- MOTWANI, M. et al. Microbial-Production of 2,3-Butanediol from Water Hyacinth. **Bioresource Technology**, v. 44, n. 3, p. 187–195, 1993.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n. 3, p. 268–274, 2006.
- NAKASHIMADA, Y. et al. 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.
- NILEGAONKAR, S.; BHOSALE, S.; KSHIRSAGAR, D. Production of 2,3-butanediol from glucose by *Bacillus licheniformis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 378–381, 1992.
- 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. 23–31, 2017.
- PEREGO, P. et al. 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: Selection of the optimal conditions and application to food industry residues. **Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 6, p. 613–620, 2000.
- PETROV, K.; PETROVA, P. High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 4, p. 659–665, 2009.

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

QIN, J. et al. Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* using glucose and ammonium phosphate. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 1, p. 132–136, 2006.

QURESHI, N.; CHERYAN, M. Production of 2, 3-butanediol by *Klebsiella oxytoca*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 440–443, 1989b.

ROBERTO, I. C.; MUSSATTO, S. I.; RODRIGUES, R. C. L. B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v. 17, n. 3, p. 171–176, 2003.

ROSSI, D. M. et al. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 8, p. 4814–4819, 2011.

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

SADDLER, J. N.; YU, E. K. C.; MES HARTREE, M. Utilization of enzymatically hydrolyzed wood hemicelluloses by microorganisms for production of liquid fuels. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 153–160, 1983.

SAHA, B.; BOTHAST, R. Production of 2, 3 • butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 10531643, 1999.

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

SONG, Y. et al. Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* from enzymatic hydrolyzate of sugarcane bagasse. **BioResources**, v. 7, n. 4, p. 4517–4530, 2012.

SUN, L.-H.; JIANG, B.; XIU, Z.-L. Aqueous two-phase extraction of 2,3-butanediol from fermentation broths using an ethanol/ammonium sulfate system. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 371–376, 2009.

SUN, L. H. et al. Microbial production of 2,3-butanediol from Jerusalem artichoke tubers by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 847–852, 2009b.

UM, J. et al. Metabolic engineering of *Enterobacter aerogenes* for 2,3-butanediol production from sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, 2017.

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

VOLOCH, M. et al. 2,3-Butanediol. **Comprehensive biotechnology; the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**, p. 933–944, 1985.

WANG, A. et al. Production of 2,3-butanediol from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 965–970, 2010.

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

YAN, L. et al. Dilute sulfuric acid cycle spray flow-through pretreatment of corn stover for enhancement of sugar recovery. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 5, p. 1803–1808, 2009.

YU, E. K. C.; CHAN, M. K. H.; SADDLER, J. N. Butanediol production from lignocellulosic substrates by *Klebsiella pneumoniae* grown in sequential co-culture with *Clostridium thermocellum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 399–404, 1985.

YU, E. K. C.; LEVITIN, N.; SADDLER, J. N. Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on acid hydrolyzed wood hemicellulose. **Biotechnology Letters**, v. 4, n. 11, p. 741–746, 1982.

YU, E. K. C.; SADDLER, J. N. Enhanced production of pneumoniae grown on high sugar concentrations in the presence of acetic acid enhanced production of 2, 3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high sugar concentrations in the presence of acetic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 777–784, 1982.

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

ZENG, A.; BIEBL, H.; DECKWER, W. Production of 2, 3-butanediol in a membrane bioreactor with cell recycle. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 463–468, 1991.

ZHANG, L. et al. Microbial production of 2,3-butanediol by a surfactant (serrawettin)-deficient mutant of *Serratia marcescens* H30. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 857–862, 2010a.

ZHANG, L. et al. Microbial production of 2,3-butanediol by a mutagenized strain of *Serratia marcescens* H30. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1961–1967, 2010b.

ANEXO 1

Enzima utilizada para produção do hidrolisado enzimático

**Celluclast® 1.5 L****Valid From** 2009-03-09**Product Characteristics:**

Declared Enzyme	Cellulase
Declared Activity	700 EGU/g
Colour	Brown Colour can vary from batch to batch. Colour intensity is not an indication of enzyme activity.
Physical form	Liquid
Approximate Density (g/ml)	1.22
Stabilisers	Sodium chloride Sorbitol
Preservatives	Potassium sorbate
Odour	Slight fermentation odour
Production organism	Trichoderma reesei
Production Method	Produced by submerged fermentation of a micro organism. The enzyme protein is separated and purified from the production organism.

Product Specification:

	Lower Limit	Upper Limit	Unit
Beta-glucanase Units EGU	700		/g
Total Viable Count	-	50000	/g
Coliform Bacteria	-	30	/g
Enteropathogenic E.Coli	Not Detected		/25 g
Salmonella	Not Detected		/25 g

Packaging: See the standard packaging list for more information.**Recommended Storage:**

Best before	When stored as recommended, the product is best used within 18 months from date of delivery.
Storage at customer's warehouse	0-25°C (32°F-77°F)
Storage Conditions	In unbroken packaging - dry and protected from the sun. The product has been formulated for optimal stability. Extended storage or adverse conditions such as higher temperature or higher humidity may lead to a higher dosage requirement.

Safety and Handling Precautions

Enzymes are proteins. Inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitized individuals. Some enzymes may irritate the skin, eyes and mucous membranes upon prolonged contact. The product may create easily inhaled aerosols if splashed or vigorously stirred. Spilled product may dry out and create dust. Spilled material should be flushed away with water. Avoid splashing. Left over material may dry out and create dust. Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection as prescribed on the warning label. Wash contaminated clothes. A Material Safety Data Sheet is supplied with all products. See the Safety Manual for further information regarding how to handle the product safely.