



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



Seleção de potenciais microrganismos produtores de 2,3-butanodiol utilizando diferentes meios sintéticos

*Autor: Natana Binotto*

*Orientador: Daniele Misturini Rossi*

*Co-orientador: Lílian Hickert da Cruz*

Porto Alegre, julho de 16

## Sumário

1	Introdução.....	1
2	Revisão Bibliográfica.....	3
2.1	2,3-Butandiol.....	3
2.2	Principais microrganismos produtores de 2,3-BD.....	4
2.3	Rotas Metabólicas.....	6
2.4	Condições de operação para a produção de 2,3-BD.....	8
2.4.1	Aeração.....	8
2.4.2	Potencial Hidrognênico (pH).....	10
2.4.3	Temperatura.....	11
2.4.4	Substratos e concentração de substrato.....	12
3	Materiais e Métodos.....	14
3.1	Microrganismo.....	14
3.2	Meio de Cultivo.....	15
3.3	Inóculo.....	15
3.4	Ensaio de Fermentação.....	16
3.5	Métodos Analíticos.....	16
3.5.1	Concentração de Açúcares e 2,3-BD.....	16
3.5.2	Medidas de pH.....	17
3.5.3	Crescimento Celular.....	17
3.6	Determinação dos Parâmetros Cinéticos.....	17
3.7	Análise estatística dos dados.....	18
4	Resultados e Discussão.....	19
4.1	Microrganismos Potencialmente Produtores de 2,3 BD.....	19
4.2	Ensaio de Fermentação.....	20
4.2.1	Crescimento Celular.....	21
4.2.2	Ensaio com Glicose.....	22
4.2.3	Ensaio com Xilose.....	25
5	Conclusão e trabalhos futuros.....	28
6	Referências.....	29

## **Agradecimentos**

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

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

À minha orientadora Daniele Misturini Rossi, pela confiança, dedicação e oportunidade única e à minha co-orientadora Lílian Hickert da Cruz, por todos os ensinamentos, auxílio, apoio e dedicação.

Ao pessoal do BiotecLab pelo auxílio nos momentos em que precisei.

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

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

## Resumo

O álcool 2,3-butanodiol (2,3-BD) apresenta extensa aplicação industrial, podendo ser destinado tanto para processos industriais, tais como nas indústrias de polímeros, de tintas de impressão, de perfumes, de explosivos e de plastificantes, quanto para a obtenção de outros produtos químicos, tais como metil-etil-cetona, 1,3-butadieno e diacetil. A produção de 2,3-BD pode ocorrer por processos puramente químicos como por processos biotecnológicos. No entanto, o interesse pela obtenção desse álcool por via biológica, a partir de fontes de carbono renováveis como matéria-prima, tem crescido muito devido aos problemas político-econômicos do uso do petróleo, bem como à necessidade de implementação de gestão mais sustentável de resíduos. Nesse contexto, a otimização da produção de 2,3-BD por bactérias se faz necessária. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de produção de 2,3-BD a partir de diferentes fontes de carbono e linhagens de microrganismos, além de avaliar os parâmetros cinéticos de crescimento celular e a variação do pH. Partiu-se de 14 linhagens de microrganismos e em uma pré-seleção, 6 linhagens destacaram-se como potenciais produtoras de 2,3-butanodiol em meios sintéticos formulados com glicose ou xilose. Pode-se observar que a cinética de crescimento foi mais rápida quando as bactérias estavam em um meio com glicose como fonte de carbono, resultando em uma maior produção de 2,3-BD. A linhagem 31 foi a maior produtora desse álcool quando a fonte de carbono utilizada foi xilose, produzindo  $5,7 \text{ g.L}^{-1}$  ao longo de 24 horas de fermentação (apêndice B). Já a linhagem 33 foi a maior produtora de 2,3-BD quando o meio continha glicose como fonte de carbono, sintetizando  $9,50 \text{ g.L}^{-1}$  durante 24 horas (apêndice A),  $0,72 \text{ g.L}^{-1}$  a mais do que a linhagem 31 no mesmo meio.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Estereoisômeros do 2,3 butanodiol (2,3-BD).....	3
<b>Figura 2</b> - Via de fermentação ácido-mista para a produção de 2,3-butanol.....	7
<b>Figura 3</b> - Influência da disponibilidade de oxigênio na síntese de produtos em <i>B. polymyxa</i> .....	9
<b>Figura 4</b> - Produção de 2,3 BD por diferentes linhagens de bactérias.....	19
<b>Figura 5</b> - Cinética de crescimento celular utilizando glicose como fonte de carbono. Em a) são apresentadas as 3 linhagens com maior crescimento e em b) as linhagens com crescimento menos expressivo.....	20
<b>Figura 6</b> - Cinética de crescimento celular utilizando xilose como fonte de carbono. Em a) são apresentadas as 3 linhagens com maior crescimento e em b) as linhagens com crescimento menos expressivo.....	21
<b>Figura 7</b> - Produção de 2,3-butanol, consumo de glicose e variação do pH em um intervalo de 24 horas. (-■-) Glicose, (-●-) pH e (-▲-) 2,3-butanol. As letras correspondem aos diferentes microrganismos e estão organizadas em ordem decrescente de produção de 2,3-BD.a) 33, b) 1, c) 31, d) 5, e) 24 e f) 15.....	22
<b>Figura 8</b> - Produção de 2,3-butanol, consumo de xilose e variação do pH em um intervalo de 24 horas. (-■-) Xilose, (-●-) pH e (-▲-) 2,3-butanol. As letras correspondem aos diferentes microrganismos e estão organizadas em ordem decrescente de produção do álcool a) 31, b) 1, c) 33, d) 5, e) 15 e f) 24.....	24

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Produção de diferentes isômeros de 2,3-butanodiol a partir de diferentes espécies bacterianas (JI; HUANG; OUYANG, 2011).....	6
<b>Tabela 2:</b> Composição do meio de manutenção das linhagens utilizadas.....	14
<b>Tabela 3:</b> Composição do meio sintético usado nos ensaios de fermentação.....	14
<b>Tabela 4:</b> Parâmetros de cinética de crescimento, consumo de glicose e produtividade para os 6 microrganismos testados.....	23
<b>Tabela 5:</b> Parâmetros de cinética de crescimento, consumo de glicose e produtividade para os 6 microrganismos testados.....	25

---

## **Lista de Símbolos**

## Lista de Abreviaturas e Siglas

2,3-BD – 2,3-butanodiol

D(-) – isômero dextrogiro

L(+) – isômero levogiro

1,3-PD – 1,3-propanodiol

$\alpha$ -ALS –  $\alpha$ -acetolactato sintase

$\alpha$ -ALD -  $\alpha$ -acetolactato desidrogenase

DAR – diacetil redutase

AR – acetoína redutase

LDH – L-/D-lactato desidrogenase

pH – potencial hidrogeniônico

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

$Y_{X/S}$  – conversão de substrato a biomassa

MEK – metil-etil-cetona

PUMAs – poliuretano-maleimidas

O<sub>2</sub> – gás oxigênio

DO – densidade ótica

## 1 Introdução

2,3-Butanodiol (2,3-BD) é um exemplo de produto químico que pode ser produzido por via biotecnológica. O interesse em 2,3-BD começou em 1906, quando Harden e Walpole empregaram *Klebsiella pneumoniae* para produzir este composto. Donker (1926), também investigou a produção de 2,3-BD usando *Bacillus polymyxa*. O início de conversão de biomassa em 2,3-BD remonta aos tempos de guerra, quando fermentações em escala piloto com *Klebsiella oxytoca* e *B. polymyxa* eram realizadas (BLACKWOOD et al., 1949; LEDINGHAM e NEISH, 1954). Entretanto, essas bactérias são consideradas microrganismos pertencentes à classe de risco 2, ou seja, podem apresentar certa patogenicidade, que é um fator indesejável para a utilização dessas bactérias para a produção industrial de 2,3-BD. Desse modo, pesquisas na área de obtenção de novos microrganismos produtores de 2,3-BD pertencentes à classe 1 se fazem necessárias. Mesmo havendo relatos desses microrganismos como produtores de 2,3-BD, o rendimento obtido pela maioria dessas espécies é muito baixo, de modo que seu emprego não é economicamente viável. No entanto, melhorias na produção foram abandonadas desde que as rotas à base de petróleo se tornaram disponíveis e mais baratas.

Diante da escassez de fontes de combustíveis fósseis e o aumento dos preços do petróleo, a ideia de compostos químicos de base biológica e biorrefinarias está recebendo interesse significativo (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; ZVEREV et al., 2006). A fermentação do excesso de biomassa a partir de resíduos agroindustriais para a produção de produtos químicos ou de energia ganhou atenção considerável devido à futura escassez de combustíveis tradicionais, bem como a necessidade de uma gestão mais racional das fontes de alimentação humana e animal. Deste modo, o objetivo geral desse trabalho está centrado na obtenção de um microrganismo que possa converter D-glicose e xilose (fontes de carbono presente nos resíduos agroindustriais) em 2,3-BD. Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- Avaliar diferentes microrganismos isolados de um consórcio ambiental para a produção de 2,3-BD;

2 Seleção de potenciais microrganismos produtores de 2,3-butanodiol utilizando diferentes meios sintéticos

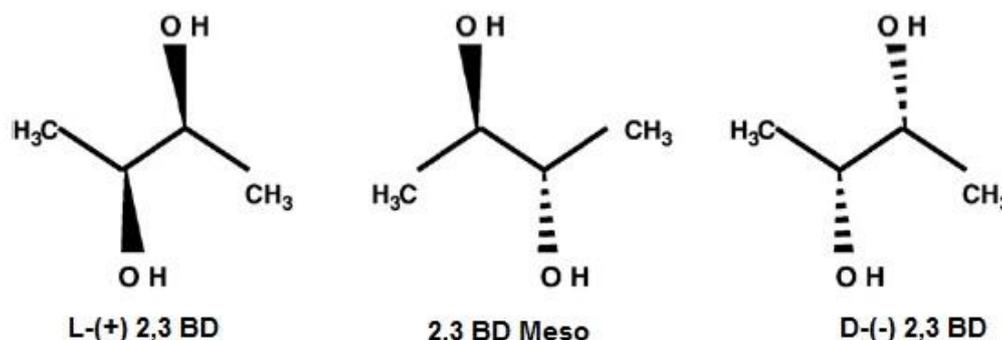
---

- Selecionar, através de meios sintéticos, potenciais produtores de 2,3-BD;
- Avaliar a cinética de crescimento celular dos potenciais produtores de 2,3-BD e a variação do pH ao longo do cultivo.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 2,3-Butandiol

2,3-BD é também conhecido como 2,3-butilenoglicol, dimetileno glicol e o seu nome IUPAC é butano-2,3-diol. O seu peso molecular é 90,121 g.mol<sup>-1</sup> e sua fórmula molecular é C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>. 2,3-BD pode existir em 3 formas isoméricas: D - (-) - , L - (+) - e meso (Fig. 1). Os pontos de ebulição dos três estereoisômeros são ligeiramente diferentes, variando 177-182 °C, mas ainda, todos são muito mais elevados do que o ponto de ebulição da água. Assim, uma grande quantidade de água tem de ser evaporada devido à destilação durante a recuperação do 2,3-BD a partir do caldo de fermentação (VOLOCH et al., 1985). É por isso que métodos alternativos de recuperação 2,3-BD estão sendo desenvolvidos (ANVARI e KHAYATI, 2009; SUN et al, 2009a; XIU e ZENG, 2008).



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

Uma de suas possíveis aplicações é a sua conversão para 1,3-butadieno, utilizado na produção da borracha sintética. Devido ao seu baixo ponto de congelamento (solidificação) de -60 °C, 2,3-BD é usado como um agente anti-congelante (SOLTYS et al., 2001). Além disso, este composto ou seus derivados têm encontrado aplicação em plásticos e na produção de solvente. O produto de desidrogenação do 2,3-BD, diacetil, pode servir como um agente aromatizante altamente valorizado em produtos alimentares, dando um gosto amanteigado (BARTOWSKI e HENSCHKE, 2004). Diacetil é também um aditivo alimentar antimicrobiano, uma vez que inibe o crescimento de alguns microrganismos. A desidratação de 2,3-BD resulta em metil-etil-cetona (MEK; butan-2-ona), que é um eficaz aditivo de combustível tendo um calor de combustão mais elevado. MEK também pode ser utilizado como um solvente para a produção de resinas. O valor

calorífico de 2,3-BD (27198 J.g<sup>-1</sup>) se compara favoravelmente com outros combustíveis líquidos, por exemplo, metanol (22081 J.g<sup>-1</sup>) e etanol (29,055 J.g<sup>-1</sup>) (FLICKINGER, 1980).

A mistura equimolar de etanol e 2,3-BD pode fornecer um valor combinado de aquecimento de 27660 J.g<sup>-1</sup>, de modo que a presença de etanol não afeta a utilidade de 2,3-BD para esta aplicação (YU e SADDLER, 1982b). Poliuretano-melamides (PUMAs), sintetizado por esterificação de 2,3-BD com ácido maléico, pode ser útil em aplicações cardiovasculares (PETRINI et al., 1999). Outros produtos provenientes da esterificação do 2,3-BD são utilizados principalmente na indústria farmacêutica e no ramo de cosméticos.

Também foi demonstrado que o 2,3-butanodiol tem potencial aplicação nas indústrias de polímeros, de tintas de impressão, de perfumes, de explosivos, de plastificantes e como transportadores de fármacos (GARG e JAIN, 1995). Ademais, 2,3-BD é um composto biodegradável, ganhando grande destaque do ponto de vista ecológico, podendo ser utilizado para a fabricação de produtos menos agressivos ao meio ambiente (BERBERT-MOLINA, 1995). No ano de 2001, a fabricação de 2,3-BD cresceu a uma taxa de 4 a 7 % devido ao aumento da demanda por produtos obtidos a partir desse precursor (SYU, 2001).

## 2.2 Principais microrganismos produtores de 2,3-BD

Muitas espécies de bactérias podem fermentar o piruvato em 2,3-BD. Dados experimentais comprovam a presença de 2,3-BD em vias metabólicas (em toda ou em parte delas) nos seguintes grupos taxonômicos: *Aeromonas hydrophyla*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus brevis* S1, *Corynebacterium glutamicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis subsp. lactis* bv. *diacetylactis*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus pentosaceus*, *Raoultella terrigena*, *Serratia marcescens* (CASPI, 2008), *B. polymyxa* (HESPELL, 1996; MALLONEE e SPECKMAN, 1988; NAKASHIMADA et al., 2000), *Klebsiella terrigena* (BLOMQVIST et al., 1993; MAYER et al., 1995), *Streptococcus faecalis* (SPECKMAN e COLLINS, 1982), *Enterobacter cloacae* (SAHA e BOTHAST, 1999), *Bacillus licheniformis* (PEREGO et al., 2000), *Bacillus amyloliquefaciens* (ALAM et al., 1990), *Aerobacter*

*indologenes* (MICKELSON e WERKMAN, 1938), *rhizobacterium Pseudomonas chlororaphis* O6 (CHO et al., 2008) e a microalga marinha, *Chlamydomonas perigranulata* (HON-NAMI, 2006).

Várias leveduras têm a capacidade para sintetizar 2,3-BD, embora a produtividade seja extremamente baixa, e, por conseguinte, as bactérias são os únicos organismos de importância industrial na fermentação (GARG e JAIN, 1995). As principais características das bactérias citadas acima, que lhe conferem interesse industrial, são a estabilidade genética (LONG e PATRICK, 1963), evitando problemas de degeneração por sucessivas repicagens; flexibilidade quanto a utilização de diferentes substratos para a fermentação, sendo capazes de metabolizar vários açúcares.

As espécies mais eficientes na produção de 2,3-BD são *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *B. polymyxa*. *E. aerogenes* é considerado um microrganismo promissor para esta aplicação. Sob condições estritamente anaeróbicas, produz preferencialmente hidrogênio, mas quando cultivado sob microaerofilia, ele se transforma em um produtor de 2,3-BD, muito semelhante à *K. oxytoca* (PEREGO et al., 2000).

*Klebsiella* sp. consegue metabolizar um amplo espectro de substratos (incluindo glicose, manose, galactose, xilose, arabinose, celobiose e lactose). Este gênero é amplamente distribuído na natureza e estável em ampla gama de condições ambientais, embora os microrganismos deste gênero sejam osmosensitivos. A cepa GT1 de *Klebsiella pneumoniae* é capaz de converter o glicerol em 2,3-BD em condições de microaerofilia e baixo pH, através da redução do 1,3 propanodiol (BIEBL et al., 1998).

Segundo CELIŃSKA e GRAJEK (2009), é importante notar que os principais microrganismos produtores de 2,3-BD (*Klebsiella* spp. e *E. aerogenes*) são considerados patogênicos. A fermentação em escala industrial exige obediência de normas de segurança, implicando em uma não conformidade no emprego dessas bactérias. Portanto, a necessidade urgente de microrganismos 'seguros' é pronunciada.

Outro aspecto importante a ser considerado é a relação direta entre a espécie utilizada e o isômero de 2,3-butanodiol sintetizado. Diferentes microrganismos

produzem diferentes isômeros, mas normalmente uma mistura de dois isômeros é formada (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009). Espécies de *Klebsiella* e *Enterobacter* são membros da família Enterobacteriaceae, de forma que, geralmente, produzem os isômeros dextrógiros e meso. As espécies de *Bacillus*, por outro lado, tendem a produzir as formas isoméricas levógiros e meso. *Paenibacillus polymyxa* é uma das poucas espécies que apenas produz o levo-isômero sob fermentação anaeróbica. Demais microrganismos são apresentados na tabela 1.

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

Espécie	Estereoisômero formado	Substrato	Método	Produção (g.L <sup>-1</sup> )	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Rendimento (g.g <sup>-1</sup> )	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	NILEGAONK AR 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)

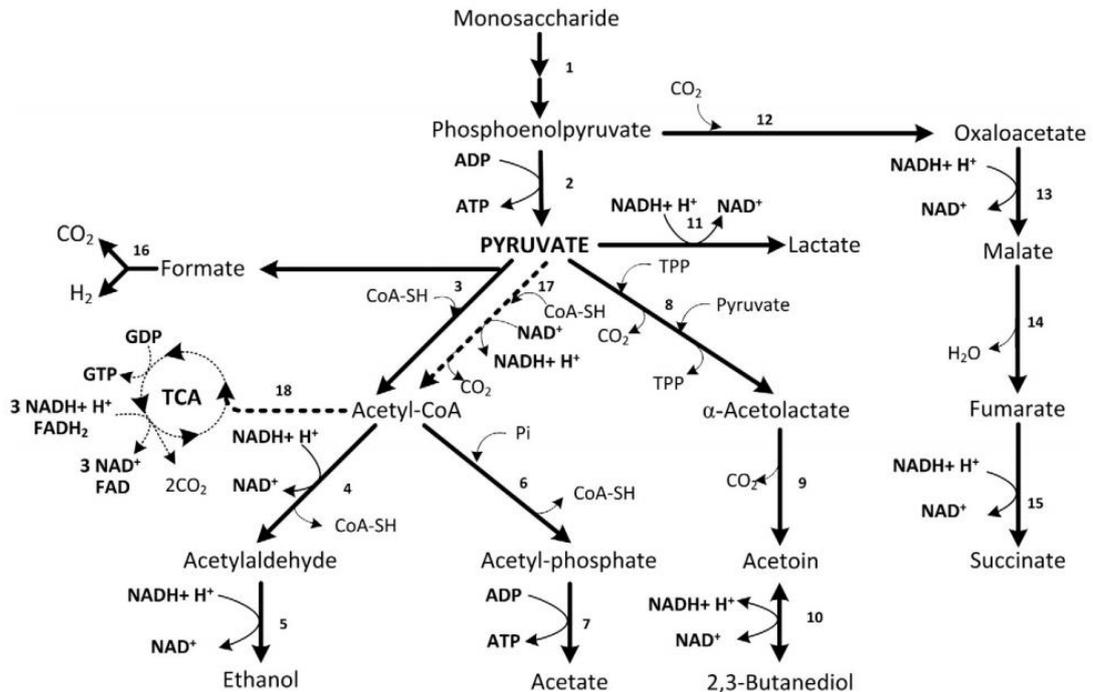
### 2.3 Rotas Metabólicas

2,3-BD é produzido a partir de piruvato em um processo de fermentação ácido-mista via vários compostos intermediários, incluindo  $\alpha$ -acetolactato, acetoína e diacetil (Fig. 2) (CASPI, 2008). Além de 2,3-BD, outros produtos também são sintetizados, como o etanol, acetato, lactato e succinato, dependendo do microrganismo e condições aplicadas.

Após a etapa de glicólise, o piruvato pode ser convertido tanto em lactato em uma reação que requer NADH (catalisada por L-/D-lactato desidrogenada, LDH) ou em  $\alpha$ -acetolactato (catalisada por  $\alpha$ -acetolactato sintase;  $\alpha$ -ALS).  $\alpha$ -acetolactato é majoritariamente produzido sob baixas quantidades de NADH.

Subsequentemente,  $\alpha$ -acetolactato é convertido em acetoína pela  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase ( $\alpha$ -ALD), e isso ocorre em condições anaeróbicas. Na presença de oxigênio,  $\alpha$ -acetolactato espontaneamente pode sofrer descarboxilação e gerar diacetil. Então a diacetil redutase (DAR) converte o diacetil em acetoína. Finalmente a acetoína redutase (AR) reduz a acetoína em 2,3-BD. Já foi observado que em condições de baixo pH, o acetato (isto é, ácido acético) é um indutor eficiente dessas 3 enzimas envolvidas nas rotas de fermentação do 2,3-BD (BRYN et al.,1973; STORMES, 1968b). Todas as enzimas e componentes produzidos na rota de formação do 2,3-BD são normalmente produzidos durante a fase *lag* e estacionária de crescimento celular, quando o oxigênio é limitante (MALONEE e SPECKMAN, 1988).

A rota fermentativa do 2,3-BD, como em outras rotas fermentativas, tem a função de regular a razão de NADH/NAD<sup>+</sup> 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.



**Figura 2** – Via de fermentação ácido-mista para a produção de 2,3-butanodiol. 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  $\alpha$ -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 -  $\alpha$ - acetolactato sintase;

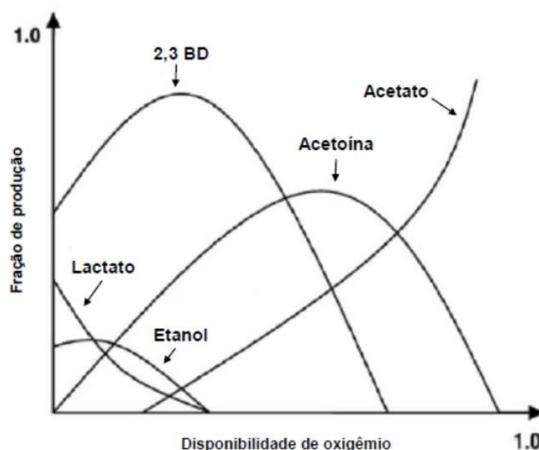
9 -  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase; 10 – acetoína redutase (2,3-butanodiol desidrogenase); 11 – lactato desidrogenase; 12 – fosfoenolpiruvato descarboxilase; 13 – malato desidrogenase; 14 – fumarase; 15 – succinato desidrogenase; 16 – complexo formato-hidrogênio-liase; 17 – complexo multi-enzimático piruvato desidrogenase e 18 – citroil sintetase (JI, HUANG e OUYANG, 2011).

## 2.4 Condições de operação para a produção de 2,3-BD

### 2.4.1 Aeração

O suprimento de oxigênio é a variável mais importante no processo de fermentação de 2,3-BD. Sob limitação de  $O_2$ , 2,3-BD é produzido, e como tal, é um exemplo clássico de fermentação microaeróbia (CONVERTI et al., 2003). Apesar de o 2,3-BD ser um produto do metabolismo anaeróbio, foi demonstrado que a aeração aumentou a produção de 2,3-BD por *Klebsiella pneumoniae* (LEDINGHAM e NEISH, 1954). Entretanto, o aumento excessivo do suprimento de oxigênio favorece a formação de massa celular e gás carbônico em detrimento da produção de 2,3-BD (JANSEN et al., 1984). O 2,3-BD é formado, então, sob limitação de oxigênio e, conseqüentemente, sua produção é diminuída com o aumento da aeração do meio, embora o declínio do fornecimento de oxigênio possa diminuir também a taxa de conversão total, devido a concentrações celulares mais baixas (SABLAYROLLES e GOMA, 1984).

Essa contradição entre o fornecimento de oxigênio e produção de 2,3-BD foi explicada por Voloch e colaboradores (1985). Primeiro, deve-se considerar que a maioria dos estudos realizados sobre a produção de 2,3-BD emprega bactérias das espécies *Klebsiella* e *Bacillus*, ambas anaeróbias facultativas, de modo que podem obter energia por duas vias diferentes: respiração e fermentação. Quando o fornecimento de  $O_2$  é limitado, 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. Este é o resultado de uma relação direta entre a produtividade volumétrica de 2,3-BD e da concentração de biomassa. A proporção entre a oferta gás oxigênio e o rendimento de 2,3-BD bem como de outros subprodutos pode ser analisada na Figura 3.



**Figura 3** - Influência da disponibilidade de oxigênio na síntese de produtos em *B. polymyxa* (modificado de DE MAS et al., 1988).

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

A aeração é mutuamente associada com agitação. A ação de agitação é particularmente importante nos processos de fermentação, uma vez que aumenta a eficiência da fermentação, expondo continuamente novo substrato à cultura e disseminação dos metabólitos e produtos finais em todo o meio (GARG e JAIN, 1995; LONG e PATRICK, 1963).

Outra correlação interessante em relação ao suprimento de oxigênio e produção de 2,3-BD refere-se a pureza óptica dos isômeros. Nakashimada, Kanai e Nishio, (1998) demonstraram que a pureza óptica do 2,3-BD produzido por *Paenibacillus polymyxa* diminuiu significativamente com o aumento da aeração

durante o processo fermentativo. Com o aumento da disponibilidade de oxigênio, mais quantidade do isômero meso foi produzido. A taxa de transferência de oxigênio ótima foi avaliada em  $6,7 \text{ mmol}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , mas a pureza óptica da forma isomérica (R,R)-2,3-BD decaiu de 98 % para 93 %, quando comparada com a produção sob condições anaeróbicas.

#### 2.4.2 Potencial Hidrogeniônico (pH)

O segundo fator que mais influencia na produção de 2,3-BD é o potencial hidrogeniônico (pH). De acordo com Garg e Jain (1995), condições alcalinas favorecem a formação de ácidos orgânicos e uma redução simultânea no rendimento de 2,3-BD. Contrariamente a esta, sob condições ácidas, a síntese do ácido orgânico é reduzida (mais de 10 vezes) e a do diol é aumentada (3-7 vezes). No entanto, o pH ótimo para a produção de diol depende fortemente do microrganismo e substrato utilizado.

A maioria dos processos de fermentação anaeróbica ocorre com a formação de ácidos orgânicos. Assim, no decorrer da fermentação, a cultura acidifica e a concentração de formas tóxicas não dissociadas dos ácidos aumentam. Crescimento e volume de substrato gradualmente cessam e a cultura está finalmente inativada pelos seus próprios produtos (BIEBL et al., 1998). Alguns microrganismos desenvolveram estratégias defensivas, como mudar o metabolismo para a síntese de compostos menos tóxicos, tais como álcoois ou glicóis (VAN HOUDT et al., 2007). Maddox (1996) postulou que a indução da via de produção de 2,3-BD é causada pelo acúmulo de produtos ácidos ao invés de alteração do pH interno. O gradiente de pH transmembrana faz com que se acumule acetato no meio, o qual irá induzir as enzimas envolvidas na síntese de 2,3-BD. A redução do pH da cultura provoca um aumento do gradiente de pH e a produção de 2,3-BD ocorre antes de o pH externo se tornar demasiado elevado e a cultura é inativada.

Este fenômeno foi observado em *Klebsiella sp.* Em pH neutro esta bactéria sintetiza ácido acético e etanol, mas abaixo de pH 6,0; 2,3-BD e etanol são produzidos (BIEBL et al., 1998). Os estudos de Biebl et al. (1998), mostraram que se o pH da cultura é fixo (neste experimento, pH 5,0 ou, alternativamente, pH 7,0) quanto mais baixo for o pH, maior a concentração final 2,3-BD. No entanto, a

maior quantidade de 2,3-BD foi obtida quando o pH não foi controlado (mudou continuamente a partir do valor 7,0 de pH inicial para o valor de pH final de 5.5). O que é extremamente importante aqui é que os autores sugeriram que não é o pH como tal, que provoca a mudança para a síntese do álcool, mas a presença de ácido acético. No entanto, eles também afirmaram, que o acúmulo de ácido não é o único fator que determina a formação de 2,3-BD, uma vez que também é produzido a um pH neutro sob excesso de glicerol (BIEBL et al., 1998).

#### 2.4.3 Temperatura

A eficiência de bioprocessos é estritamente dependente da temperatura em virtude da forte dependência da atividade enzimática e manutenção celular com a temperatura (GARG e JAIN, 1995). Celińska e Grajek (2009) afirmam que em geral, o intervalo de temperatura de 30-35 °C deve ser ótimo para a fermentação bacteriana, uma vez que este é o intervalo de rendimento máximo de biomassa. Dentro desta faixa de temperatura, alterando-se as condições de aerobiose para microaerofilia, em vez de biomassa, produtos de fermentação seriam obtidos. Acima da temperatura ótima, a degradação celular provavelmente se torna dominante sobre o crescimento. Por outro lado, abaixo da temperatura ótima, a regulação e a taxa de metabolismo podem diminuir.

De acordo com Biebl e colaboradores (1998), em culturas de *K. pneumoniae*, baixando a temperatura de 35 °C para 30 °C resultou numa redução substancial da síntese de etanol em favor da formação do 2,3-BD. Portanto, as melhores condições de produção máxima 2,3-BD por *K. pneumoniae* seriam crescimento descontrolado com acidificação (já discutida), a partir de pH não inferior a 7 e a uma temperatura de 30 °C.

O efeito da temperatura sobre a fermentação com *E. aerogenes* foi investigada por Perego e colaboradores (2000). O estudo abrangeu um intervalo de temperatura de 23 à 46 °C. A taxa de conversão de glicose em 2,3-BD e acetoína e a concentração final do produto foram inversamente correlacionadas com a temperatura. Devido à aceleração enzimática dos processos, o tempo de fermentação diminuiu progressivamente com o aumento da temperatura. A produtividade 2,3-BD aumentou gradualmente com a temperatura até 39 °C (0,36 mmol L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e diminuiu acima deste limiar. Os autores concluíram que, uma vez que o objetivo era acelerar a fermentação de 2,3-BD, uma temperatura de 39 °C é ótima para este processo.

#### 2.4.4 Substratos e concentração de substrato

Na maioria dos processos de produção de 2,3-BD, a concentração inicial de açúcar mais frequentemente aplicada está no intervalo de 5-10 % (GARG e JAIN, 1995). Estas concentrações baixas (ou mesmo inferiores) são empregadas principalmente por causa da presença de substâncias tóxicas na matéria-prima (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 a partir do hidrolisado ácido de madeira na produção de 2,3-BD por *K. pneumoniae*. Eles encontraram que a concentração de sulfato acima de 0,2 % (wt/v) reduzia o rendimento de 2,3-BD em 30 %, embora não tenha afetado o crescimento celular. Semelhantes resultados foram obtidos para furfural, mas neste caso os rendimentos de 2,3-BD foram um pouco mais altos. Os compostos fenólicos (vanilina) se mostraram inibidores para a produção de 2,3-BD (a uma concentração de 0,05 % (wt/vl)) e de crescimento (0,1 % (wt/vl)). A alta concentração de açúcar (superior a 50 g/L) foi relatado como inibidor da formação de 2,3 BD e consumo de açúcar (YU e SADDLER, 1983). Segundo McCall e Georgi (1954), a baixas concentrações de açúcares (4 a 6 %), a fermentação de sacarose do melaço de beterraba foi completa com 24 h de experimento. Por outro lado, a concentrações mais elevadas de sacarose (até 17 %) as fermentações mostraram-se incompletas e pouco eficientes.

A situação contrária diz respeito a meios sintéticos suplementados com açúcares puros, tais como glicose. Neste caso, não há compostos inibidores presentes, por conseguintes concentrações iniciais de açúcar de até 200 g.L<sup>-1</sup> podem ser fermentados e até mesmo um grande aumento na concentração normalmente leva a uma melhoria de rendimento 2,3-BD. No entanto, observou-se que concentrações iniciais de açúcar superiores a 20 g.L<sup>-1</sup> ocasionam uma diminuição na taxa de crescimento específico, o que é provavelmente um resultado de uma queda na atividade de água. Deve notar-se que, uma vez que a redução da atividade de água é uma função da molaridade, lactose (dissacarídeo) é menos inibitória que a glicose (monossacárido). Estudos realizados por Converti e Perego (2002) com *E. aerogenes* com relação a concentração de glicose mostraram quase nenhuma influência da concentração inicial de glicose (num intervalo de 9 à 72 g.L<sup>-1</sup>) na produção molar de 2,3-BD. Em outros estudos

(realizado com *B. polymyxa*) por DE Mas e colaboradores, (1988), a inibição do crescimento ocorreu em concentrações de substrato superiores a 150 g.L<sup>-1</sup>. A influência da concentração de xilose em 2,3-BD parece ser espécie específico. (GARG e JAIN, 1995).

### 3 Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – ICTA da faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS em Porto Alegre, RS.

#### 3.1 Microrganismo

Todos os ensaios de fermentação foram realizados com microrganismos isolados de um consórcio microbiano ambiental, segundo Rossi et al (2011), os quais fazem parte do estoque de culturas do laboratório BiotecLab (ICTA-UFRGS). Ao todo, foram testadas 14 linhagens de bactérias. Todas as culturas foram mantidas em placas com meio ágar Luria-Bertani (LB) (tabela 2) sob refrigeração.

**Tabela 2:** Composição do meio de manutenção das linhagens utilizadas.

Composição	Quantidade (g.L <sup>-1</sup> )
Extrato de Levedura	5
Peptona	10
Ágar	15
Glicose	7,5
NaCl	5

Estoques destas bactérias são mantidos no acervo de culturas microbiológicas do laboratório BiotecLab (UFRGS, Porto Alegre - RS) em meio (LB) em 50 % de glicerol a -80 °C.

### 3.2 Meio de Cultivo

O meio de cultivo sintético utilizado para os microrganismos é mostrado Tabela 3.

**Tabela 3:** Composição do meio sintético usado nos ensaios de fermentação (adaptado de FRAZER E MCCASKEY, 1989)

Composição	Fórmula Molecular	Quantidade (g.L <sup>-1</sup> )
Fosfato dibásico de Amônio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4
Fosfato monobásico de Potássio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
Cloreto de Sódio	NaCl	1
Fosfato dibásico de sódio	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
Sulfato de Magnésio	MgSO <sub>4</sub>	0,2
Extrato de Levedura	-	1,5
Sulfato de Ferro	FeSO <sub>4</sub>	0,02
Sulfato de Zinco	ZnSO <sub>4</sub>	0,01

Para os experimentos onde o objetivo foi testar qual o melhor substrato para a produção de 2,3-BD, foram preparados meios de cultivo com os mesmos componentes mostrados na tabela 3, variando apenas a fonte de carbono, de modo que foram utilizados 30 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 30 g.L<sup>-1</sup> de xilose. A fonte de nitrogênio permaneceu constante em 4 g.L<sup>-1</sup> de fosfato dibásico de amônio.

### 3.3 Pré-Inóculo

Placas com células viáveis foram produzidas a partir do banco de células através do crescimento das amostras, estocadas em glicerol, em meio LB a 37 °C e 150 rpm em incubadora de agitação orbital, procedendo-se então o plaqueamento em meio ágar LB.

Inóculos foram preparados através da transferência de uma alçada de colônias das placas geradas a partir do banco de células (armazenadas a 4 °C) para Erlenmeyers de 125 mL contendo 60 mL do meio de cultivo citado acima, permitindo crescimento *overnight* a uma temperatura de 30 °C, em incubadora de agitação orbital, permitindo crescimento até densidade ótica (DO) igual a 1 a 600 nm.

### **3.4 Inóculo e ensaios de fermentação**

O meio de cultivo utilizado nos experimentos está descrito na Tabela 3, variando-se a fonte de carbono. Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 125 mL com volume útil de 60 mL, posteriormente inoculados a 5 % (v.v<sup>-1</sup>), correspondendo a uma densidade óptica igual a 1,0, medida a 600 nm em espectrofotômetro.

A pré-seleção de potenciais produtores de 2,3-BD partiu de 14 microrganismos pertencentes ao consórcio microbiano ambiental, utilizando glicose como fonte de carbono. Duas condições de aeração foram testadas: 180 rpm e 120 rpm, ambas a 30 °C. Após 24 horas de cultivo, alíquotas foram coletadas para determinação da concentração de 2,3-BD. Estes experimentos foram realizados em simplificada. As duas condições de aeração testadas tiveram como objetivo verificar se havia diferença na produção de 2,3-BD tendo em vista que, como citado no item 2.4.1, a agitação é o fator mais importante para a produção deste composto.

A partir da análise do primeiro ensaio de fermentação, selecionou-se 6 linhagens de microrganismos que se destacaram como produtores de 2,3-BD e seguiu-se para a segunda etapa dos ensaios de fermentação, que consiste em testar essas 6 linhagens em dois meios sintéticos (tabela 3) diferentes, um utilizando glicose como fonte de carbono e outro utilizando xilose. As condições determinadas foram de temperatura de 30 °C e agitação de 120 rpm, pois não houve diferença de produção entre as duas condições de agitação testadas anteriormente e o 2,3-BD é um metabólito produzido sob condições de microaerofilia. O pH não foi controlado durante os ensaios. O pH inicial para o meio sintético utilizando glicose foi de 6,7, em média, e para o meio utilizando xilose foi de 6,3, em média. Após o inóculo, alíquotas foram retiradas de 3 em 3 horas para acompanhamento do crescimento celular, pH, consumo de açúcar e produção de 2,3-BD. Estes experimentos foram realizados em duplicata.

### **3.5 Métodos Analíticos**

#### *3.5.1 Concentração de Açúcares e 2,3-BD*

A composição do meio de cultivo foi analisada utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) através de equipamento da marca Shimadzu

equipado com detector de índice de refração (RID-10A). A coluna utilizada foi Aminex HPX-87H (300×7,8 mm, Bio-Rad, EUA).

Para determinação da concentração de 2,3-BD, a fase móvel foi composta de uma solução  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,005 mol.L<sup>-1</sup> alimentada a 0,8 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura foi controlada a 65 °C. Para a concentração de açúcares utilizou-se a mesma fase móvel alimentada a 0,6 mL.min<sup>-1</sup> e a temperatura foi mantida a 45 °C.

As amostras foram preparadas para cromatografia por centrifugação a 4500 × g por 15 min a fim de precipitar as células em suspensão, procedendo-se com filtração da porção sobrenadante utilizando membranas de acetato de celulose (tamanho de poro de 0,22 µm; Sartorius, Alemanha). Para todas as análises por HPLC, padrões de 2,3-BD, glicose e xilose com grau de pureza de cromatografia (superior a 99,5 %) foram utilizados.

### 3.5.2 Medidas de pH

O pH de cada amostra foi medido em um pHmetro (Kasvi), o qual foi calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0.

### 3.5.3 Crescimento Celular

O crescimento celular foi acompanhado através de leituras de densidade ótica a 600 nm em espectrofotômetro (Amersham Biosciences, modelo Ultrospec 3100 pro) utilizando como controle o meio estéril. As leituras foram realizadas em um comprimento de onda de 600 nm.

## 3.6 Determinação dos Parâmetros Cinéticos

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. Para assegurar-se de que este valor está correto, também calculou-se  $Y_{P/S}$  através da regressão linear ao plotar-se a variação de concentração de 2,3-BD contra o consumo de glicose. Tal valor correspondeu ao coeficiente angular da reta obtida.

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

### **3.7 Análise estatística dos dados**

A análise estatística dos dados foi feita sob a forma de análise de variância (ANOVA). A significância dos dados foi determinada utilizando o teste F de Fischer com um alfa de 0,05.

## 4 Resultados e Discussão

Bactérias heterotróficas necessitam de uma fonte de carbono orgânica para o crescimento e metabolismo celular, sendo que as mais comuns são os carboidratos principalmente a D-glicose. Tais compostos podem ser utilizados por microrganismos, de modo que essa versatilidade é de grande importância, permitindo o emprego de microrganismos numa extensa série de transformações úteis ao homem (BORZANI, et al., 2001). Desta forma, foram conduzidos experimentos para selecionar as linhagens produtoras de 2,3-BD partindo de duas fontes de carbono: D-glicose e xilose.

### 4.1 Microrganismos Potencialmente Produtores de 2,3 BD

O primeiro ensaio realizado teve o objetivo de pré-selecionar os microrganismos produtores de 2,3-BD. Neste ensaio a fonte de carbono utilizada foi a D-glicose e foi avaliada a quantidade de 2,3-BD formada após 24 horas de fermentação. Testou-se 14 linhagens de bactérias disponíveis no laboratório.

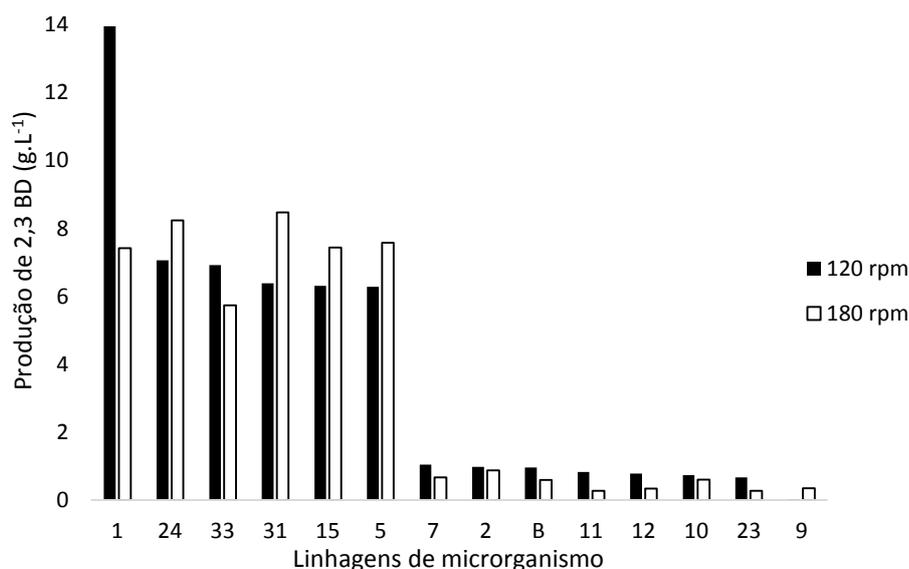
Os resultados são mostrados na Figura 4. As linhagens 1, 24, 33, 31, 15 e 5 apresentaram maior síntese de 2,3-BD a partir da D-glicose e, portanto, foram selecionadas para os próximos ensaios de fermentação e determinação de parâmetros cinéticos. A maior produção de 2,3-BD foi de 13,95 g.L<sup>-1</sup> quando a condição de aeração foi de 120 rpm, representando 26,38 % da produção de 2,3 BD nesta condição.

Das 6 linhagens pré-selecionadas, Rossi e colaboradores (2011) identificaram 4, sendo essas bactérias gram-negativas. Baseado na análise 16S-rDNA, as linhagens 1, 5 e 31 foram classificadas como *Klebsiella pneumoniae* (96 % de confiança) e a linhagem 33 como *Pantoea agglomerans* (93 % de confiança). Os isolados de *Klebsiella* não podem ser considerados como sendo a mesma cepa, uma vez que sempre produziram colônias distintas morfologicamente.

Como pode-se observar, duas condições de aeração foram testadas: 120 rpm e 180 rpm. Sabe-se que apesar de o 2,3 BD ser um produto de metabolismo anaeróbico, foi demonstrado que a aeração aumentou a produção de 2,3 BD por *Klebsiella pneumoniae* (LEDINGHAM e NEISH, 1954). Entretanto, o aumento

excessivo do suprimento de oxigênio favorece a formação de massa celular e gás carbônico em detrimento da produção de 2,3-BD (JANSEN et al., 1984). O 2,3-BD é formado, então, sob limitação de oxigênio e, conseqüentemente, sua produção é diminuída com o aumento da aeração do meio, embora o declínio do fornecimento de oxigênio possa diminuir também a taxa de conversão total, devido a concentrações celulares mais baixas (SABLAYROLLES e GOMA, 1984). Como essas informações se mostram contraditórias em relação à produção de 2,3-BD, foi necessário estudar uma estratégia de controle de fornecimento de oxigênio adequada para garantir a produção eficiente desse álcool.

De acordo com os resultados desse experimento, somente a linhagem identificada pelo número 1 apresentou a produção de 2,3-BD notoriamente aumentada quando a aeração é diminuída de 180 para 120 rpm.



**Figura 4** - Produção de 2,3 BD por diferentes linhagens de bactérias.

## 4.2 Ensaio de Fermentação

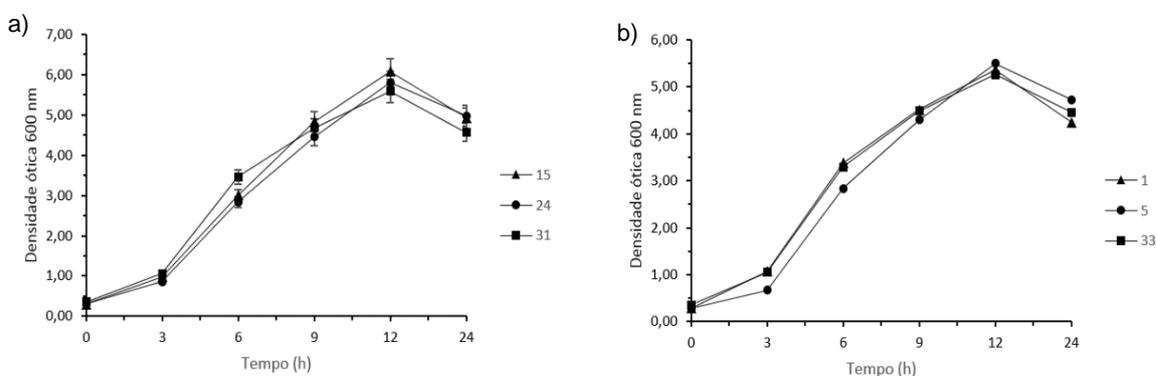
De acordo com os resultados obtidos no item 4.1, testes com duas fontes de carbono orgânico foram realizados nas 6 linhagens selecionadas com agitação de 120 rpm e temperatura de 30 °C, a fim de determinar os parâmetros cinéticos e verificar qual bactéria é a maior produtora de 2,3-BD.

### 4.2.1 Crescimento Celular

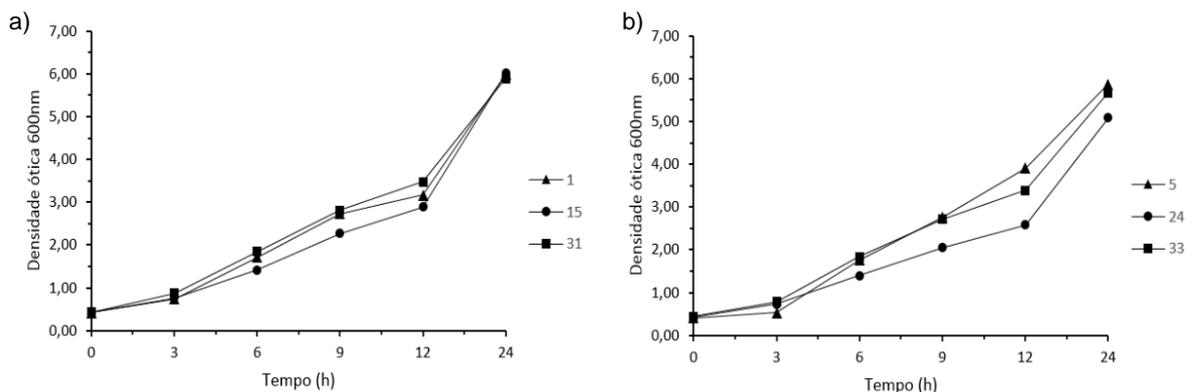
O crescimento celular foi medido através de densidade ótica para os dois diferentes meios sintéticos. As figuras 5 e 6 mostram o perfil de crescimento de cada linhagem com glicose e xilose, respectivamente.

Pode-se observar que a cinética de crescimento é mais rápida quando as bactérias estão em um meio com glicose disponível. Isto se deve, provavelmente, por ser este açúcar uma fonte de carbono de fácil catálise, ficando assim, disponível para as células desempenharem suas funções. A curva de crescimento celular apresenta o mesmo comportamento para as 6 linhagens testadas seguindo a tendência da curva de crescimento bacteriano, em que a fase de adaptação ao meio de cultivo tem duração de aproximadamente de 3 horas, seguido pelo crescimento exponencial, com duração de 9 horas e, por fim, a fase de declínio.

Não se pode concluir o mesmo quando a fonte de carbono disponível no meio é a xilose. A cinética de crescimento celular é mais demorada. Uma explicação para esta observação pode ser atribuída ao fato de que as células foram mantidas em placas contendo glicose e quando foram pré-inoculadas, tiveram de se adaptar ao meio contendo xilose. *K. pneumoniae* tem uma tendência para metabolizar preferencialmente de glicose e em seguida, manose, entre as fontes de carbono presentes no hidrolisado lignocelulósico. Xilose, arabinose e galactose são consumidos em taxas mais lentas (PERLMAN, 1944). Durante as 24 horas de fermentação, a fase de crescimento exponencial não foi completa, não atingindo assim a fase de estacionária.



**Figura 5** - Cinética de crescimento celular utilizando glicose como fonte de carbono. Em a) são apresentadas as 3 linhagens com maior crescimento e em b) as linhagens com crescimento levemente inferior.

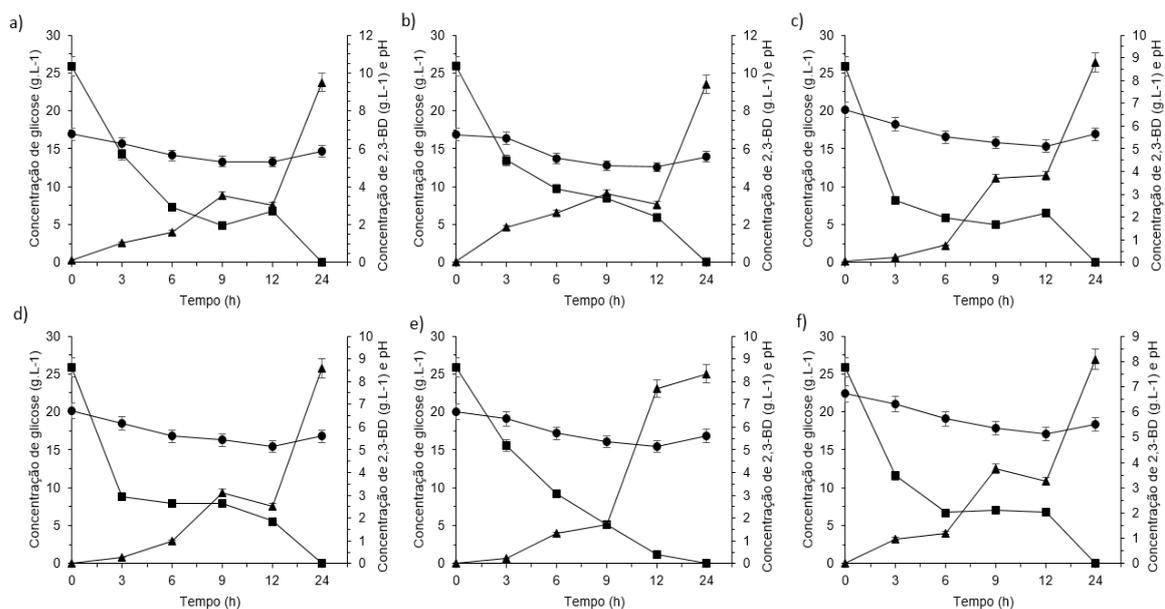


**Figura 6** - Cinética de crescimento celular utilizando xilose como fonte de carbono. . Em a) são apresentadas as 3 linhagens com maior crescimento e em b) as linhagens com crescimento levemente inferior.

#### 4.2.2 Ensaio com Glicose

Foi avaliada a produção de 2,3-BD, a cinética de consumo de glicose e a variação do pH durante 24 horas de fermentação (Figura 7). Como os resultados obtidos foram similares para os seis microrganismos, a discussão será baseada em um valor médio dos mesmos.

A concentração de glicose no meio decaiu ao longo do tempo, indicando o consumo da mesma. O comportamento da curva foi o mesmo para as seis bactérias testadas. Após 24 horas, a concentração deste açúcar chegou a quase zero para todas as espécies testadas. A queda no consumo da glicose acompanha a taxa de crescimento exponencial desses microrganismos, como esperado.



**Figura 7** - Produção de 2,3- butanodiol, consumo de glicose e variação do pH em um intervalo de 24 horas. (-■-) Glicose, (-●-) pH e (-▲-) 2,3-butanodiol. As letras correspondem aos diferentes microrganismos e estão organizadas em ordem decrescente de produção de 2,3-BD. a) 33, b) 1, c) 31, d) 5, e) 24 e f) 15.

A máxima produção de 2,3-BD acontece durante a fase de estagnação, quando ainda há açúcar no meio, sugerindo que este álcool seja um metabólito parcialmente associado ao crescimento. Não há diferença significativa entre as produções de 2,3-BD para os 6 diferentes microrganismos testados.

O parâmetro cinético de consumo de substrato e conversão a produto foi analisado. Partindo de uma concentração média inicial de glicose de 25,9 g.L<sup>-1</sup>, obteve-se um consumo médio final de substrato de 25,83 g.L<sup>-1</sup>, além de uma concentração média de 2,3-BD de 8,78 g.L<sup>-1</sup>. Desse modo, a conversão média de substrato a produto foi de 0,34 g.g<sup>-1</sup>. Por fim, a produtividade média de 2,3-butanodiol foi avaliada e seu valor foi de 0,37 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, considerando como tempo de operação total 24 horas, condizente com o intervalo onde houve produção de 2,3-BD. Os dados para cada microrganismo encontram-se na tabela 4.

**Tabela 4:** Parâmetros de cinética de crescimento, consumo de glicose e produtividade para os 6 microrganismos testados.

Linhas	Concentração de 2,3 BD (g.L <sup>-1</sup> )*	Consumo de Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>ps</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Q <sub>p</sub> (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
1	9,415 ± 7,34	25,839 ± 10,61	0,364	0,396
5	8,570 ± 7,38	25,819 ± 9,36	0,332	0,358
15	8,080 ± 5,77	25,804 ± 9,68	0,313	0,341
24	8,345 ± 11,5	25,854 ± 9,49	0,323	0,366
31	8,795 ± 8,45	25,874 ± 8,60	0,340	0,377
33	9,505 ± 8,53	25,804 ± 9,88	0,368	0,397

\*após 24h

As linhagens com maior produção de 2,3-BD foram a 33 e a 1 com uma produtividade de 0,39 g.L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e produção final de 9,45 g.L<sup>-1</sup> de 2,3-BD, em média. A bactéria com menor produção foi a 15, sintetizando 8,08 g.L<sup>-1</sup> e produtividade de 0,341 g.L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. É interessante observar que quando a fonte de carbono é a glicose, os microrganismos não tiveram diferenças significativas para converter a mesma em 2,3-BD. Isto fica evidente quando comparamos os parâmetros cinéticos dessas bactérias, que são muito próximos.

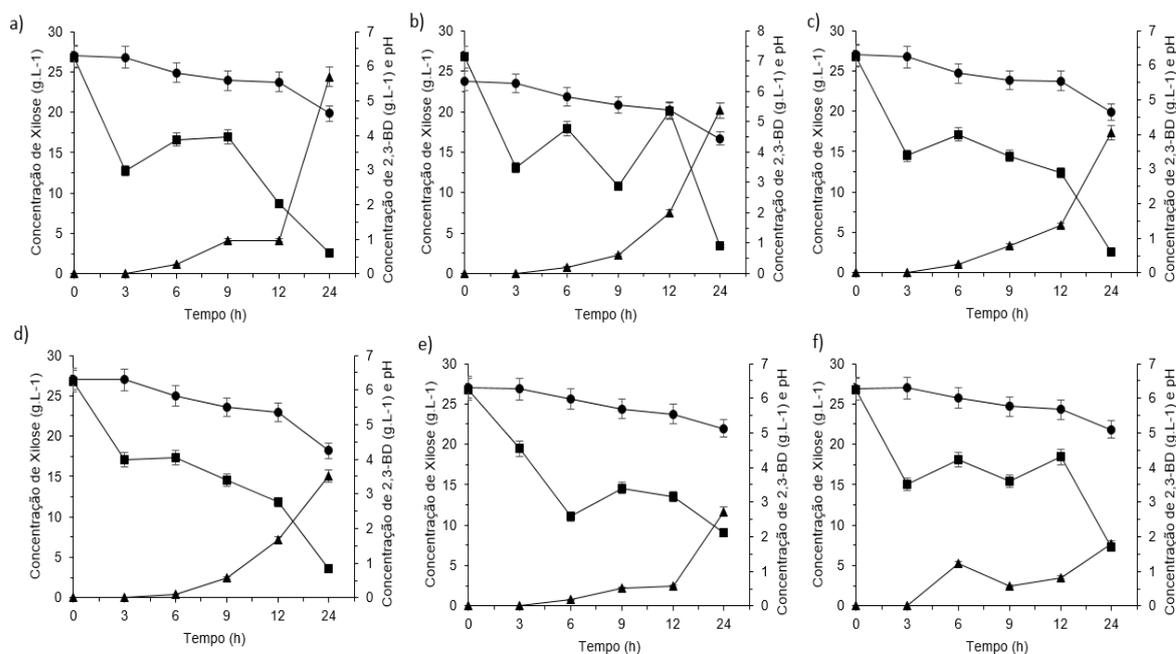
Neste trabalho, o pH do meio não foi controlado. O pH inicial do cultivo foi de aproximadamente 6,7. A medida que a fermentação ocorre e os microrganismos reproduzem-se, o pH baixa até atingir um valor médio de 5,15. Geralmente, na faixa de pH ótimo, a eficiência metabólica do microrganismo será máxima. Esse valor é dependente do substrato e do microrganismo envolvido, variando normalmente entre 5,0 e 6,0 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). Isto pode ser verificado pela análise da figura 8, onde a maior produção de 2,3 BD ocorre quando o pH do meio atinge valores inferiores a 6.

Os valores em duplicata obtidos para produção de 2,3-BD, consumo de xilose, pH e densidade ótica encontram-se no apêndice A.

### 4.2.3 Ensaios com Xilose

Igualmente aos ensaios utilizando glicose, foi avaliada a produção de 2,3-BD, a cinética de consumo de xilose e a variação do pH durante 24 horas de fermentação (Figura 8).

A concentração de xilose no meio decaiu ao longo do tempo, indicando o consumo da mesma. O comportamento da curva foi similar para as seis bactérias testadas. Quando compara-se o consumo de xilose com aquele de glicose, pode-se notar que a xilose leva mais tempo para ser consumida. Vale lembrar que a cinética de crescimento quando o meio é suplementado com xilose também é mais lenta. Após 12 horas de ensaio, o consumo desse açúcar decai notoriamente. A linhagem que apresenta um maior conversão de substrato em biomassa é a 15, partindo de um valor inicial de xilose de  $26,78 \text{ g.L}^{-1}$  após 24 horas de ensaio esse microrganismo chegou a uma concentração final de glicose no meio de  $9,07 \text{ g.L}^{-1}$ . As linhagens 31 e 33, que partiram da mesma concentração inicial de xilose, metabolizaram mais açúcar, chegando ao valor final, após as 24 horas de cultivo de  $2,62 \text{ g.L}^{-1}$  e  $2,59 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Porém esse consumo parece não foi traduzido em um crescimento celular tão expressivo quanto a linhagem 15.



**Figura 8** - Produção de 2,3-butanodiol, consumo de xilose e variação do pH em um intervalo de 24 horas. (-■-) Xilose, (-●-) pH e (-▲-) 2,3-butanodiol. As letras correspondem aos diferentes microrganismos e estão organizadas em ordem decrescente de produção do álcool a) 31, b) 1, c) 33, d) 5, e) 15 e f) 24.

Após 12 horas de fermentação, a produção de 2,3-BD começa a aumentar, acompanhando o declínio do consumo de xilose. Não há diferença significativa entre as produções de 2,3-BD para os 6 diferentes microrganismos testados, entretanto as diferenças aqui são mais acentuadas que aquelas encontradas quando o meio continha glicose. A bactéria identificada pelo número 31 produziu 5,7 g.L<sup>-1</sup> de 2,3-BD em 24 horas de teste, sendo esse a maior produção. A linhagem 24 produziu 1,8 g.L<sup>-1</sup> neste mesmo intervalo de tempo, representando a menor síntese do álcool.

**Tabela 5:** Parâmetros de cinética de crescimento, consumo de xilose e produtividade para os 6 microrganismos testados.

Linhasgens	Concentração de 2,3 BD (g.L <sup>-1</sup> )*	Consumo de Xilose (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>p/s</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Q <sub>p</sub> (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
1	5,370 ± 4,41	23,426 ± 12,79	0,229	0,224
5	3,510 ± 1,94	23,196 ± 12,69	0,151	0,159
15	2,720 ± 1,07	17,716 ± 13,22	0,154	0,123
24	1,800 ± 0,49	19,466 ± 14,33	0,092	0,122
31	5,695 ± 4,79	24,161 ± 11,55	0,236	0,260
33	4,050 ± 2,40	24,196 ± 12,12	0,167	0,215

\*após 24h

O parâmetro cinético de consumo de substrato e conversão a produto também foi analisado. Partindo de uma concentração média inicial de xilose de 26,78 g.L<sup>-1</sup>, obteve-se um consumo médio final de substrato de 22,27 g.L<sup>-1</sup>, além de uma concentração média de 2,3-BD de 3,58 g.L<sup>-1</sup>. Desse modo, a conversão média de substrato a produto foi de 0,17 g.g<sup>-1</sup>, 50% inferior a conversão obtida quando o meio usava glicose como fonte de carbono. Para a realização dos testes, xilose foi autoclavada juntamente com os outros componentes do meio. Yu e Saddler (1983) demonstraram que especialmente para esse açúcar, valores superiores de 2,3-BD foram obtidos quando a xilose foi esterilizada separadamente antes de ser adicionada ao meio autoclavado.

Por fim, a produtividade média de 2,3 butanodiol foi avaliada e seu valor foi de 0,18 g.L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, considerando como tempo de operação total 24 horas, condizente com o intervalo onde houve produção de 2,3-BD.

Da mesma maneira que o experimento foi conduzido com glicose, aqui também o pH não foi controlado. O pH inicial de cultivo foi de 6,32. Para os 6 diferentes microrganismos, nota-se que a variação de pH é semelhante, alcançando um valor médio final de 4,69, inferior aquele encontrado para glicose. GT Tsao (1978) estudou a influência do pH para a produção de 2,3-BD e parece que o pH ótimo é uma função do substrato utilizado para a fermentação. Com glicose, o pH ideal para a produção de 2,3-butanodiol foi de 6,4, enquanto que com xilose como substrato a faixa de pH foi de 5,2 – 5,4. Sabe-se que em condições extremas, com pH abaixo de 4 ou superior a 8, a síntese de 2,3-BD é desfavorável, já que a atividade de uma ou mais enzimas é reduzida e outras vias metabólicas são utilizadas pelo microrganismo para obter energia (ROMIO, 2014). Como a cinética de crescimento com a xilose é mais demorada, um intervalo de tempo superior a 24 horas seria necessário para uma conclusão mais precisa sobre os parâmetros de produção de 2,3-BD e dinâmica do pH.

Os valores em duplicata obtidos para produção de 2,3-BD, consumo de xilose, pH e densidade ótica encontram-se no apêndice B.

## 5 Conclusão e trabalhos futuros

A partir dos microrganismos e fontes de carbono testadas, algumas linhagens se mostraram promissoras para a produção de 2,3 BD. Como este trabalho visa selecionar microrganismos que consigam converter fontes de carbono que estão presentes em resíduos agrícolas (glicose e xilose, por exemplo) a 2,3-BD, os resultados obtidos com xilose, em meio sintético, tornam-se mais importantes, visto que esse açúcar é o mais abundante nestes resíduos.

A linhagem 31 foi a maior produtora desse álcool quando a fonte de carbono foi xilose, produzindo 5,7 g.L<sup>-1</sup> ao longo das 24 horas de fermentação. Quando o meio sintético utilizou glicose como fonte de carbono, esta linhagem foi a terceira maior produtora com 8,79 g.L<sup>-1</sup> de álcool sintetizado. Rossi e colaboradores (2011) identificaram este microrganismo como sendo a espécie *Klebsiella pneumoniae*.

A linhagem 33 foi a maior produtora de 2,3-BD quando o meio foi suplementado com glicose, sintetizando 9,50 g.L<sup>-1</sup> durante 24 horas, 0,72 g.L<sup>-1</sup> a mais do que a linhagem 31. No meio cuja fonte de carbono foi a xilose, esta cepa produziu 4,05 g.L<sup>-1</sup> de 2,3 BD, que representa 1,65 g.L<sup>-1</sup> a menos que a linhagem 31. Este microrganismo foi identificado como sendo a espécie *Pantoea agglomerans* (ROSSI et al., 2011). Seria interessante conduzir estudos com esse microrganismo, pois pouco se encontrou na literatura, diferentemente do gênero *Klebsiella*.

A linhagem 1, identificada como BL-1 (ROSSI et al., 2011) foi a segunda maior produtora de 2,3-BD tanto para o meio com glicose como para o meio com xilose.

Para futuros trabalhos visando a produção de 2,3-BD, sugere-se a continuidade dos estudos utilizando hidrolisado de resíduos agrícolas com as cepas que se destacaram na utilização dos açúcares testados em meio sintético. Além disso, pretende-se realizar experimentos em biorreatores onde é possível executar um melhor ajuste dos parâmetros de controle, como pH, temperatura e oxigênio dissolvido.

## 6 Referências

ALAM S, CAPIT F, WEIGANDS WA, HONG J. Kinetics of 2,3-butanediol fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*: effect of initial substrate concentration and aeration. J Chem Technol Biotechnol 1990; 47:71–84.

ANVARI M, KHAYATI G. In situ recovery of 2,3-butanediol from fermentation by liquid– liquid extraction. J Ind Microbiol Biotechnol 2009; 36:313–7.

BARTOWSKY EJ, HENSCHKE PA. The ‘buttery’ attribute of wine–diacetyl–desirability, spoilage and beyond. Int J Food Microbiol 2004; 96:235–52.

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

BIEBL H, ZENG AP, MENZEL K, DECKWER WD. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. Appl Microbiol Biotechnol 1998; 50:24–9.

BLACKWOOD AC, WHEAT JA, LESLIE JD, LEDINGHAM GA, SIMPSON FT. Production and properties of 2,3-butanediol. XXXI. Pilot plant studies on the fermentation of wheat by *Aerobacillus polymyxa*. Can J Res 1949; 27F:199–210.

BLOMQUIST K, NIKKOLA M, LEHTOVAARA P, SUIHKO ML, AIRAKSINEN U, STRABY KB, et al. Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. J Bacteriol 1993; 175:1392–404.

BORZANI W, SCHMIDELL W, LIMA U A e AQUARONE, E. Biotecnologia industrial: volume 1. Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.

BRYN K, ULSTRUP JC, STORMER FC. Effect of acetate upon the formation of acetoin in *Klebsiella* and *Enterobacter* and its possible practical application in a rapid Voges- Proskauer test. Appl Microbiol 1973; 25:511–2.

CASPI R. Acetoin biosynthesis I; Acetoin biosynthesis II; Butanediol biosynthesis. MetaCyc encyclopedia of metabolic pathways; 2008. Available via: <http://metacyc.org/>. Accessed 12 Jan 2009.

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

CHO SM, KANG BR, HAN SH, ANDERSON AJ, PARK JY, LEE YH, et al. 2R,3R-butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*. Mol Plant-Microb Interact 2008; 21:1067–75.

CONVERTI A, PEREGO P, DEL BORGHI M. Effect of specific oxygen uptake rate on *Enterobacter aerogenes* energetics: Carbon and reduction degree balances in

batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 82, n. 3, p. 370–377, 5 maio 2003.

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. *Biotechnol Bioeng* 2003; 82:370–7.

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

DONKER HJL. Bijdrage tot de kennis der boterzuurbutylalkohol in acetongistigen. PhD Thesis, Delft., 1926.

FLICKINGER MC. Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into liquid fuels: how far have we come? *Biotechnol Bioeng* 1980; 22:27–48.

FRAZER FR, MCCASKEY TA. Effect of selected components of acid-hydrolysed hardwood on conversion of D-xylose to 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb Technol* 1991; 13:110–5.

FRAZER FR, McCASKEY TA. Wood hydrolyzate treatments for improved fermentation of wood sugars to 2,3-butanediol. *Biomass*, v. 18, p. 31-42, 1989.

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 SK, JAIN A. Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. *Bioresour Technol* 1995; 51:103–9.

HARDEN A,WALPOLE GS. 2,3-Butylene glycol fermentation by *Aerobacter aerogenes*. *Proc R Soc B* 1906; 77:399–405.

HATTI-KAUL R, TORNVALL U, GUSTAFSSON L, BORJESSON P. Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals—a cradle-to-grave perspective. *Trends Biotechnol* 2007;25:119–24.

HESPELL RB. Fermentation of xylan, corn fiber, or sugars to acetoin and butanediol by *Bacillus polymyxa* strains. *Curr Microbiol* 1996; 32:291–6.

HON-NAMI K. A unique feature of hydrogen recovery in endogenous starch-to-alcohol fermentation of the marine microalga, *Chlamydomonas perigranulata*. *Appl Biochem Biotechnol* 2006; 131:808–28.

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

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

JOHN RP, NAMPOOTHIRI KM, PANDEY A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;74:524–34.

KAMM B, KAMM M. Principles of biorefineries. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 64:137–45.

KIM SJ et al. Production of 2,3-butanediol by engineered *saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, v. 146, p. 274–281, 2013.

LEDINGHAM GA, NEISH AC. Fermentative production of 2,3-butanediol. In: Underkofler LA, Hickey RJ, editors. *Industrial fermentations*. New York: Chemical Publishing Co; 1954. p. 27–93.

LONG SK, PATRICK R. The present status of the 2,3-butylene glycol fermentation. *Adv Appl Microbiol* 1963; 5:135–55.

LOPEZ-CONTRERAS AM, CLAASSEN PAM, MOOIBROCK H, DE VOS WM. Utilisation of saccharides in extruded domestic organic wastes by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for production of acetone, butanol and ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000; 54:162–7.

MA C. et al. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 82, n. 1, p. 49–57, 2009.

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

MALLONEE DH, SPECKMAN RA. Development of a mutant strain of *Bacillus polymyxa* showing enhanced production of 2,3-butanediol. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54:168–71.

MAYER D, SCHLENSOG V, BÖCK A. Identification of the transcriptional activator controlling the butanediol fermentation pathway in *Klebsiella terrigena*. *J Bacteriol* 1995; 177:5261–9.

MCCALL KB, GEORGI CE. The production of 2,3-butanediol by fermentation of sugar beet molasses. *Appl Environ Microbiol* 1954; 2:355–9.

MICKELSON M, WERKMAN CH. Influence of pH on the dissimilation of glucose by *Aerobacter indologenes*. *J Bacteriol* 1938; 36:67–76.

MOES J, GRIOT M, KELLER J, HEINZLE E, DUNN IJ e BOURNE JR. A microbial culture with oxygen-sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport. *Biotechnology bioengineering*, v. 27, p. 482–489, 1985.

NAKASHIMADA Y, KANAI K, NISHIO N. Optimization of dilution rate, pH and oxygen supply on optical purity of 2, 3-butanediol produced by *Paenibacillus polymyxa* in chemostat culture. *Biotechnology Letters*, v. 20, n. 12, p. 1133–1138, 1998.

NAKASHIMADA Y, MARWOTO B, KASHIWAMURA T, KAKIZONO T, NISHIO N. Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*. *J Biosci Bioeng* 2000; 90:661–4.

NILEGAONKAR S et al. Production of 2, 3-butanediol from glucose by *Bacillus licheniformis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 8, p. 378–381, 1992.

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 Eng 2000; 23:613–20.

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

PETRINI P, DE PONTI S, FAREA S, TANZI MC. Polyurethane-maleamides for cardiovascular applications: synthesis and properties. J Mater Sci-Mater Med 1999; 10:711–4.

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

ROSSI DM, et al. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. International Journey of Hydrogen Energy, v. 36, p. 4814–4919, 2013.

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

SAHA BC, BOTHAST RJ. Production of 2,3-butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*. Appl Microbiol Biotechnol 1999; 52:321–6.

SAHA BC. Hemicellulose bioconversion. J Ind Microbiol Biotech 2003;30:279–91

SOLTYS KA, BATTI AK, KONERU B. Successful nonfreezing, subzero preservation of rat liver with 2,3-butanediol and type I antifreeze protein. J Surg Res 2001; 96:30–4.

SPECKMAN RA, COLLINS EB. Microbial production of 2,3-butylene glycol from cheese whey. Appl Environ Microbiol 1982; 43:1216–8.

STORMER FC. Evidence for induction of the 2,3-butanediol-forming enzymes in *Aerobacter aerogenes*. FEBS Lett 1968b; 2:36–8.

SUN LH, JIANG B, XIU ZL. Aqueous two-phase extraction of 2,3-butanediol from fermentation broths by isopropanol/ammonium sulfate system. Biotechnol Lett 2009a; 31:371–6.

SYU MJ. Biological production of 2,3-butanediol. Appl Microbiol Biotechnol 2001; 55:10–8.

THOMSEN MH. Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 68:598–606.

TSAO GT. Conversion of Biomass from Agriculture into useful products, Final report, USDOE Contract No. EG-77-5-02-4298, 1978

VAN HAVEREN J, SCOTT EL, SANDERS J. Bulk chemicals from biomass. *Biofuels*, *Bioprod Biorefin* 2008; 2:41–57.

VAN HOUTDT R, AERTSEN A, MICHIELS CW. 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 NB, LADISH MR, TSAO GT, NARAYAN R, RODWELL VW. 2,3-Butanediol. In: Blanch HW, Drew S, Wang DIC, editors. *Comprehensive biotechnology; the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine*. Oxford: Pergamon/ Elsevier; 1985. p. 933–44.

WILLKE T, VORLOP KD. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 66:131–42.

XIAO Z, XU P. Acetoin metabolism in bacteria. *Crit Rev Microbiol* 2007; 33:127–40.

XIU ZL, ZENG AP. Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 78:917–26.

YU EK, SADDLER JN. Enhanced production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high sugar concentrations in the presence of acetic acid. *Appl Environ Microbiol* 1982a; 44:777–84.

YU, E. K.; SADDLER, J. N. Fed-Batch Approach to Production of 2,3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae* Grown on High Substrate Concentrations. v. 46, n. 3, p. 630–635, 1983.

ZENG AP, BIEBL H, DECKWER WD. Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3-butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 5, p. 485–489, 1990.

ZENG AP, BIEBL H e DECKWER WD. Production of 2,3-butanediol in a membrane bioreactor with cell recycle. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 34, p. 463-468, 1991.

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

ZVERLOV VV, BEREZINA O, VELIKODVORSKAYA GA, SCHWARZ WH. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 71:587–97.

### APÊNDICE A – Dados da cinética com meio sintético utilizando glicose

As tabelas abaixo apresentam os valores de concentração de 2,3-BD, concentração de glicose, densidade ótica e pH para cada alíquota coletada. Os índices a e b correspondem ao mesmo microrganismo e indicam que os dados foram coletados em duplicata.

**Tabela 1 – Concentração de 2,3-BD (g.L<sup>-1</sup>)**

Amostras	Tempo (h)					
	0	3	6	9	12	24
1.a	0	3,46	1,8	3,59	2,86	9,5
1.b	0,12	0,24	3,46	3,68	3,25	9,33
5.a	0	0,28	1,1	3,02	1,98	8,59
5.b	0	0,27	0,86	3,24	3,07	8,55
15.a	0	0,15	1,46	3,43	3,49	7,98
15.b	0	1,82	0,96	4,09	3,02	8,18
24.a	0	0,25	1,1	1,72	8,44	7,91
24.b	0	0,22	1,55	1,72	6,91	8,78
31.a	0	0,22	1,36	4,44	3,91	9,05
31.b	0,14	0,2	0,16	2,97	3,73	8,54
33.a	0	0,27	1,53	3,54	2,94	9,49
33.b	0,28	1,81	1,67	3,54	3,11	9,52

O teste F apresentou um valor calculado de 0,032138, inferior ao valor crítico de 2,533554. Portanto, não há diferença significativa para a produção de 2,3-BD entre os diferentes microrganismos.

**Tabela 2 – Concentração de glicose (g.L<sup>-1</sup>)**

Amostras	Tempo (h)					
	0	3	6	9	12	24
1.a	25,899	15,44	9,65	8,7	5,53	0
1.b	25,899	11,51	9,81	8,31	6,48	0,12
5.a	25,899	12,6	8,48	8,98	4,48	0,08
5.b	25,899	4,97	7,31	6,89	6,69	0,08
15.a	25,899	13,7	7,95	7,67	7,3	0,11
15.b	25,899	9,5	5,51	6,37	6,28	0,08
24.a	25,899	16,73	7,22	7,56	0,38	0
24.b	25,899	14,31	11,08	2,83	1,93	0,09
31.a	25,899	6,27	7,23	10,09	5,83	0,05
31.b	25,899	10,1	4,68	0	7,21	0
33.a	25,899	14,1	8,38	5,16	6,88	0,1

<b>33.b</b>	25,899	14,4	6,24	4,66	6,82	0,09
-------------	--------	------	------	------	------	------

O teste F apresentou um valor calculado de 0,050456, inferior ao valor crítico de 2,533554. Portanto, não há diferença significativa para o consumo de glicose entre os diferentes microrganismos.

**Tabela 3 – Densidade ótica (600 nm)**

Amostras	Tempo (h)					
	0	3	6	9	12	24
<b>1.a</b>	0,272	1,089	3,368	4,500	5,289	4,155
<b>1.b</b>	0,302	1,048	3,392	4,525	5,449	4,349
<b>5.a</b>	0,275	0,613	2,672	4,120	5,149	4,622
<b>5.b</b>	0,281	0,736	2,992	4,480	5,843	4,829
<b>15.a</b>	0,314	0,979	3	4,915	6,076	5,049
<b>15.b</b>	0,285	0,995	3,008	4,760	6,096	4,822
<b>24.a</b>	0,325	0,878	2,892	4,530	6,096	5,003
<b>24.b</b>	0,299	0,846	2,784	4,380	5,516	4,962
<b>31.a</b>	0,361	1,06	3,364	4,610	5,396	4,809
<b>31.b</b>	0,36	1,056	3,568	4,750	5,796	4,329
<b>33.a</b>	0,351	1,027	3,22	4,610	5,103	4,389
<b>33.b</b>	0,357	1,077	3,376	4,370	5,409	4,529

**Tabela 4 – Potencial hidrogeniônico (pH)**

Amostras	Tempo (h)					
	0	3	6	9	12	24
<b>1.a</b>	6,74	7,11	5,5	5,14	5,03	5,60
<b>1.b</b>	6,75	6,04	5,5	5,12	5,04	5,55
<b>5.a</b>	6,71	6,06	5,63	5,47	5,19	5,54
<b>5.b</b>	6,7	6,28	5,57	5,39	5,11	5,66
<b>15.a</b>	6,71	6,27	5,72	5,35	5,11	5,52
<b>15.b</b>	6,72	6,34	5,75	5,38	5,15	5,48
<b>24.a</b>	6,68	6,38	5,69	5,35	5,13	5,67
<b>24.b</b>	6,69	6,35	5,75	5,36	5,17	5,56
<b>31.a</b>	6,71	6,07	5,5	5,30	5,15	5,62
<b>31.b</b>	6,75	6,08	5,55	5,27	5,10	5,66
<b>33.a</b>	6,79	6,31	5,67	5,34	5,29	5,82
<b>33.b</b>	6,76	6,23	5,62	5,33	5,31	5,90

### APÊNDICE B - Dados da cinética com meio sintético utilizando xilose

As tabelas abaixo apresentam os valores de concentração de 2,3-BD, concentração de xilose, densidade ótica e pH para cada alíquota coletada. Os índices a e b correspondem ao mesmo microrganismo e indicam que os dados foram coletados em duplicata.

**Tabela 1 – Concentração de 2,3-BD (g.L<sup>-1</sup>)**

Amostras	Tempo (h)					
	0	3	6	9	12	24
1.a	0	0	0,19	0,53	2,01	5,37
1.b	0	0	0,23	0,7	2,01	5,37
5.a	0	0	0	0,54	1,02	3,2
5.b	0	0	0,22	0,61	2,33	3,82
15.a	0	0	0,2	0,42	0,75	2,95
15.b	0	0	0,16	0,64	0,39	2,49
24.a	0	0	0,23	0,52	0,89	0,68
24.b	0	0	2,2	0,64	0,75	2,92
31.a	0	0	0,23	0,94	0,83	5,15
31.b	0	0	0,31	1	1,12	6,24
33.a	0	0	0,25	0,75	1,17	2,95
33.b	0	0	0,24	0,84	1,58	5,15

O teste F apresentou um valor calculado de 0,200038, inferior ao valor crítico de 2,533554. Portanto, não há diferença significativa para a produção de 2,3-BD entre os diferentes microrganismos.

**Tabela 2 – Concentração de xilose (g.L<sup>-1</sup>)**

Amostras	Tempo (h)					
	0	3	6	9	12	24
1.a	26,786	14,41	15,87	8,93	20,03	3,04
1.b	26,786	11,79	19,84	12,62	20,03	3,68
5.a	26,786	18,29	17,39	14,46	13,91	3,55
5.b	26,786	15,95	17,39	14,68	9,75	3,63
15.a	26,786	20,10	13,95	10,78	13,52	9,54
15.b	26,786	18,81	8,18	18,41	13,52	8,6
24.a	26,786	15,36	19,75	16,25	16,55	6,98
24.b	26,786	14,80	16,4	14,55	20,36	7,66
31.a	26,786	13,80	15,51	17,25	7,09	2,8
31.b	26,786	11,74	17,78	16,68	10,22	2,45
33.a	26,786	14,15	17,05	14,7	8,88	2,64
33.b	26,786	14,85	17,22	14,21	15,89	2,54

O teste F apresentou um valor calculado de 0,098299, inferior ao valor crítico de 2,533554. Portanto, não há diferença significativa para o consumo de xilose entre os diferentes microrganismos.

**Tabela 3 – Densidade ótica (600 nm)**

Amostras	Tempo (h)					
	0	3	6	9	12	24
1.a	0,418	0,702	1,728	2,760	3,405	6,48
1.b	0,42	0,782	1,716	2,711	2,935	5,5
5.a	0,404	0,487	1,716	2,997	3,955	5,77
5.b	0,415	0,575	1,812	2,520	3,87	5,965
15.a	0,431	0,753	1,42	2,274	2,63	5,985
15.b	0,426	0,776	1,424	2,257	3,15	6,045
24.a	0,43	0,742	1,37	2,054	2,7	4,925
24.b	0,442	0,718	1,414	2,034	2,465	5,23
31.a	0,431	0,849	1,82	2,754	3,19	5,575
31.b	0,442	0,903	1,882	2,877	3,76	6,2
33.a	0,439	0,779	1,694	2,588	3,045	5,745
33.b	0,45	0,784	1,99	2,843	3,74	5,59

**Tabela 4 – Potencial hidrogeniônico (pH)**

Amostras	Tempo (h)					
	0	3	6	9	12	24
1.a	6,37	6,29	5,86	5,56	5,38	4,45
1.b	6,33	6,24	5,79	5,54	5,42	4,43
5.a	6,33	6,32	5,8	5,51	5,35	4,27
5.b	6,3	6,27	5,85	5,50	5,34	4,22
15.a	6,3	6,28	6	5,70	5,56	5,10
15.b	6,32	6,25	5,97	5,67	5,52	5,15
24.a	6,28	6,31	6,06	5,78	5,65	5,07
24.b	6,27	6,27	5,97	5,74	5,69	5,13
31.a	6,29	6,3	5,86	5,64	5,49	4,65
31.b	6,3	6,19	5,76	5,52	5,59	4,61
33.a	6,26	6,26	5,8	5,60	5,57	4,68
33.b	6,32	6,21	5,72	5,53	5,51	4,61