



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

THALITA CARDOSO NEVES

PRODUÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DO  
HIDROLISADO HEMICELÓSICO DO BAGAÇO DE CANA DE  
AÇÚCAR ENRIQUECIDO COM MELAÇO

2,3-BUTANEDIOL PRODUCTION FROM HEMICELLULOSIC  
HYDROLYSATE OF SUGARCANE BAGASSE MIXED WITH  
MOLASSES

CAMPINAS  
2021

THALITA CARDOSO NEVES

PRODUÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DO  
HIDROLISADO HEMICELÓSICO DO BAGAÇO DE CANA DE  
AÇÚCAR ENRIQUECIDO COM MELAÇO

*Dissertação apresentada à Faculdade  
de Engenharia Química da  
Universidade Estadual de Campinas  
como parte dos requisitos exigidos para  
a obtenção do título de Mestra em  
Engenharia Química.*

Orientador: Prof. Dr. Adriano Pinto Mariano

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA  
PELA ALUNA THALITA CARDOSO NEVES E  
ORIENTADA PELO PROF. DR. ADRIANO PINTO  
MARIANO.

CAMPINAS  
2021

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

N414p Neves, Thalita Cardoso, 1993-  
Produção de 2,3-butanodiol a partir do hidrolisado hemicelulósico do  
bagaço de cana de açúcar enriquecido com melaço. / Thalita Cardoso Neves. –  
Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Adriano Pinto Mariano.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade  
de Engenharia Química.

1. Melaço. 2. Cana-de-açúcar. 3. Fermentação. I. Mariano, Adriano Pinto,  
1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia  
Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** 2,3-butenodiol production from hemicellulosic hydrolysate of  
sugarcane bagasse mixed with molasses

**Palavras-chave em inglês:**

Molasses  
Sugarcane  
Fermentation

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Titulação:** Mestra em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Adriano Pinto Mariano [Orientador]  
Carlos Eduardo Vaz Rossell  
Fernando Masarin

**Data de defesa:** 18-03-2021

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3582-0864>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0326206221760087>

Folha de Aprovação da Dissertação de Mestrado da aluna **THALITA CARDOSO NEVES** RA: 211750 e aprovada em 18 de março de 2021 pela comissão examinadora da defesa constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Adriano Pinto Mariano - Presidente e Orientador  
FEQ / UNICAMP – Campinas – SP  
Videoconferência

Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossell  
Centro de Ciência e Tecnologia do Bioetanol / Campinas  
Videoconferência

Dr. Fernando Masarin  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Campus de Araraquara  
Videoconferência

A Ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Sônia e Flávio, que não pouparam esforços para tornararem todos meus sonhos realidade.

A Deus pela força e resiliência durante as tempestades.

Aos amigos de laboratório e aqueles que conquistei durante esta caminhada. A Laura e Carla pelos pequenos detalhes e companheirismo que fizeram toda a diferença. Ao Gustavo, Paula, Lucas e Diogo pelos momentos e memórias.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processos **(2018)/(23983-3)** e **(2015)/20630-4** pelo financiamento do projeto de pesquisa, tornando possível a produção desta dissertação.

Ao professor e orientador Adriano, deixo meu agradecimento e minha admiração, pelo profissionalismo e confiança no meu trabalho durante todas as etapas do mestrado.

A todos os professores que participaram de minha jornada acadêmica por todos os ensinamentos transmitidos.

À minha família por estarem sempre presentes mesmo com a distância.

Por fim, a todos que participaram direta e indiretamente da minha caminhada durante o mestrado.

## RESUMO

O 2,3-butanodiol (2,3-BDO) é um álcool biodegradável com diversas aplicações industriais. Além de ser uma plataforma química para fabricação de aditivos, solventes, resinas, pode ser convertido em 1,3-butadieno, monômero da borracha sintética. Atualmente, 2,3-BDO é produzido por via química a qual é dependente de fontes fósseis. Devido à redução contínua da oferta das mesmas, novas rotas produtivas tornam-se necessárias. Neste contexto, a produção deste álcool por via biotecnológica é uma solução atrativa tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico. Entretanto, para viabilizar este bioprocessos, ainda são necessários avanços ligados ao melhoramento genético e à redução dos custos, portanto a seleção da matéria-prima é um fator relevante para o processo. Para solucionar estas questões, este trabalho propôs a utilização do microrganismo *Paenibacillus polymyxa* DSM 365, não patogênico e um dos mais promissores de sua classe. Além disso, buscou-se a utilização do licor hemicelulósico do bagaço e melão de cana de açúcar, matérias primas abundantes no Brasil. O melão mostrou-se um substrato promissor do ponto de vista fermentativo em comparação com meio sintético composto por sacarose, substrato majoritário do melão, ambos atingiram rendimento de 0,26 e produção de 2,3-butanodiol de 11,30 g.L<sup>-1</sup> para o melão e 13,28 g.L<sup>-1</sup> para o meio sintético, as conversões de açúcares foram de 84% para o primeiro e 94% para o segundo, em fermentações em batelada. O processo de batelada alimentada, foi utilizado com o objetivo de reduzir o efeito dos inibidores presentes no hidrolisado, este foi iniciado com melão e a alimentação com hidrolisado foi conduzida em diferentes proporções, entretanto o processo fermentativo não evoluiu após a alimentação, independente da concentração alimentada. Apesar de *P. polymyxa* ter apresentado bom rendimento para a assimilação do melão, mais estudos precisam ser realizados em relação a assimilação dos componentes do hidrolisado. Todavia, foi possível identificar papéis importantes desempenhados pelo fator temperatura na alteração da viscosidade do meio, provavelmente em razão da produção de exopolissacarídeos, apontados como principais responsáveis pelo aumento de viscosidade e conseqüente obstáculo para aplicação de técnicas de *downstream*, estas alterações foram visíveis a temperaturas menores que 35°C.

**Palavras-chave:** butanodiol, bagaço, cana-de-açúcar, hemicelulósico, fermentação.

## ABSTRACT

2,3-butanediol (2,3-BDO) is biodegradable alcohol with various industrial applications. This alcohol is a chemical platform for additives, solvents, resins, and can also be converted to 1,3-butadiene, the synthetic rubber monomer. Currently, 2,3-BDO is produced chemically, this process is dependent on fossil sources. Because of the continuous reduction of their supply, new productive routes become necessary. In this context, the biotechnological production of 2,3- BD is an attractive solution from an environmental and economic point of view. However, to make this bioprocess feasible, advances are still needed about genetic improvement and cost reduction, therefore the selection of the feedstock is an important step in this process. To solve these questions, this work proposes the use of the microorganism *Paenibacillus polymyxa* DSM 365, nonpathogenic and one of the most promising in its class. Also, bagasse hydrolysate and sugar cane molasses were applied as a carbon source, raw materials abundant in Brazil. Molasses proved to be a promising substrate from a fermentative point of view compared to a synthetic medium composed of sucrose, the major sugar in molasses, both reached a yield of 0.26 and 2,3-butanediol production of 11.30 g.L<sup>-1</sup> for molasses and 13.28 g.L<sup>-1</sup> for the synthetic medium, sugar conversion was 94% for synthetic medium and 84% for molasses in batch fermentations. The fed-batch process was applied to reduce the effect of the inherent hydrolysate inhibitors, the process started with molasses, and then fed with hydrolysate in different proportions. However, the fermentative process stopped after feeding, regardless of the substrate concentration. Although *P. polymyxa* has shown good performance for the molasses assimilation, more studies need to be done regarding the assimilation of the components of the hydrolysate. However, it was possible to identify important roles played by the temperature in changing the viscosity of the medium, probably due to the production of exopolysaccharides, identified as the main responsible for the increase in viscosity and consequent obstacle downstream techniques, these changes were visible at temperatures below 35°C.

**Keywords:** butanediol, bagasse, sugarcane, hemicellulosic, fermentation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Produção de 2,3-butanodiol integrada a uma biorrefinaria de cana-de-açúcar .....	15
Figura 2. Formas isoméricas do 2,3-butanodiol: levogiro, meso e dextrógiro, respectivamente .....	17
Figura 3. Algumas aplicações de 2,3-butanodiol e seus derivados.....	18
Figura 4. Rota metabólica para a fermentação ácido-mista. ....	21
Figura 5. Paenibacillus polymyxa OSY-DF vista por microscopia eletrônica .....	35
Figura 6. Visualização macro da metodologia experimental .....	40
Figura 7. Cinética das fermentações em frasco agitado para diferentes parâmetros de agitação, temperatura e concentração de DAP. Experimentos A,B,C. ....	48
Figura 8. Cinética das fermentações em frasco agitado para diferentes parâmetros de agitação, temperatura e concentração de DAP. Experimentos D, E e F. ....	49
Figura 9. Cinética das fermentações em frasco agitado para diferentes parâmetros de agitação, temperatura e concentração de DAP. Experimentos G, H e I. ....	50
Figura 10. Gráficos de probabilidade normal para as respostas do planejamento fatorial. a) Rendimento b) Conversão c) Concentração máxima de levo-2,3-butanodiol.....	53
Figura 11. Gráficos de pareto para as respostas do planejamento fatorial. a) Rendimento b) Conversão c) Concentração máxima de levo-2,3-butanodiol .....	54
Figura 12. Gráfico dos valores preditos versus observados para as respostas do planejamento fatorial. a) Rendimento b) Conversão c) Concentração máxima de levo-2,3-butanodiol .....	59
Figura 13. Superfícies de resposta para as respostas do planejamento fatorial. a) Rendimento b) Conversão c) Concentração máxima de levo-2,3-butanodiol .....	60
Figura 14 Aumento da viscosidade do meio nas temperaturas de 32°C e 35°C .....	61



Figura 15. Parâmetros cinéticos dos ensaios pré-selecionados E,F,G e H. (a) Concentração máxima de Levo-2,3-butanodiol (b) Rendimento de levo-2,3- butanodiol; (c) Produtividade ; (d) Consumo de açúcares.....	63
Figura 16 Parâmetros cinéticos dos ensaios H e S. (a) Concentração máxima de Levo-2,3-butanodiol. ....	64
Figura 17. Parâmetros cinéticos dos ensaios H e S. (b) Produtividade; (c) Rendimento de levo-2,3-butanodiol; (d) Consumo de açúcares.....	65
Figura 18. Cinética de consumo dos açúcares: frutose, glicose e sacarose (Ensaio 1-G, 2-S, 3-F e 4-X).....	67
Figura 19. Cinética do consumo de xilose em presença de outros açúcares. Ensaio 5-GX, 6-SX e 7-FX.....	69
Figura 20. Fração de coprodutos nos ensaios conduzidos em meios sintéticos. ....	71
Figura 21. Perfil de consumo de açúcares e produção de levo-2,3- butanodiol para fermentação com melaço nas condições do ensaio S (38°C, 260 rpm) .....	72
Figura 22. Comparativo dos parâmetros cinéticos das fermentações em meio sintético com sacarose e melaço.....	73
Figura 23. Formação de co-produtos no meio sintético e melaço (Ensaio 2- S e S) .....	74
Figura 24. Cinética da fermentação para batelada alimentada. Experimento I (1:2); II (1:1) e III (2:1). ....	78
Figura 25 (cont.). Cinética da fermentação para batelada alimentada. Experimento I (1:2); II (1:1) e III (2:1). ....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Microrganismos produtores de 2,3-butanodiol. ....	19
Tabela 2. Alguns microrganismos e substratos empregados para produção de 2,3-butanodiol.....	22
Tabela 3. Variáveis do planejamento fatorial para análise da fermentabilidade do melão .....	42
Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial.....	42
Tabela 5. Parâmetros cinéticos dos ensaios do planejamento fatorial. ....	51
Tabela 6. Efeitos e coeficientes do modelo do planejamento fatorial para a resposta rendimento.....	55
Tabela 7. Análise ANOVA para resposta rendimento $Y_{P/S}$ .....	56
Tabela 8. Efeitos e coeficientes do modelo do planejamento fatorial para a resposta conversão de açúcares.....	56
Tabela 9. Análise ANOVA para resposta conversão de açúcares C%.....	57
Tabela 10. Efeitos e coeficientes do modelo do planejamento fatorial para a resposta concentração de levo-2,3-butanodiol.....	57
Tabela 11. Análise ANOVA para resposta concentração máxima de levo-2,3-butanodiol.....	58
Tabela 12. Parâmetros cinéticos dos ensaios H e S. ....	66
Tabela 13. Planejamento dos ensaios com açúcares puros em meio sintético .....	66
Tabela 14. Parâmetros cinéticos para os ensaios com açúcares puros em meio sintético. ....	68
Tabela 15. Delineamento dos experimentos em batelada alimentada .....	76
Tabela 16. Concentração dos inibidores após a diluição calculados por balanço de massa .....	77
Tabela 17. Parâmetros cinéticos para o experimento de batelada alimentada até o momento da alimentação.....	80

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO .....	13
OBJETIVOS .....	16
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1 2,3-BUTANODIOL .....	17
2.2 SÍNTESE DE 2,3-BUTANODIOL .....	18
2.2.1 Síntese química.....	18
2.2.2 Biossíntese.....	19
2.3 MICRORGANISMOS.....	19
2.4 ROTA METABÓLICA .....	20
2.5 SUBSTRATOS .....	22
2.6 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA .....	23
2.7 MÉTODOS DE DESTOXIFICAÇÃO .....	25
2.8 FATORES QUE AFETAM O RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL .....	26
2.8.1 Temperatura.....	27
2.8.2. Agitação e Aeração .....	27
2.8.3 Composição do meio de cultura .....	29
2.8.4 Potencial hidrogeniônico (pH) .....	32
2.8.5 Modo de operação do processo .....	32
2.9 PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO DO PRODUTO .....	33
2.10 P. POLYMYXA COMO PRODUTORA DE 2,3-BUTANODIOL.....	34
2.11 BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E MELAÇO COMO MATÉRIAS PRIMAS PARA PRODUÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL .....	36
2.12 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
CAPÍTULO 3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....	39
3.1 PREPARO DO INÓCULO .....	41
3.2 AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DO MELAÇO.....	41
3.2.1 Planejamento fatorial.....	42
3.3 FERMENTAÇÃO EM MEIO SINTÉTICO COM AÇÚCARES PUROS .....	42
3.4 AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR.....	43
3.4.1 Pré-tratamento ácido.....	43
3.4.2 Fermentação com hidrolisado bruto e destoxificado (overliming)..	43
3.5 FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA .....	44
3.6 MÉTODOS DE ANALÍTICOS .....	44
3.6.1 Análise de açúcares e produtos .....	44
3.6.2 Parâmetros Fermentativos .....	45

CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DO MELAÇO.....	47
4.1.1 Formação de EPS .....	61
4.1.2 Seleção dos parâmetros experimentais .....	62
4.2 Fermentação em meio sintético com açúcares puros .....	66
4.3 COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DA FERMENTAÇÃO COM MEIO CONTENDO MELAÇO VERSUS MEIO SINTÉTICO. ....	72
4.4 AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO PURO E DESTOXIFICADO VIA OVERLIMING.....	75
4.5 FERMENTAÇÕES EM BATELADA ALIMENTADA .....	76
4.6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	81
CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES .....	82
REFERÊNCIAS.....	83

## CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

O 2,3-butanodiol (2,3-BDO) destaca-se por seu potencial para síntese de 1,3-butadieno, monômero da borracha sintética. A produção de 2,3-BDO por processo biotecnológico foi realizada pela primeira vez durante a segunda guerra mundial, momento em que o suprimento de borracha sintética se tornou necessário. Entretanto, com o desenvolvimento da rota química o processo fermentativo se tornou economicamente inviável (JI; HUANG; OUYANG, 2011). Por via química este é produzido por hidrólise de hidrocarbonetos obtidos pelo craqueamento do butano e 2-buteno, ambos derivados de fontes fósseis (ROBERTSON; MITCHELL, 1954).

Apesar dos benefícios da produção de 2,3-BDO por via fermentativa, os custos do processo ainda são fatores limitantes para sua aplicação. Os maiores custos estão relacionados a utilização de nutrientes complexos para formulação dos meios de cultura, ao preço da matéria prima e a baixa eficiência da fermentação (KOUTINAS *et al.*, 2016). Desta forma, diversos estudos têm apresentado processos para fermentação de açúcares obtidos de fontes de carbono baratas e abundantes, dentre estes substratos podem-se citar hidrolisados lignocelulósicos (CHENG *et al.*, 2010; JIANG; FANG; YANG, 2012), glicerol derivado do biodiesel (METSOVITI *et al.*, 2012), gás residual industrial (KÖPKE *et al.*, 2011) e melão (DAI *et al.*, 2015; JUNG *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2010).

A maioria dos microrganismos empregados para a produção deste álcool são patogênicos (Classe 2), indesejáveis para uma fermentação em escala industrial. As bactérias que apresentaram maiores rendimentos até o momento são *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Enterobacter aerogenes*. Microrganismos não patogênicos (Classe 1) já foram reportados na literatura, todavia a eficiência do processo foi reduzida (CELÍNSKA; GRAJEK, 2009). Estudos mostram que a estirpe *P. polymyxa* é uma produtora promissora e não patogênica, produzindo o isômero levogiro (R,R-2,3-butanodiol) com até 98% de pureza, este isômero é um importante “*building block*” para a indústria farmacêutica, para compostos agrícolas e para cristais líquidos, além de ter emprego direto como anticongelante. No que se refere aos substratos, *P. polymyxa* utiliza como fonte de carbono diversos açúcares como xilose, sacarose, amido, e inulina, que podem ser extraídos de resíduos agroindustriais (GAO *et al.*, 2010; HÄBLER *et al.*, 2012; JI; HUANG; OUYANG, 2011; MARWOTO *et al.*, 2002; YAN; LEE; LIAO, 2009).

A conversão da fração hemicelulósica do bagaço em 2,3-butanodiol para obtenção de 1,3-butadieno visando a produção de borrachas de butadieno (PBR) pode ser interessante para empresas do setor sucroenergético interessadas em ampliar sua carteira de produtos. No contexto internacional, o suprimento de butadieno para indústrias de borrachas vem diminuindo devido a mudanças na indústria petroquímica ligadas a substituição da nafta pelo gás natural de xisto (*shale gas*) no processo de obtenção de olefinas leves (etileno e propeno). O menor preço e a maior disponibilidade do gás em relação a nafta do petróleo têm tornado o primeiro mais atrativo para este processo, reduzido a oferta de butadieno, já que menores quantidades deste são obtidas quando a matéria prima é o gás (HANES, 2017). No Brasil, a oferta de butadieno pode diminuir devido a exploração do petróleo pesado das reservas do pré-sal, estas possuem grandes reservas de gás natural e o refino deste petróleo produz menores quantidades de nafta (MEIRELLES; SILVA; RAJAGOPAL, 2014).

Devido a redução da disponibilidade de butadieno, indústrias estão buscando rotas alternativas para fabricação de moléculas C<sub>4</sub>, dentre as base biotecnológica podem-se citar a conversão de bioetanol em butadieno através do processo de Lebedev; a conversão de biobutanol em butenos e em seguida em butadieno por desidrogenação oxidativa e conversão de 2,3 butanodiol em butadieno por desidratação (ICIS, 2011).

A implementação do processo produtivo de butanodiol a partir de biomassas lignocelulósicas ainda é dependente do aumento da eficiência de algumas etapas. Durante alguns tipos de pré-tratamentos utilizados para quebra da biomassa são gerados inibidores que reduzem o rendimento da fermentação, além disto a concentração de substrato, produto, condições de aeração, temperatura e agitação também são fatores limitantes para o crescimento microbiano (JI; HUANG; OUYANG, 2011). Em se tratando de hidrolisados hemicelulósicos, a corrente empregada é geralmente diluída, contendo aproximadamente 20-30 g.L<sup>-1</sup> xilose. Desta forma, uma etapa de evaporação é empregada para ajustar a concentração de açúcares, gerando maior gasto energético e concentração de inibidores, principalmente dos não voláteis (fenólicos).

Este trabalho propõe a utilização do melaço (subproduto da produção de açúcar), para elevar a concentração de açúcares no hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana de açúcar para ao mesmo tempo em que fornece grande parte dos

nutrientes necessários para a suplementação do meio de cultura (Figura 1). O microrganismo *P. polymyxa* DSM 365 foi empregado como agente fermentador, devido ao crescente interesse no emprego de microrganismos de classe 1 neste processo. Espera-se eliminar a necessidade de tratamentos para destoxificação através de um processo de batelada alimentada, com alimentação iniciada com melaço diluído e posterior alimentação com hidrolisado. Uma possível aplicação para este processo seria a de inserir a cana de açúcar na cadeia de valor para produção de borrachas tornando o processo atrativo para o usineiro e para as empresas químicas responsáveis pela conversão do 2,3-butanodiol em 1,3-butadieno.

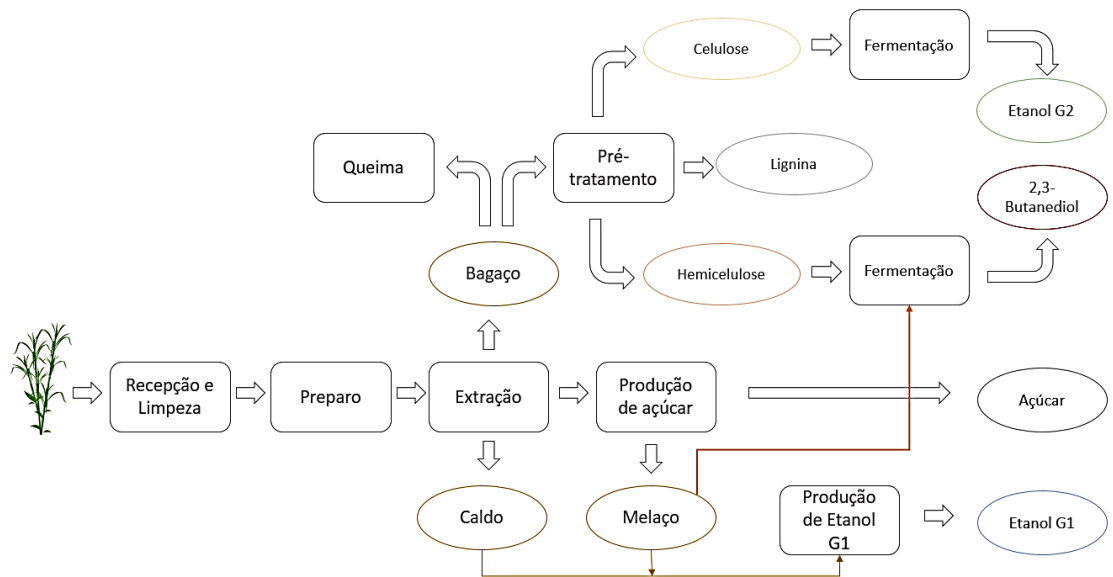


Figura 1. Produção de 2,3-butanodiol integrada a uma biorrefinaria de cana-de-açúcar

## Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção do isômero levogiro do 2,3-butanodiol por *P. polymyxa* DSM 365 utilizando como substrato o melaço e o bagaço de cana de açúcar, matérias primas de baixo custo e abundantes no Brasil.

### Objetivos Específicos:

Avaliar:

- A fermentabilidade do melaço e do hidrolisado hemicelulósico isoladamente (bruto e destoxificado via *overliming*).
- A influência dos fatores temperatura, agitação e suplementação com DAP no desempenho fermentativo.
- A performance do melaço frente a um meio de cultura sintético ótimo descrito pela literatura.
- O desempenho da fermentação em batelada alimentada utilizando hidrolisado hemicelulósico e melaço.

Esta dissertação está estruturada em 5 capítulos. Inicia-se com o presente capítulo onde é apresentada uma introdução do assunto e os objetivos desta pesquisa. O Capítulo 2 contém uma revisão bibliográfica com os principais conceitos e trabalhos na área. O Capítulo 3 descreve os materiais e métodos empregados para o desenvolvimento experimental desta pesquisa. O Capítulo 4 disserta sobre os resultados e discussões do trabalho. Por fim, o Capítulo 5 trata sobre as conclusões.



## CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo foi apresentada uma fundamentação teórica dos principais conceitos e trabalhos relacionados a produção de 2,3-butanodiol.

### 2.1 2,3-butanodiol

O 2,3-Butanodiol ( $C_4H_{10}O_2$ ) é um álcool quiral também denominado 2,3-butilenoglicol, dimetilenoglicol, 2,3-di-hidroxi-butano e butano-2,3-diol (nomenclatura IUPAC). Tem peso molecular de  $90,212 \text{ g.mol}^{-1}$ , é incolor, inodoro, higroscópico, hidrossolúvel e possui sabor adocicado. Pode ser encontrado em três formas estereoisoméricas (Figura 2), em sua forma meso, opticamente inativa (R, S)-2,3-BDO e em duas formas opticamente ativas, levogira [(2R, 3R)-2,3-BDO ou D - (-) -] e dextrogira [(2S, 3S)-2,3-BDO ou L - (+) -]. O ponto de ebulição é dependente da conformação isomérica, para as formas dextrogira e levogira este é  $178 \text{ }^\circ\text{C}$ , para a forma meso é  $182 \text{ }^\circ\text{C}$  e para uma mistura dos isômeros este se encontra em uma faixa intermediária de acordo com a composição da mesma (GRÄFJE *et al.*, 2000; CELIŃSKA; GRAJEK, 2009).

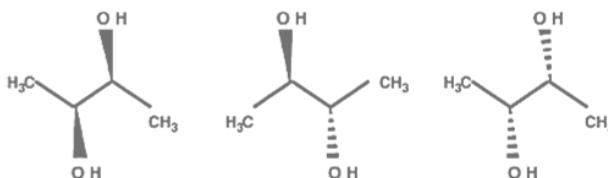


Figura 2. Formas isoméricas do 2,3-butanodiol: levogiro, meso e dextrogiro, respectivamente

Além de ser um precursor para a síntese de 1,3-butadieno, o 2,3-BDO e seus derivados podem ter outras aplicações industriais (Figura 3). Este produto pode ser aplicado na síntese de metil-etil-cetona (MEK), aditivo de combustível, pois possui maior calor de combustão quando comparado ao etanol (CELIŃSKA; GRAJEK, 2009). Além disto, devido a sua baixa temperatura de congelamento ( $-60 \text{ }^\circ\text{C}$ ) pode ser utilizado como anticongelante (SOLTYS; BATTÀ; KONERU, 2001). Também pode ser empregado como aditivo de tintas, solvente para resinas e matéria prima para produção de acetoína,

diacetil e flavorizantes para industriais alimentícias (CELIŃSKA; GRAJEK, 2009; JI; HUANG; OUYANG, 2011).

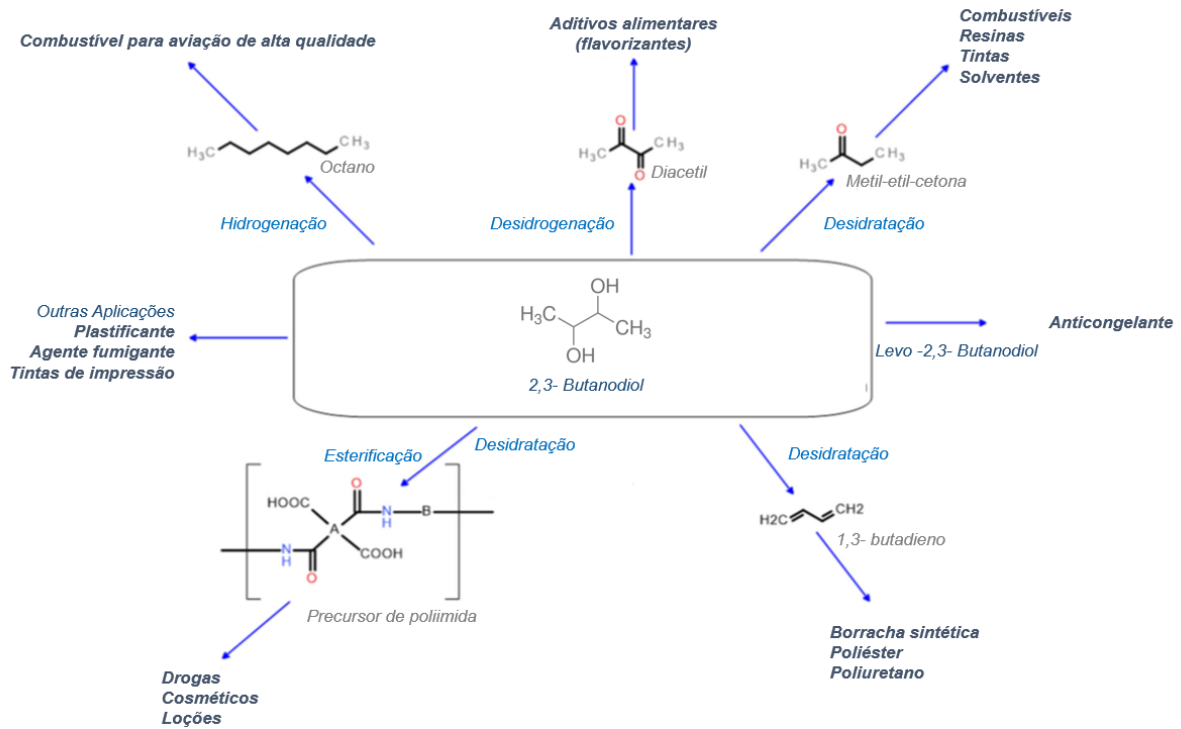


Figura 3. Algumas aplicações de 2,3-butanodiol e seus derivados.

Adaptado de Białkowska (2016a).

## 2.2 Síntese de 2,3–butanodiol

O 2,3-butanodiol pode ser obtido por síntese química, através da conversão de hidrocarbonetos, ou por via biotecnológica, onde microrganismos são os responsáveis pela conversão dos açúcares em produto.

### 2.2.1 Síntese química

A síntese química de 2,3-butanodiol utiliza a fração de hidrocarbonetos C4 obtida dos gases de craqueamento após a remoção do butadieno e o isobuteno. Esta fração contém até 77% de butenos e 23% de uma mistura de butano e isobutano. A fração de hidrocarbonetos C4 é submetida a uma etapa de cloração, formando cloro-hidrinas que são posteriormente ciclizadas com hidróxido de sódio, resultando em mistura de 55% de óxido de trans-2,3-buteno, 30% de óxido de cis-2, 3-buteno e 15% de óxido de 1,2-

buteno. Em seguida, os butanodiolos são obtidos através de uma etapa de hidrólise a 160-220 °C e 50 bar e são separados por fracionamento a vácuo. Durante o fracionamento, o óxido trans-2,3-buteno é convertido em meso-2,3-BDO, enquanto que a conversão do óxido cis-2,3-butano produz uma mistura racêmica de [2R, 3R] - e [2S, 3S] - 2,3-BDO (GRÄFJE *et al.*, 2000).

### 2.2.2 Biossíntese

A biossíntese de 2,3-butanodiol consiste na conversão do piruvato neste produto em uma fermentação ácido mista. Diversos microrganismos e substratos podem ser utilizados para este fim.

### 2.3 Microrganismos

Vários organismos são capazes de produzir 2,3-BDO (Tabela 1), mas nem todas o fazem em quantidades significativas, as bactérias de maior importância industrial são as do gênero *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* e *Serratia*. Leveduras e microalgas também são capazes de produzir este álcool, entretanto o rendimento é extremamente baixo. O isômero de 2,3-BDO produzido é dependente do microrganismo empregado; no entanto, geralmente é formada uma mistura de dois estereoisômeros (CELIŃSKA; GRAJEK, 2009).

Tabela 1. Microrganismos produtores de 2,3-butanodiol.

Tipo de microrganismo	Nome do microrganismo
Bactéria ou cianobactéria	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>Klebsiella terrigena</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>P. polymyxa</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Aeromonas hydrophilia</i> , <i>Aerobacter aerogenes</i> , <i>Brevibacillus brevis</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. s. lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetyllactis</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Oenococcus oeni</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Raoultella planticola</i> , <i>Morganella morgani</i> , <i>Pantoea sp.</i> , <i>Serratia plymuthica</i> , <i>Clostridium autoethanogenum</i> , <i>C. ljungdahlii</i> , <i>C. ragsdalei</i> , <i>P. chlororaphis</i> 06, <i>Escherichia coli</i> , <i>Synechocystis sp.</i> , <i>S. elongatus</i>
Levedura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Saccharomyces ludwigii</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i>
Microalga marinha	<i>Chlamydomonas perigranulata</i>

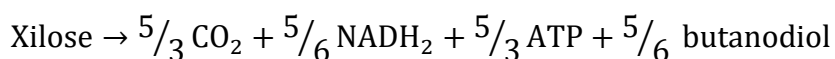
Adaptado de Białkowska (2016a)

As produtoras mais eficientes de 2,3-BDO são *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *P. polymyxa*. Comparativamente, *Klebsiella sp.* (Classe 2) geralmente produz cerca de duas vezes mais a quantidade de 2,3-BDO que pode ser obtida por *P. polymyxa* (Classe 1), além disto a primeira é de fácil cultivo e cresce rapidamente em um meio simples, metabolizando todos os principais açúcares presentes na hemicelulose e nos hidrolisados de celulose em 2,3-BDO. Entretanto, como esta estirpe é patogênica a produção em grande escala por este microrganismo é dificultada (JANSEN; FLICKINGER; TSAO, 1984). Por outro lado, *P. polymyxa* produz com grande pureza o isômero levogiro, mais suscetível a reações químicas. Também é capaz de fermentar, além dos monossacarídeos presentes nas matérias-primas hemicelulósicas, polímeros de hidratos de carbono como xilano, inulina e amido (MARWOTO *et al.*, 2002). Segundo Celińska e Grajek (2009) são preferíveis para aplicação industrial microrganismos de classe 1, novos ou já conhecidos e melhorados geneticamente, em meios seletivos dedicados à microflora segura, a fim de obter “superprodutores” de 2,3-BDO não patogênicos.

## 2.4 Rota metabólica

No metabolismo bacteriano, os monossacarídeos são convertidos em piruvato antes da geração dos produtos (Figura 4). A partir da glicose, o piruvato é formado seguindo a via Embden-Meyerhof (glicólise). A partir das pentoses a produção de piruvato é dada por uma combinação das vias das pentoses-fosfato e Embden-Meyerhof. O produto da fermentação é uma mistura composta por 2,3-butanodiol, acetato, lactato, formato, succinato, acetoína e etanol. Três enzimas chave estão envolvidas no processo,  $\alpha$ -acetolactato sintase,  $\alpha$ -acetolactatoecarboxilase e 2,3-BDO desidrogenase também chamada acetoína redutase (MAGEE; KOSARIC, 1987).

As equações que descrevem a bioconversão da glicose e da xilose em butanodiol são:



Do carbono total, 1/3 é perdido como dióxido de carbono, enquanto 2/3 são convertidos em 2,3-butanodiol. Em base de mássica, o rendimento de butanodiol a partir da xilose e da glicose é de 50%. O rendimento molar máximo teórico a partir da pentose é de 0,83 e da hexose 1,0 (SINGH; MISHRA, 1995).

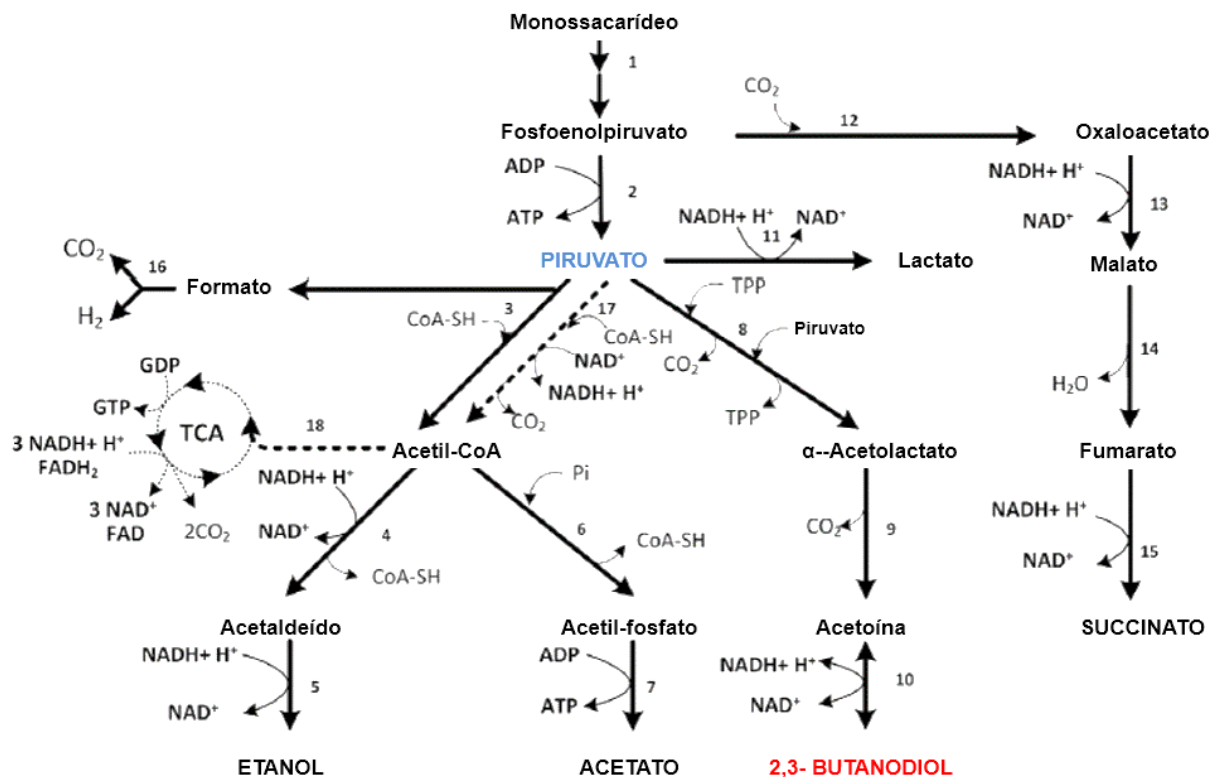


Figura 4. Rota metabólica para a fermentação ácido-mista.

**TCA**, ciclo de ácidos tricarbóxicos; **(1)** enzimas da via de Embden – Meyerhof e pentose fosfato; **(2)** piruvato quinase; **(3)** piruvato-formato liase; **(4)** acetaldeído desidrogenase; **(5)** etanol desidrogenase; **(6)** fosfo-transacetilase; **(7)** acetato quinase; **(8)** α-acetolactato sintase; **(9)** α-acetolactato descarboxilase; **(10)** acetoína redutase (2,3-butanodiol desidrogenase); **(11)** lactato desidrogenase; **(12)** fosfoenolpiruvato descarboxilase; **(13)** malato desidrogenase; **(14)** fumarase; **(15)** succinato desidrogenase; **(16)** complexo formiato-hidrogenasina; **(17)** complexo multi-enzima de piruvato desidrogenase; e **(18)** citrato sintase. Linha tracejada-ativa sob condições aeróbicas.

Adaptado de Ji; Huang & Ouyang (2011)

## 2.5 Substratos

Em grande parte dos processos de conversão de biomassa o substrato é responsável pela maior fração dos custos. Desta forma, é essencial a utilização de matérias primas de baixo custo e alta disponibilidade para a viabilidade do processo. Diversos substratos já foram apresentados na literatura (Tabela 2). A bioconversão de resíduos industriais como glicerol, soro de leite, amido, melação, resíduos agrícolas e hidrolisados de biomassa é uma alternativa para obtenção de bioprodutos a partir de matérias primas mais acessíveis, principalmente devido à resistência à utilização de recursos alimentares em biorrefinarias (CELIŃSKA; GRAJEK, 2009; JI; HUANG; OUYANG, 2011). Os resíduos industriais são divididos em dois grupos: não-celulósicos e lignocelulósicos. A vantagem do primeiro em relação aos lignocelulósicos, é que estas não necessitam de pré-processamento físico-químico ou hidrólise enzimática para a quebra da estrutura vegetal e disponibilização dos açúcares, requerem apenas a suplementação do meio de cultura com pequenas quantidades de sais minerais e fonte de nitrogênio (BIAŁKOWSKA, 2016a).

Tabela 2. Alguns microrganismos e substratos empregados para produção de 2,3-butanodiol.

Microrganismo	Fonte de carbono	Fermentação	Produção de 2,3-BDO (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo de fermentação	Referência
<i>K. pneumoniae</i> CICC10011	Alcachofras de Jerusalém em pó	Batelada alimentada SSF	84,0	40	Sun <i>et al.</i> (2009)
<i>K. pneumoniae</i> CICC10011	Hidrolisado de Alcachofras de Jerusalém	Batelada alimentada SHF	60,95	56	Sun <i>et al.</i> (2009)
<i>K. pneumoniae</i> CICC10011	Hidrolisado do talo e tubérculo de Alcachofras de Jerusalém	Batelada alimentada SSF	67,40	68	Li; Dai & Xiu (2010)
<i>K. pneumoniae</i> G31	Glicerol	Batelada alimentada	70,00	150	Petrov & Petrova (2009)
<i>K. pneumoniae</i> SDM*	Licor de milho	Batelada alimentada	150,00	38	Ma <i>et al.</i> (2009)
<i>K. pneumoniae</i> SDM*	Melaço de espiga de milho	Batelada alimentada	78,90	61	Wang <i>et al.</i> (2010)
<i>K. oxytoca</i> ACCC 10370	Hidrolisado ácido de espiga de milho	Batelada alimentada	35,70	60	Cheng <i>et al.</i> (2010)

Tabela 2. (Cont.): Alguns microrganismos e substratos empregados para produção de 2,3-butanodiol.

<i>K. oxytoca</i> M3**	Glicerol bruto	Batelada alimentada	131,50	100	Cho <i>et al.</i> (2015)
<i>E. cloacae</i> <i>subsp.</i> <i>dissolvens</i> SDM	Farinha de mandioca	Batelada alimentada SSF	93,90	47	Wang <i>et al.</i> (2012)
<i>E. cloacae</i> CGMCC 605*	Melaço de cana de açúcar	Batelada alimentada	99,50	60	Dai <i>et al.</i> (2015)
<i>E. cloacae</i> SDM**	Palha de milho	Batelada alimentada	119,40	51	Li <i>et al.</i> (2015)
<i>E. aerogenes</i> **	Melaço de cana de açúcar	Batelada alimentada	98,69	36	Jung <i>et al.</i> (2013)
<i>E. coli</i> K19 MG 1655**	Hidrolisado de algas marinhas	Batelada alimentada	14,10	45	Mazumdar; Lee & Oh (2013)
<i>B. licheniformis</i> NCIMB 8059	Hidrolisado da polpa de maçã	Batelada alimentada	113,0	163	Białkowska <i>et al.</i> (2015)
<i>B. licheniformis</i> X-10	Hidrolisado da palha de milho	Batelada alimentada	74,0	36	Li <i>et al.</i> (2014a)
<i>B. licheniformis</i> ATCC 14580	Hidrolisado de inulina	Batelada alimentada SSF	103,0	30	Li <i>et al.</i> (2014b)
<i>B. subtilis</i> TUL 322	Melaço de cana de açúcar	Batelada alimentada	75,0	114	Białkowska <i>et al.</i> (2016b)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Melaço de cana de açúcar	Batelada alimentada	60,0	138	Sikora <i>et al.</i> (2016)
<i>B. amyloliquefaciens</i> B10-127**	Glicerol bruto	Batelada alimentada	102,30	88	Yang <i>et al.</i> (2015)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> ZJ-9	Extrato de inulina de alcachofras de Jerusalém	Batelada	36,92	42	Gao <i>et al.</i> (2010)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 365	Meio de cultura sintético	Batelada alimentada	111	54	Häßler <i>et al.</i> (2012)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 365	Meio de cultura sintético	Batelada alimentada	68,54	100	Okonkwo <i>et al.</i> (2017)

Adaptado de Białkowska (2016a)

## 2.6 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

Os pré-tratamentos podem ser classificados em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos. Os pré-tratamentos físicos (trituração, moagem, micro-ondas e extrusão) alteram a estrutura da biomassa aumentando a área superficial e reduzindo o tamanho da partícula, facilitando as etapas posteriores do processo. Já os demais tratamentos são responsáveis pela diminuição da recalcitrância da biomassa, alterando a estrutura da parede celular a fim de permitir a separação das frações celulose, hemicelulose e lignina. Para tal, podem ser utilizados os tratamentos químicos (alcalino,

ácido, oxidativo, organosolve e líquido iônico), físico-químicos (explosão à vapor, hidrotérmico, explosão de fibra de amônia (AFEX), oxidação úmida e explosão com CO<sub>2</sub>) e biológicos (emprego de fungos ou bactérias) ou ainda a combinação dessas técnicas (MOOD *et al.*, 2013).

Os pré-tratamentos catalisados por ácidos (p.ex., sulfúrico, hidrocloreídrico, nítrico) estão entre os reportados como mais efetivos, além de economicamente viáveis. Podem ser empregados ácidos concentrados ou diluídos. Comparativamente, os processos com ácido diluído possuem consumo relativamente baixo, menores problemas relacionados à corrosão de equipamentos e menor consumo de energia para a recuperação de ácidos. Além disto, sob condições controladas, os níveis de inibidores gerados pela degradação dos açúcares também podem ser menores (GÍRIO *et al.*, 2010).

No tratamento ácido podem ser empregadas temperaturas superiores a 160 °C, com baixa carga de sólidos (5-10% (m.m<sup>-1</sup>)), em processo contínuo, ou temperaturas inferiores à de 160 °C, em batelada, com alta carga de sólidos (10-40% (m.m<sup>-1</sup>)). Neste pré-tratamento, principalmente a hemicelulose é hidrolisada, gerando uma fração líquida rica em xilose com baixas concentrações de derivados de lignina. O pré-tratamento com ácido sulfúrico (0,5 a 1,5% (m.v<sup>-1</sup>)) em temperaturas superiores a 160 °C é o mais comumente empregado, devido ao seu alto rendimento em xilose (75-90%) (MONAVARI; GALBE; ZACCHI, 2009; SAHA, 2003).

Em temperaturas elevadas, as pentoses derivadas da hemicelulose e as hexoses (em menores quantidades) são degradadas mais rapidamente, produzindo ácido acético e furfurais. O Furfural é gerado a partir da desidratação de pentoses, enquanto o HMF deriva da desidratação de hexoses, o ácido acético é produto da hidrólise dos grupos acetil da hemicelulose. Geralmente, a inibição por ácidos fracos depende do pKa do ácido e do pH do meio em que se encontram, os ácidos fracos não dissociados podem se difundir através da membrana por serem lipossolúveis causando a diminuição do pH intracelular e conseqüente inibição do metabolismo (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b).



## 2.7 Métodos de destoxificação

A destoxificação do hidrolisado tem por objetivo eliminar ou diminuir a concentração dos inibidores fermentativos, garantindo o crescimento microbiano e as atividades metabólicas. Os tratamentos de destoxificação podem ser químicos (p.ex. ajuste de pH, *overliming*, carvão ativado e resinas de troca iônica), físicos (p.ex. evaporação e separação por membrana) ou biológicos (p.ex. enzimas) e podem ser aplicados isoladamente ou combinados (MARTÍN *et al.*, 2012; PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000b). As técnicas de separação por membranas (GRZENIA; SCHELL; WICKRAMASINGHE, 2012), troca iônica (CANILHA *et al.*, 2010), eletrodialise (CHENG *et al.*, 2008), carvão ativado (GUPTA *et al.*, 2017), hidróxido de cálcio (*overliming*) (GUO *et al.*, 2013) e emprego de enzimas (JONSSON *et al.*, 1998) já foram reportadas na literatura para destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos.

A metodologia de evaporação a vácuo reduz as concentrações de compostos voláteis, como ácido acético e furfural, todavia, as quantidades de substâncias tóxicas como extrativos, HMF e derivados da lignina aumentam, isto porque a volatilização parcial ou degradação de compostos pode acontecer durante o processo. Em grande parte dos processos esta etapa é necessária, pois também eleva a concentração de açúcares presentes no hidrolisado lignocelulósico (DE CARVALHO *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2001).

A destoxificação por *overliming* tem sido amplamente utilizada devido ao seu baixo custo e boa eficiência na remoção de compostos tóxicos em hidrolisados ácidos. Este tratamento químico consiste na elevação do pH para 9-12 a partir da adição de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ), nesta etapa alguns inibidores são precipitados, em seguida o pH é ajustado com adição de ácido sulfúrico e fosfórico até que as condições de fermentação sejam atingidas. Este tratamento não é capaz de remover os ácidos alifáticos, como o acético, fórmico e levulínico, porém a concentração de compostos fenólicos, HMF e furfural pode ser reduzida em aproximadamente 20%. Entretanto, são observadas perdas de açúcares durante o processo (MARTINEZ *et al.*, 2000; MOHAGHEGHI; RUTH; SCHELL, 2006).

Martinez *et al.* (2000) estudaram a otimização da destoxificação dos hidrolisados de bagaço de cana de açúcar por *overliming* e observaram uma redução

substancial de furfural e HMF após o tratamento, todavia as concentrações de ácidos orgânicos não foram alteradas. Após esta etapa, o hidrolisado foi eficientemente fermentado pela *Escherichia coli* LY01. Mohagheghi; Ruth & Schell (2006) ressaltaram que o pH do processo de *overliming* é o fator chave para melhorar a fermentabilidade do hidrolisado, entretanto um pH muito alto destrói alguns dos açúcares disponíveis. Nos experimentos realizados pelos autores utilizando hidrolisado de palha de milho, o pH ideal foi 10, de forma que o pH 11 aumentou a fermentabilidade do hidrolisado, mas também causou perdas consideráveis de xilose.

Nasidi *et al.* (2015) relataram a utilização da combinação dos métodos de *overliming* e carvão ativado para melhoria na produção de etanol a partir de diferentes cultivares de sorgo, a remoção dos inibidores aumentou a produtividade de álcool em 25 % em relação ao hidrolisado não destoxificado. Arruda *et al.* (2008) também estudaram a combinação dos métodos de *overliming* e carvão ativado para o bagaço de cana de açúcar, adicionalmente os autores compararam esta metodologia com o emprego da floculação por polímero vegetal, ambos os tratamentos resultaram em redução da concentração de fenóis totais. Entretanto, o uso de carvão apresentou melhores resultados em relação a remoção de fenóis (88,5%), cerca de 18% a mais que o polímero. Em relação a perda de açúcares, observou-se que está foi relativamente baixa, cerca de 9% para ambos os tratamentos. Desta forma, o tratamento de ajuste de pH associado à adsorção em carvão ativo se mostrou mais eficiente do que a floculação por polímero.

## **2.8 Fatores que afetam o rendimento da fermentação de 2,3-butanodiol**

A eficiência da biossíntese de 2,3-BDO é afetada por diversos parâmetros, dentre estes estão o modo de operação do processo e por fatores como fonte de carbono, aeração, pH e temperatura. Estes podem alterar a produtividade do processo bem como a pureza dos isômeros, desta forma para a produção viável deste produto é importante que estes parâmetros sejam otimizados (JI; HUANG; OUYANG, 2011).

### 2.8.1 Temperatura

Durante o processo de fermentação de 2,3-butanodiol as enzimas desempenham papel importante, pois são componentes chave na rota metabólica dos microrganismos. A temperatura por sua vez, torna-se um parâmetro importante do processo, por influenciar diretamente no mecanismo enzimático e na manutenção da atividade celular (ESENER; ROELS; KOSSEN,1983).

Marwoto *et al.* (2002) estudaram o efeito da temperatura no consumo de glicose e xilose por *P. polymyxa* DSM 365 para produção de 2,3- butanodiol. Foram analisadas fermentações contínuas e em batelada em uma faixa de temperatura de 30 a 39 °C. A temperatura não influenciou de maneira significativa no consumo de glicose, enquanto que melhores rendimentos para a xilose foram encontrados em temperatura de 39 °C. Observou-se ainda que a 30 °C a glicose foi consumida antes da xilose, neste caso o aumento da concentração de glicose inibiu o consumo da xilose, de forma que, esta não foi consumida nem em tempos maiores de fermentação. Além disto, uma maior concentração de 2,3-BDO foi obtida quando foi utilizada uma mistura dos açúcares (100 mM de glicose e 100 mM de xilose) do que quando estes foram empregados puros. As maiores concentrações obtidas para a fermentação em batelada foram 82 mM de butanodiol, 124 mM de etanol e 33 mM de acetato, e para fermentação contínua, 32 mM de butanodiol, 79 mM de etanol, 37 mM acetato e 23 mM de formato. A temperatura também desempenha papel importante na formação de exopolissacarídeos (EPS), são polissacarídeos extracelulares que quando secretados aumentam a viscosidade do meio de cultura, dificultando a agitação, Häßler *et al.* (2012) notaram que é possível diminuir a concentração de EPS com o aumento da temperatura.

### 2.8.2. Agitação e Aeração

O suprimento de oxigênio é a variável mais importante na fermentação 2,3-butanodiol, uma vez que se trata de uma fermentação anaeróbica, o produto é obtido em baixas concentrações de oxigênio (CONVERTI; PEREGO; DEL BORGHI, 2003). A conversão de acetoína em butanodiol é uma reação reversível e a proporção destes é mantida pelo o balanço NAD + / NADH (BLOMQVIST *et al.*, 1993). Em condições

aeróbicas, a enzima  $\alpha$ -acetolactato sintase é irreversivelmente inativada, inibindo a síntese de 2,3-BDO. Entretanto em condições de microaeração a produção deste álcool aumenta (BARRETT *et al.*, 1983; CONVERTI; PEREGO; DEL BORGHI, 2003; NAKASHIMADA *et al.*, 2000).

Segundo Voloch *et al.* (1985) *P. polymyxa* é anaeróbio facultativo, ou seja, obtém energia por respiração e fermentação, de forma que sob restrições no fornecimento de oxigênio, ambos os caminhos estão ativos. A redução da disponibilidade de  $O_2$  aumenta a concentração de produto, pois reduz a respiração, no entanto a concentração celular também é reduzida. Em síntese, a limitação de oxigênio aumenta o rendimento de 2,3-BDO, ao mesmo tempo em que diminui a taxa de conversão global devido a uma menor densidade celular.

Para maximizar a síntese de 2,3-BDO, é necessário um suprimento limitado, mas não nulo, de  $O_2$  (VOLOCH *et al.*, 1985). Isto porque, em geral, na ausência de  $O_2$ , o etanol é produzido em quantidades aproximadamente equimolares com 2,3-BDO, mas também são formados formiato, acetato, lactato e acetoína. Quando a aeração é controlada, a síntese de etanol e formato pode ser evitada e a glicose pode ser inteiramente convertida em 2,3-BDO (MADDOX, 1996). Por fim, um aumento adicional na disponibilidade de  $O_2$  resulta na produção de ácido acético (SYU, 2001). Além disto, se a oferta de  $O_2$  exceder a demanda, os únicos produtos são biomassa e  $CO_2$ . Após períodos de agitação superiores a 20 h, Motiwani *et al.* (1993) observaram uma redução na concentração de 2,3-BDO.

A aeração está diretamente associada à agitação. A agitação promove o aumento da eficiência da fermentação, expondo continuamente novos substratos a cultura ao mesmo tempo em que dissemina os produtos metabólicos pelo meio (GARG; JAIN, 1995). Nakashimada; Kanai & Nishio (1998) reportaram que há uma correlação entre o fornecimento de  $O_2$  e a pureza óptica de 2,3-BDO produzido por *P. polymyxa*, de maneira em que esta diminui significativamente com o aumento da disponibilidade de  $O_2$  durante a fermentação. Os autores mostraram que maiores quantidades do isômero meso foram produzidas quando maiores taxas de oxigênio foram empregadas. A taxa de transferência de oxigênio ideal (OTR) determinada foi de  $6,7 \text{ m.}(\text{mol.h})^{-1}$ , contudo a

pureza óptica da forma levogira foi reduzida para 93% em comparação com 98% sob condições anaeróbicas.

Häßler et al. (2012) estudaram os efeitos da agitação e aeração para produção de butanodiol por *P. polymyxa* DSM 365. Diferentes combinações destes parâmetros foram analisadas para obter uma condição ótima de fermentação em batelada alimentada. Os autores reportaram que estes fatores influenciam no espectro de produtos obtidos. Assim como nos estudos de Nakashimada; Kanai & Nishio (1998) o aumento da taxa de aeração diminuiu a seletividade em relação ao isômero levogiro. Para uma taxa de aeração constante, o aumento da agitação, por exemplo de 300rpm para 500rpm levou ao aumento da concentração de produto. Por outro lado, a combinação de altas taxas de agitação e baixa aeração (p.ex. 650 rpm, 0,1 vvm) também resultou em uma diminuição da seletividade. Os valores ótimos obtidos para agitação e taxa aeração foram de 500 rpm e 0,2 vvm, respectivamente. Os autores ainda propuseram a utilização de uma fase exponencial aeróbica, utilizando diferentes concentrações de extrato de levedura (5 e 30 g.L<sup>-1</sup>), e após o fim desta fase (aproximadamente 8 horas) a agitação e a taxa de oxigênio foram mantidas nos valores ótimos (500 rpm e 0,2 vvm), as taxas de crescimento não foram muito diferentes das encontradas nos experimentos com microaeração, porém, para o meio contendo maior concentração de substrato, a biomassa e o rendimento de produto foram aumentados.

### 2.8.3 Composição do meio de cultura

Nos processos de produção de 2,3-butanodiol, as concentrações iniciais de substrato geralmente variam entre 5 e 10%, estas são baixas devido a presença de substâncias tóxicas nos materiais lignocelulósicos. A concentração ótima de substrato é dependente do tipo de substrato e espécie empregados. Em meios sintéticos suplementados com açúcares puros, como glicose, não há presença de inibidores, e concentrações iniciais de açúcar maiores (até 200 g.L<sup>-1</sup>) podem ser utilizadas. As maiores produtividades de 2,3-BDO ocorrem a concentração inicial de aproximadamente 100 g.L<sup>-1</sup> (CELIŃSKA; GRAJEK, 2009; GARG; JAIN, 1995).

A produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa* utilizando como xilose como substrato foi estudada por Laube; Groleau & Martin (1984), os autores concluíram que o

aumento da concentração inicial de substrato de 1 até 6%, aumentou o rendimento. Os melhores resultados foram atingidos com 4% ou 6% de xilose. No entanto, para concentrações superiores a 10%, a produção foi inibida.

Gao *et al.* (2010) reportaram condições ótimas para composição do meio de cultura para produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa* ZJ-9 utilizando inulinas extraídas de alcachofras de Jerusalém (tupinambo), a concentração ótima de inulina foi de aproximadamente 77 g.L<sup>-1</sup> e a de R,R-2,3-BDO de 36,92 g.L<sup>-1</sup> com mais de 98% de pureza ótica. Dai *et al.* (2015) utilizaram melão como fonte de açúcares a fim de simplificar a suplementação do meio, foi empregado o microrganismo *Enterobacter cloacae* CGMCC 6053 para produção do álcool; o meio otimizado continha apenas cinco componentes, e a concentração de produto obtida foi de aproximadamente 90 g.L<sup>-1</sup> de 2,3-BDO empregando uma concentração inicial de 118 g.L<sup>-1</sup> de melão.

Okonkwo *et al.* (2017) também estudaram a otimização do meio de cultura sintético. Foram obtidas concentrações de 2,3-BDO de aproximadamente 51 g.L<sup>-1</sup> para fermentações em batelada e 68,5 g.L<sup>-1</sup> para batelada alimentada, empregando *P. polymyxa* DSM 365 e concentração de glicose inicial de 120 g.L<sup>-1</sup>. Os autores avaliaram o impacto de sete fatores incluindo triptona, extrato de levedura, acetato de amônio, sulfato de amônio, glicerol, temperatura, e tamanho do inóculo e concluíram que foram três os fatores de maior significância: triptona, tamanho do inóculo e temperatura. Nas condições ótimas do processo (3,5 g.L<sup>-1</sup> de triptona, 9,5% (v.v<sup>-1</sup>) de inóculo e 35 °C) a produção de 2,3-BDO foi de 51,10 g.L<sup>-1</sup> para fermentação em batelada e 68,54 g.L<sup>-1</sup> em batelada alimentada. Além disto, comparado ao meio não otimizado, observou-se uma redução de 19% da concentração de exopolissacarídeos (EPS). Häßler *et al.* (2012) também notaram que a composição do meio tem efeito sobre a formação de EPS, de forma que para meios com baixo suplemento nutricional, são formadas maiores concentrações desse polímero.

A suplementação do meio com acetato também pode ser benéfica para este processo, Nakashimada *et al.* (2000) mostraram que a suplementação com acetato, propionato, piruvato e succinato aumentaram a produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa*, enquanto que a adição de butirato, valerato, formados, lactato e malato não apresentou efeito considerável. Dentre os suplementos adicionados, o acetato (150 mM (0,9%)) foi o

aditivo mais adequado, uma vez que maiores rendimentos ( $0,87 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) foram obtidos. O aumento da concentração de acetato reduziu a formação de etanol, lactato e hidrogênio, todavia concentrações superiores a 200 mM (1,2%) inibiram o crescimento celular e conseqüentemente o rendimento da fermentação.

Extrato de levedura (EL), ureia, sais de amônio e elementos traço também tem efeito sobre o rendimento de 2,3-BDO. Como o nitrogênio é o componente principal das proteínas, este deve ser fornecido em grandes quantidades; na maioria dos casos o EL, é uma fonte de nitrogênio usada para alta produção de 2,3-BDO. No entanto, seu alto custo dificulta sua utilização em grandes quantidades para processos comerciais. Desta forma, novas fontes de nitrogênio, vitaminas e outros suplementos foram estudados e selecionados para substituir o EL, sendo os candidatos potenciais para este fim ureia e sulfato de amônio (LAUBE; GROLEAU; MARTIN, 1984).

Berbert-Molina, Sato & Silveira (2001) mostraram que é possível obter bons rendimentos de 2,3-butanodiol a partir do caldo de cana-de-açúcar suplementando o meio apenas com fosfato diamônio (DAP ou  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ). Os resultados sugeriram que *K. pneumoniae* foi capaz de produzir em meio contendo apenas o DAP quantidades de produto comparáveis aos encontrados em meios complexos. A cinética dos dois processos apresentou-se diferente, no meio simplificado, o crescimento celular foi inicialmente favorecido pelo forte suprimento de oxigênio e pela maior atividade de água, devido à menor concentração de nutrientes. Após 14 h, a limitação em alguns nutrientes levou à interrupção do crescimento celular, e as taxas para formação de produtos e consumo de substrato diminuíram. Na fase estacionária deste meio, a sacarose foi preferencialmente convertida em produto e o substrato foi completamente consumido após 35h. Com o meio complexo, o substrato foi totalmente consumido após 36 h, isto porque a maior concentração inicial de nutrientes reduziu a taxa global do processo, mas manteve o crescimento celular durante um período maior (27 h). Os rendimentos obtidos para ambas as condições foram de 0,40 (produto /sacarose) e produtividades de aproximadamente a  $2,0 \text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ .

A formação de EPS também está associada às fontes de carbono e de nitrogênio utilizadas. Alguns autores citam que compostos como glicose, sacarose,

maltose, lactose, frutose, xilose, xilitol, manitol e Inositol como responsáveis pela síntese deste polímero (BARBOSA et al., 2004).

#### **2.8.4 Potencial hidrogeniônico (pH)**

O pH apresenta efeito significativo na produção de 2,3-butanodiol. Em geral, sob condições alcalinas a formação de ácidos orgânicos é favorecida, reduzindo o rendimento de 2,3-BDO. Por outro lado, em condições ácidas a síntese destes ácidos orgânicos poder ser reduzida em mais de 10 vezes e a de diol aumentada de 3 a 7 vezes. Todavia, o pH ótimo para o processo é dependente do microrganismo e do substrato empregados (GARG; JAIN, 1995). Em grande parte dos processos de fermentação anaeróbica há a formação de ácidos orgânicos, durante este processo o pH da cultura se torna ácido e a concentração de ácidos não dissociados aumenta até o momento em que o crescimento celular é inibido pelos próprios produtos (BIEBL *et al.*, 1998). Além disto, alguns microrganismos podem mudar seu metabolismo para produzir produtos menos tóxicos como álcoois e glicóis (VAN HOUDT; AERTSEN; MICHIELS, 2007). Segundo Maddox (1996) este fenômeno é explicado devido ao fato que a via do 2,3-BDO é induzida pelo acúmulo de produtos ácidos no meio. Desta forma, o gradiente de pH transmembrana causa acúmulo de acetato induzindo as enzimas envolvidas na síntese de 2,3-BDO. Em síntese, a redução do pH da cultura aumenta o gradiente de pH, e a produção de 2,3-BDO ocorre antes que o pH externo se torne muito alto e a cultura seja inativada.

Nakashimada; Kanai & Nishio (1998) mostraram que o pH também tem efeito sobre a pureza ótica do isômero levogiro de 2,3-BDO. O estudo em cultura quimiostática de *P. polymyxa* indicou que o aumento do pH em uma faixa de 5,7 até 6,9 levou a uma maior produção de acetato e menores rendimentos de 2,3-BDO. Por outro lado, a pureza foi menor (94%) em pH 5,7. A maior produção de 2,3-BDO encontrada (aproximadamente 28 mM) foi em pH 6 com pureza ótica de 97%.

#### **2.8.5 Modo de operação do processo**

Alguns modos de operação do processo já foram estudados anteriormente, incluindo batelada, batelada alimentada, sistemas de cultura contínua, com reciclo celular



e com células imobilizadas. Uma concentração mínima de 2,3-BDO de aproximadamente 80 g.L<sup>-1</sup> deve ser atingida para que a recuperação seja economicamente viável (MAGEE; KOSARIC,1987). Por produzir maiores concentrações de 2,3-BDO, o processo em batelada seria o mais indicado em se tratando de escala industrial. Entretanto, existem algumas desvantagens neste modelo, além da baixa produtividade, há alta inibição por substrato. Estes problemas podem ser evitados com o fornecimento de açúcar a uma taxa lenta durante o cultivo, desta forma concentrações elevadas de produto poderiam ser obtidas em batelada alimentada, minimizando os efeitos da inibição por substrato (RAMACHANDRAN; HASHIM; FERNANDEZ,1990). Ma *et al.* (2009) comparou estratégias para produção de 2,3-BDO empregando *K. pneumoniae*, foram estudados modelos com pulso, taxa de alimentação constante, concentração de glicose residual constante e batelada alimentada exponencial. A concentração de 150 g.L<sup>-1</sup> foi obtida pela estratégia de alimentação com concentração residual de glicose constante.

A alimentação contínua é geralmente favorecida em processos de conversão de biomassa, pois possibilita o alcance de produtividades mais altas, uma vez que o reator pode ser operado em estado estacionário próximo à taxa máxima de reação. Contudo, o rendimento geralmente é baixo, porque uma parte do açúcar é perdida na corrente de produto. Adicionalmente, o processo contínuo com reciclo celular apresenta maior produtividade em relação ao processo contínuo simples (JI; HUANG; OUYANG, 2011). Dziejulski *et al.* (1986) mostraram que a batelada alimentada com reciclo celular produziu mais 2,3-BDO e menos acetato do que qualquer batelada realizada com *P. polymyxa* para produção (R, R)-2,3-BDO. Um outro modelo promissor é o emprego de células imobilizadas, Lee e Maddox (1984) imobilizaram células de *K. pneumoniae* em gel de alginato de cálcio em um reator de coluna para produção contínua de 2,3-BDO a partir do soro permeado. Os autores relataram que a máxima produtividade de 2,3-BDO foi de 2,3 g.(L.h)<sup>-1</sup> e o sistema mostrou-se estável por sete semanas.

## **2.9 Processos de recuperação do produto**

A etapa de recuperação de produtos do meio fermentativo é uma das etapas limitantes para aplicação do processo em escala industrial, uma vez que muitas vezes se trata de um meio complexo e os produtos gerados podem apresentar propriedades físico-

químicas que dificultam a separação. O elevado ponto de ebulição do butanodiol (180°C) e sua afinidade com a água, associados a composição dos particulados no meio fermentado, fazem com que o processo de *downstream* se torne custoso (JI; HUANG; OUYANG, 2011).

Alguns processos de separação para recuperação de 2,3-BDO do caldo de fermentação já foram relatados, como por exemplo destilação a vácuo, extração com solvente e o emprego da técnica de *salting-out*. A separação por destilação demanda uma grande quantidade de energia para a baixa concentração de 2,3-BDO contida no caldo da fermentação. A extração líquido-líquido foi relatada por Shao & Kumar (2009) utilizando n-butanol, esta requer menos energia, porém utiliza quantidade considerável de solução. Já a metodologia de *salting-out* foi estudada por Garcia (2006) e consiste no uso de um sal solúvel em água e insolúvel em 2,3-BDO, como carbonato de potássio. Após a dissolução, a solução é aquecida até aproximadamente 40°C, onde acontece a formação de duas fases, uma contendo o diol; e a inferior, formada por água e sal, neste processo a recuperação do álcool pode ser viabilizada.

## **2.10 *P. polymyxa* como produtora de 2,3-butanodiol**

*P. polymyxa* (anteriormente *Bacillus polymyxa*) também conhecida como *Aerobacillus polymyxa*, *Granulobacter polymyxa* ou *Clostridium polymyxa*, é um bacilo não patogênico e formador de endósporos. Caracteriza-se por ser uma das bactérias anaeróbias facultativas mais significativas para a indústria. Ocorre naturalmente no solo, rizosfera e raízes de plantas e em sedimentos marinhos. Além de produzir 2,3 butanodiol, esta encontra aplicações na agricultura como fixação de nitrogênio, aumento da porosidade do solo, promoção do crescimento de plantas e solubilização do fósforo do solo. Na indústria química e farmacêutica pode ser utilizada como biofloculante e como produtor de exopolissacarídeos, de enzimas hidrolíticas, de antibióticos e citocinina (LAL; TABACCHIONI, 2009).

*P. polymyxa* se destaca por sua capacidade de metabolizar monossacarídeos (glicose, xilose e galactose), dissacarídeos (lactose, celobiose, manose, levulose, sacarose, maltose e trealose), polissacarídeos (amido, xilana) e lipídeos. Estas bactérias crescem em condições anaeróbicas e produzem os isômeros levogiro e meso de 2,3

butanodiol, sendo o levogiro produzido em maiores concentrações, com até 98% de pureza ótica, dependendo das condições de processo empregadas (CELIŃSKA; GRAJEK, 2009; LAUBE; GROLEAU; MARTIN, 1984).

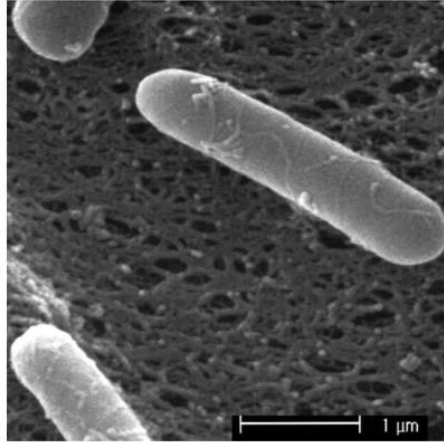


Figura 5. *P. polymyxa* OSY-DF vista por microscopia eletrônica

Fonte: He *et al.* (2007)

Há um interesse crescente na aplicação deste bacilo principalmente em relação à ecologia e biotecnologia, embora sua informação genética seja limitada. Xie *et al.* (2015) sequenciou e analisou o genoma da cepa *P. polymyxa* DSM 365 fornecendo informações genéticas para produção de (R,R)-2,3-butanodiol com alta pureza e eficiência, no total foram preditos 4964 genes. De acordo com os autores, os resultados servem como uma oportunidade para a investigação dos mecanismos metabólicos e regulatórios desta cepa. Por exemplo, genes envolvidos em vias sintéticas podem ser úteis para identificação de alvos para a otimização das vias metabólicas. Além disto, é possível a construção de biocatalizadores robustos para superexpressar genes controladores, bloqueando as vias concorrentes e mantendo o equilíbrio de fluxo. Adicionalmente, os genes responsáveis pelo metabolismo de xilana, amido e lactose estão presentes no genoma de *P. polymyxa* DSM 365 e podem fornecer informações para aumentar a capacidade desta para metabolizar eficientemente biomassas como hemicelulósicos, mandioca e soro de queijo.

Uma das maiores concentrações obtidas de 2,3-BDO foi de 111 g.L<sup>-1</sup> em estudo realizado por Häßler *et al.* (2012) utilizando *P. polymyxa* DSM 365, esse resultado é relativamente menor do que experimentos conduzidos com microrganismos

patogênicos, como por exemplo, *Klebsiella pneumoniae* (150 g.L<sup>-1</sup>) (MA *et al.*, 2009) e *Klebsiella oxytoca* (130 g.L<sup>-1</sup>) (JI *et al.*, 2010). Okonkwo; Ujor & Ezeji, (2017) estudaram os inibidores do crescimento da *P. polymyxa* DSM 365 e relataram que a alta concentração de 2,3-BDO no meio fermentativo é o principal agente inibidor do processo, desta forma avanços ligados a engenharia metabólica são importantes para a produção em larga escala deste produto.

### **2.11 Bagaço de cana de açúcar e melaço como matérias primas para produção de 2,3-butanodiol**

As vantagens da produção de 2,3-butanodiol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana de açúcar para as indústrias sucroalcooleiras estão ligadas ao aproveitamento desta fração quando o etanol celulósico é produzido, além da produção de um químico de valor agregado. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada para produção de bioetanol não fermenta a xilose derivada da hemicelulose, enquanto as bactérias produtoras de butanodiol o fazem. Além disto, ao se associar a produção de químicos com um combustível (etanol), as biorrefinarias se aproximam do modelo de negócios de refinarias de petróleo, já que enquanto os químicos aumentam o valor gerado, a produção de etanol proporciona economias de escala, principalmente na etapa agrícola. Desta forma, as usinas podem se posicionar na cadeia de valor como produtores de 2,3-butanodiol e o vender a empresas que os convertam a butadieno para produção de borracha sintética.

A biomassa lignocelulósica proveniente do bagaço de cana de açúcar é um resíduo barato e abundante da indústria sucroalcooleira no Brasil. É obtida após a extração do caldo de cana-de-açúcar e caracteriza-se por ser um material heterogêneo em relação sua morfologia e tamanho de partículas. Esta biomassa é composta por casca, fibra e medula, em se tratando de açúcares, contém celulose (40-60%), polímero de glicose, hemicelulose (20-40%), heteropolímero de pentoses, sendo a xilose o principal açúcar desta fração, e lignina (10-25%) (BARROS, 2018). A casca possui células de tamanho superior às demais frações com geometria semelhante a lâminas grosseiramente retangulares. A fibra é conjunto de células cilíndricas e finas, enquanto a medula é formada por partículas esponjosas aproximadamente esféricas, esta última é a

principal fonte de acúmulo de açúcares na planta (PATURAU *et al.*, 1989). Zhao; Song; Liu (2011) estudaram a produção de 2,3-BDO por *Klebsiella pneumoniae* CGMCC 1.9131. utilizando o bagaço de cana de açúcar como substrato e obtiveram resultados de 0,35 a 0,5 de rendimento para a fração hemicelulósica.

A disponibilidade de bagaço depende da eficiência energética da Usina. Em 2016, em usinas com destilaria anexa, o excedente de bagaço disponível para hidrólise ou outros processos foi de aproximadamente 280 kg por tonelada de cana, o que representa uma fração entre 7 e 10% do bagaço total. A maior fração é empregada na geração de vapor e energia elétrica (NOVA CANA).

A adição de melaço ao hidrolisado hemicelulósico é uma estratégia para reduzir a suplementação do meio ao mesmo tempo em que diminui os gastos gerados pela etapa de concentração dos açúcares. O melaço é o principal subproduto da centrifugação, após a cristalização da sacarose, no processo de produção do açúcar, são produzidos cerca de 40 a 60 quilos por tonelada de cana processada, este é utilizado principalmente no processo de produção de álcool (ALCARDE, 2007). O melaço é rico em açúcares e nutrientes, contendo aproximadamente sacarose (39% m m<sup>-1</sup>), glicose (5% m.m<sup>-1</sup>) e frutose (7,6% m.m<sup>-1</sup>) e sais inorgânicos como K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, além de cinzas, proteínas, vitaminas, e ácidos orgânicos (MELAÇOS BRASILEIROS). Experimentos realizados por Dai *et al.* (2015) com *E. cloacae* CGMCC 6053 e melaço mostraram que é possível reduzir para cinco o número de suplementos (melaço, ureia, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, citrato de sódio e MgSO<sub>4</sub>) a serem utilizados no meio bem como as etapas de operação, incluindo a esterilização.

O pré-tratamento com ácido diluído gera inibidores que dificultam a fermentação, como o ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e compostos fenólicos. Para solucionar esse problema sem a necessidade de etapas custosas de destoxificação do hidrolisado, Qureshi *et al.* (2018) propuseram uma técnica de fermentação em batelada alimentada. Os pesquisadores produziram butanol (fermentação ABE) a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo. Iniciaram a fermentação com hidrolisado celulósico com uma concentração de inibidores que não era toxica para o microrganismo (*Clostridium beijerinckii* P260) e após 20 horas de fermentação (tempo de crescimento exponencial) adicionaram o hidrolisado

hemicelulósico bruto (não destoxificado). Desta forma a concentração de inibidores foi diluída e a atividade da cultura não foi inibida. Além disso, parte do ácido acético gerado no pré-tratamento também foi consumido.

A adição de ácido acético favorece a conversão de açúcares em butanodiol pelo microrganismo *P. polymyxa* (NAKASHIMADA *et al.*, 2000; WANG; HONG-ZHANG, 2014). O ácido é um coproduto da fermentação do butanodiol e atua como indutor de enzimas responsáveis pela conversão de piruvato a butanodiol. Para tal, é necessário que o pH do meio de cultivo esteja próximo de 6,5, favorecendo a forma dissociada (menos tóxica) do ácido acético (JI; HUANG; OUYANG, 2011). Desta forma, se as fermentações forem iniciadas com melaço e o hidrolisado hemicelulósico for alimentado no tempo de crescimento exponencial celular, a conversão de a xilose poderá acontecer sem que haja necessidade de destoxificação do hidrolisado. Adicionalmente, a fermentação poderá se beneficiar do ácido acético gerado no pré-tratamento, aumentando o rendimento de butanodiol.

## 2.12 Considerações finais

A produção biotecnológica de 2,3-Butanediol ainda está em fase inicial, porém possui grande perspectiva de crescimento. Os avanços na engenharia genética e metabólica, bem como na fisiologia do processo e nos métodos de fermentação auxiliados pela modelagem matemática visando a otimização do processo são pontos chave para a implementação deste. Além disto, as rotas biotecnológicas que utilizam resíduos industriais são mais atrativas e fazem o processo economicamente possível (CELÍNSKA; GRAJEK, 2009). A produção industrial deste *building block* por fermentação utilizando fontes renováveis pode alcançar preço competitivo em uma economia futura (KOUTINAS *et al.*, 2016). De acordo com a literatura, a bactéria *P. polymyxa* é um microrganismo produtor, não patogênico e competitivo de 2,3-butanodiol. Entretanto, ainda não foram reportados processos com robustez necessária para a aplicação industrial utilizando hidrolisados hemicelulósicos. Desta forma, o estudo dos parâmetros do processo, principalmente em relação a composição do meio e aumento da produtividade pela otimização de fatores como temperatura, suplemento de oxigênio e

modo de operação do reator, tornam-se necessários visando a obtenção de um processo economicamente viável.

### **CAPÍTULO 3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

Neste capítulo foi descrita a metodologia experimental para o desenvolvimento desta pesquisa.

Fundamentando-se nos trabalhos apresentados ao longo do capítulo anterior, foram realizadas fermentações para avaliar os parâmetros e definir as melhores condições para realização do projeto proposto (Figura 6). Primeiramente, foi realizado planejamento fatorial com melaço diluído onde foram analisados os parâmetros: temperatura, agitação e concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , nesta etapa foram definidos os parâmetros para a fermentação (Etapa 1). Após, foram realizadas fermentações em batelada com meio sintético otimizado descrito por Okonkwo *et al.* (2017), empregando diferentes fontes de carbono: (glicose, sacarose, xilose, frutose, glicose e xilose (3:1), sacarose e xilose (3:1) e frutose e xilose (3:1), nas condições definidas no planejamento fatorial, nesta etapa foi possível definir os substratos preferencialmente utilizados pelo microrganismo e a produtividade de 2,3-butanodiol em cada situação. Adicionalmente, foi possível avaliar a performance do melaço frente ao meio sintético (Etapa 2). Em seguida foram realizadas fermentações do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar bruto e destoxificado via *overliming* (Etapa 3). Por fim, foram realizados experimentos em batelada alimentada com diferentes proporções de melaço e hidrolisado. Esta etapa teve como objetivo reduzir os efeitos inibitórios causados pelos componentes do melaço, além de enriquecer o hidrolisado com os minerais presentes no melaço (Etapa 4).

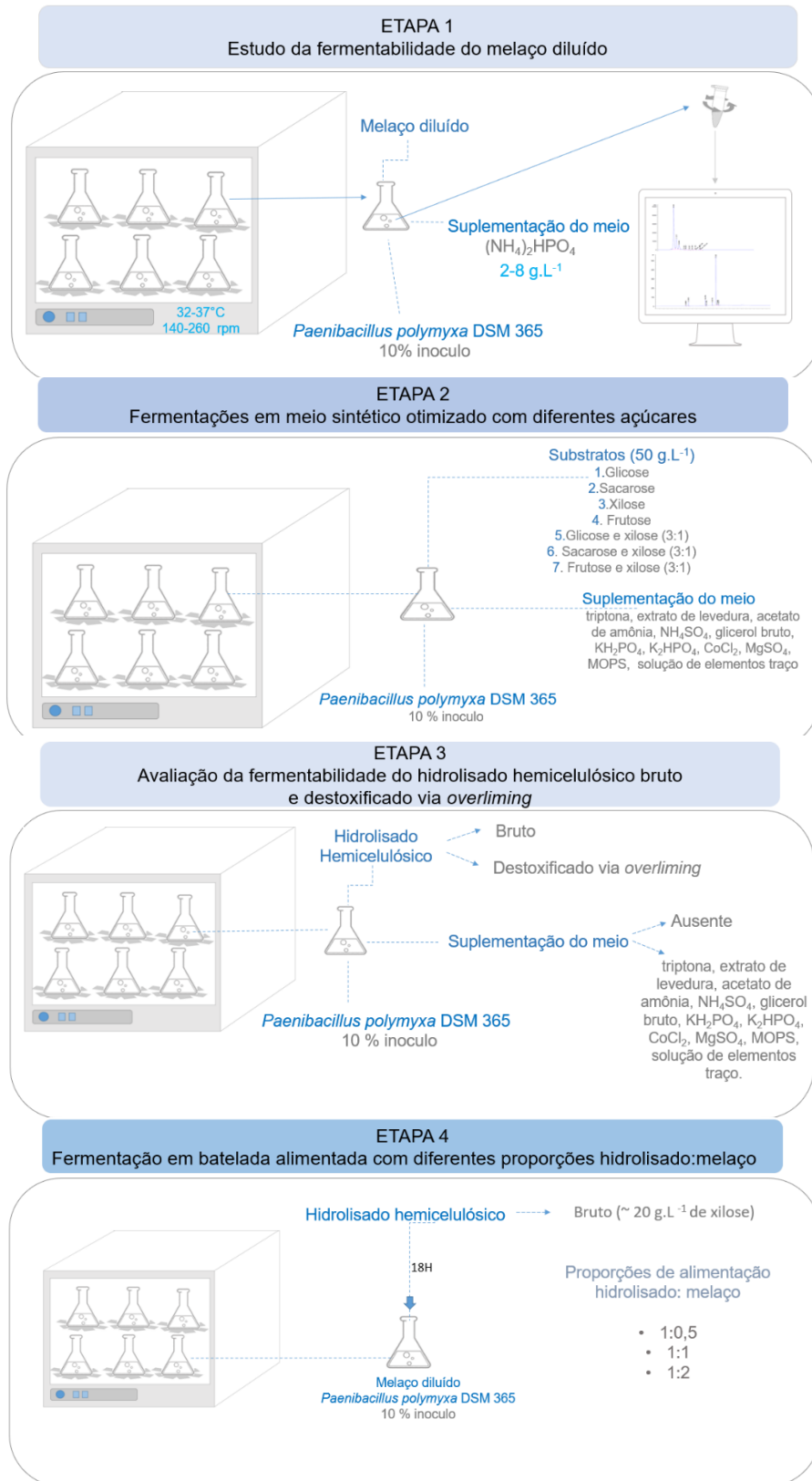


Figura 6. Visualização macro da metodologia experimental



### 3.1 Preparo do inóculo

*Paenibacillus polymyxa* DSM 365 foi obtida da Coleção Alemã de Microrganismos e Cultura Celular, Braunschweig, Alemanha (DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). As células liofilizadas foram reativadas pela inoculação em caldo Luria-Bertani (LB) por 12 h e armazenadas em solução de 1mL de glicerol (50% de glicerol estéril) a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

O meio de pré-cultura foi preparado em frasco *schott* contendo:  $20\text{ g.L}^{-1}$  de glicose,  $5\text{ g.L}^{-1}$  de extrato de levedura,  $5\text{ g.L}^{-1}$  de triptona,  $0,2\text{ g.L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$  e  $3,0\text{ g.L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , suplementado com 3% de tampão de fosfato (pH 6,5):  $3,5\text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $2,75\text{ g.L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 0,3% de solução de elementos traço. Esta, foi preparada pela dissolução em 500 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ: 0,8 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,04 g  $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$ , 0,04 g  $\text{NaMoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$ , 5 g  $\text{MnCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ , 0,08 g  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2.6\text{H}_2\text{O}$ , 1 g  $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ , 0,01g de biotina e 0,4 g  $\text{FeSO}_4$  dissolvidos em 3 mL de HCl (25%), a solução final foi acrescida de água até 1000 mL. A solução de elementos traço e solução tampão foram preparadas separadamente e esterilizadas por filtro PES de  $0,22\text{ }\mu\text{m}$ . Glicose, extrato de levedura, e triptona foram esterilizados em autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 min, seguido por resfriamento até  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes da mistura com componentes esterilizados por filtro.

Para o pré inóculo foi utilizado frasco Erlenmeyer de 100 mL contendo 30 mL de solução de pré-cultura e 1 mL da solução estoque de *P. polymyxa*. Este, foi incubado aerobiamente por 10-12 h, a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 200 rpm, até  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  igual 0,5. Desta solução, foram transferidas 10 mL para solução pré-cultura contendo 90 mL, formando a solução inóculo. Esta, foi incubada por mais 2-3 h, até ser transferida para o meio de fermentação.

### 3.2 Avaliação da fermentabilidade do melaço

O melaço da foi obtido da Usina Ester (Cosmópolis – SP, Brasil) e armazenado a  $-15^{\circ}\text{C}$  até o momento dos experimentos. A fermentabilidade do melaço foi analisada a fim de encontrar as melhores condições experimentais dentro do intervalo proposto para as variáveis a serem apresentadas a seguir. A metodologia utilizada para o inóculo foi descrita anteriormente. Foi utilizada carga de inóculo de 10% (v.v<sup>-1</sup>) em solução de melaço, com aproximadamente  $60\text{ g.L}^{-1}$  de açúcares redutores totais e pH inicial de 6,5.

### 3.2.1 Planejamento fatorial

Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL em câmara incubadora, as variáveis analisadas foram: agitação, temperatura e concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (Tabela 3). Foi utilizado o planejamento de dois níveis e 3 fatores com repetição no ponto central  $2^3$  (Tabela 4). As respostas avaliadas foram concentração máxima de 2,3-butanodiol, rendimento e conversão. Os dados foram analisados pela análise de variância ANOVA com 95% de confiança utilizando Software *STATISTICA 10*<sup>®</sup>.

Tabela 3. Variáveis do planejamento fatorial para análise da fermentabilidade do melão

Fator	Nível		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	32	35	38
Agitação (rpm)	140	200	260
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (g.L <sup>-1</sup> )	2	5	8

Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial

Experimento	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	DAP (g.L <sup>-1</sup> )
A	32 (-1)	140 (-1)	2 (-1)
B	32 (-1)	140 (-1)	8 (+1)
C	32 (-1)	260 (+1)	2 (-1)
D	32 (-1)	260 (+1)	8 (+1)
E	38 (+1)	140 (-1)	2 (-1)
F	38 (+1)	140 (-1)	8 (+1)
G	38 (+1)	260 (+1)	2 (-1)
H	38 (+1)	260 (+1)	8 (+1)
I	35 (0)	200 (0)	5(0)

### 3.3 Fermentação em meio sintético com açúcares puros

O meio de produção foi preparado segundo as concentrações ótimas encontradas por Okonkwo *et al.* (2017). Os autores descreveram o meio ótimo como: 9,5% do tamanho do inóculo, 120 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 3,5 g.L<sup>-1</sup> de triptona, 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato

de levedura, 4 g.L<sup>-1</sup> de acetato de amônia, 3 g.L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 7 g.L<sup>-1</sup> de glicerol bruto, 3,5 g.L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,75 g.L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 g.L<sup>-1</sup> de CoCl<sub>2</sub>, 0,2 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>, 10 g.L<sup>-1</sup> de ácido 3-(N-mofolin)propanossulfônico (MOPS), e solução de elementos traço. O pH inicial do meio fermentativo foi de 6,5. Adicionalmente, a glicose foi substituída por outros açúcares a fim de avaliar o desempenho da fermentação com estes substratos. Desta forma, foram realizados experimentos com (I) sacarose (II) xilose (III) frutose (IV) glicose, (V) sacarose e xilose (VI) glicose e xilose e (VII) frutose e xilose. Os ensaios contendo xilose e outro açúcar foram conduzidos com proporção de 1 xilose: 4 açúcar.

### **3.4 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana de açúcar.**

O bagaço de cana de açúcar da Usina Ester (Cosmópolis – SP, Brasil). O licor C5 foi obtido por pré-tratamento ácido.

#### **3.4.1 Pré-tratamento ácido**

O bagaço de cana de açúcar foi processado em uma planta piloto de pré-tratamento de biomassa alocada no Laboratório Nacional de Biorenováveis (LNBR) (Campinas, SP, Brasil) para obtenção do hidrolisado hemicelulósico. Primeiramente, foi realizada uma etapa de peneiramento para remover as impurezas sólidas (peneiras vibratórias, Multideck Multivibro, Brasil). Após, 20 kg bagaço secos, passaram pelo pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (0,5% v.v<sup>-1</sup>) a 145 °C por 12 min em um reator em escala piloto de 350 L (reator de mistura Hastelloy C-276, POPE Scientific Inc., Saukville, EUA). A carga de sólidos foi de 10% p.v<sup>-1</sup>, e a lama foi filtrada por filtro Hastelloy C-22 Nutsche de 140 L (Pope Scientific, EUA). A fração líquida (hidrolisado) foi coletada em galões plásticos não estéreis de 20 L e armazenada a - 15 °C, o pH foi ajustado para 6,5 utilizando pastilhas de NaOH.

#### **3.4.2 Fermentação com hidrolisado bruto e destoxificado (*overliming*)**

Em um primeiro momento foi utilizado apenas o hidrolisado bruto sem tratamento para remoção de inibidores. Em um segundo experimento foi realizada destoxificação por *overliming* segundo metodologia de Qureshi *et al.* (2010), nesta os

sólidos são removidos por centrifugação e o pH do hidrolisado é ajustado para 10 com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , em seguida  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  é adicionado na concentração de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ . Após, o líquido é aquecido ( $90^\circ\text{C}$ , 30min) com agitação intermitente, seguido por resfriamento até temperatura ambiente e ajuste do pH para 7 com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. A mistura é então filtrada e esterilizada com filtro de  $0,2 \mu\text{m}$ . A fermentação foi conduzida em frascos de 250 mL em câmara incubadora e amostras foram obtidas a cada 12 horas em triplicatas.

### 3.5 Fermentação em batelada alimentada

Nesta etapa, foi analisada a alimentação de hidrolisado ao melaço diluído com o objetivo de reduzir a concentração de inibidores presentes no hidrolisado. Para tal, foram realizados experimentos utilizando as melhores condições de temperatura, agitação, concentração de substrato e  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  encontradas na etapa de seleção dos parâmetros experimentais. Foi estudada a adição ao melaço de (i) hidrolisado bruto e (ii) hidrolisado bruto adicionado de minerais sintéticos descritos por Okonkwo *et al.* (2017).

Nesta etapa, a fermentação foi iniciada com melaço diluído com aproximadamente  $50 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcares e posteriormente o meio foi alimentado com hidrolisado ( $\sim 20 \text{ g.L}^{-1}$  de xilose; pH 6,5) no tempo de 18 horas de fermentação. As proporções volumétricas (hidrolisado: melaço) utilizadas foram: (i) 1:0,5; (ii) 1:1 e (iii) 1:2.

### 3.6 Métodos de Analíticos

#### 3.6.1 Análise de açúcares e produtos

Os açúcares: glicose, xilose, sacarose e frutose foram quantificadas utilizando cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em cromatógrafo Agilent 1260 Infinity, equipado com detector RID, em coluna Aminex HPX-87H, mantida a  $15^\circ\text{C}$ , utilizando como eluente  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3 mM a  $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$ . Foi utilizado o índice de refração, em comprimento de onda de 205 nm. Os produtos da fermentação: (R,R)-2,3-butanodiol, meso-butanodiol, etanol, acetoína e ácido acético foram quantificados via cromatografia gasosa em coluna HP-INNOWAX 30 m x 0,32 mm x  $0,50 \mu\text{m}$  (19091N-213 Agilent HP) com setup de entrada  $250^\circ\text{C}$  (10:1), fluxo constante de gás hélio  $1,8 \text{ mL.min}^{-1}$ , temperatura da coluna em rampa com inclinação 20 até  $220^\circ\text{C}$  (retenção 7 min), FID a

300°C, com fluxo de hidrogênio 40 mL.min<sup>-1</sup>, ar sintético 300mL.min<sup>-1</sup> e make up de nitrogênio 30 mL.min<sup>-1</sup>.

### 3.6.2 Parâmetros Fermentativos

Par a análise da cinética de produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa* foram utilizados os seguintes parâmetros fermentativos: Rendimento de levo-2,3-BDO ( $Y_{P/S}$ ), produtividade volumétrica ( $P_V$ ), e a porcentagem de consumo dos substratos (C%).

#### 3.6.2.1 Rendimento de levo-2,3-BDO ( $Y_{P/S}$ )

O rendimento foi calculado conforme a Equação 1.

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S - S_0} \quad (\text{Eq.1})$$

Em que:

$P_0$ = Concentração inicial de 2,3-BDO (g L<sup>-1</sup>);

$P$ = Concentração final de 2,3-BDO (g L<sup>-1</sup>);

$S_0$ = Concentração inicial de substrato (g L<sup>-1</sup>);

$S$ = Concentração final de substrato (g L<sup>-1</sup>);

#### 3.6.2.2 Produtividade Volumetrica ( $P_V$ )

A produtividade volumetrica foi calculada conforme a Equação 2.

$$P_V (\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \frac{P_{\text{máx}}}{t_{MP}} \quad (\text{Eq.2})$$

Em que:

$P_{\text{máx}}$ = Máxima concentração 2,3-BDO (g L<sup>-1</sup>);

$t_{MP}$ = tempo de fermentação correspondente a máxima produção 2,3-BDO (h)

### 3.6.2.3 Porcentagem de consumo dos açúcares (C %)

3. A porcentagem de conversão dos açúcares foi calculada conforme a Equação

$$C_{\%} = \frac{S_0 - S}{S_0} \cdot 100$$

Em que:

$S_0$  = Concentração inicial do açúcar ( $\text{g.L}^{-1}$ );

$S$  = Concentração final do açúcar ( $\text{g.L}^{-1}$ );

(Eq.3)

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da fermentabilidade do melaço

Foram avaliadas oito situações experimentais com o intuito de verificar o impacto das variáveis dentro do intervalo proposto. Temperaturas entre 32 e 38°C e níveis de agitação dos frascos entre 140 e 260 rpm foram avaliados com o propósito de observar a relação entre estas variáveis e o desempenho fermentativo. A suplementação com DAP entre 2 e 8 g.L<sup>-1</sup> também foi objeto de estudo. O consumo dos substratos sacarose, glicose e frutose e formação dos produtos levo-2,3-butanodiol, meso-2,3-butanodiol, etanol, ácido acético e acetoína foram considerados durante o período de fermentação de 48 horas. Os ensaios foram identificados conforme Tabela 4. A Figura 7 mostra a cinética das fermentações em frasco agitado durante o período de fermentação.

O aumento da agitação para as menores temperaturas impactou negativamente no desempenho da fermentação, isto pode ser observado pela comparação dos experimentos C e D com A e B. Observou-se uma queda na concentração de 2,3-BDO e uma maior produção de acetoína. Hässler et al. (2012) obtiveram resultado semelhante em seus experimentos, ao aumentar a agitação de 500 para 650 rpm mantendo a taxa de aeração baixa (0,1vvm) a seletividade do isômero levogiro foi prejudicada e a formação de acetoína foi favorecida. Segundo Humphrey (1998) isso ocorre devido aos altos efeitos de gaseificação de superfície em estágios posteriores da fermentação em agitação intensificada, como os experimentos do trabalho em questão foram realizados em pequena escala, a aeração da superfície pode ter sido mais significativa, uma vez que até 50% da transferência total de oxigênio pode ser transferido pela superfície.

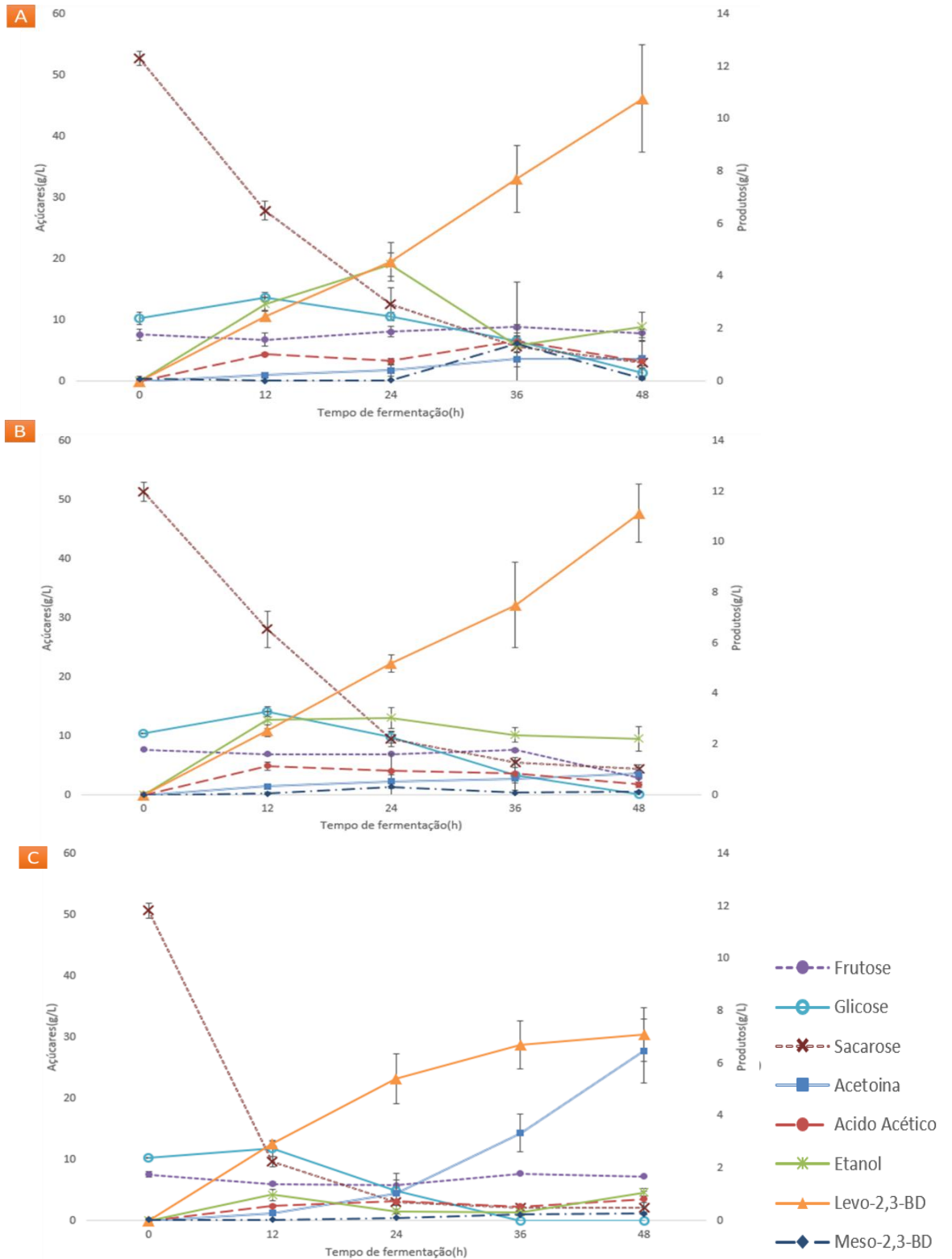


Figura 7. Cinética das fermentações em frasco agitado para diferentes parâmetros de agitação, temperatura e concentração de DAP. Experimentos A, B e C.



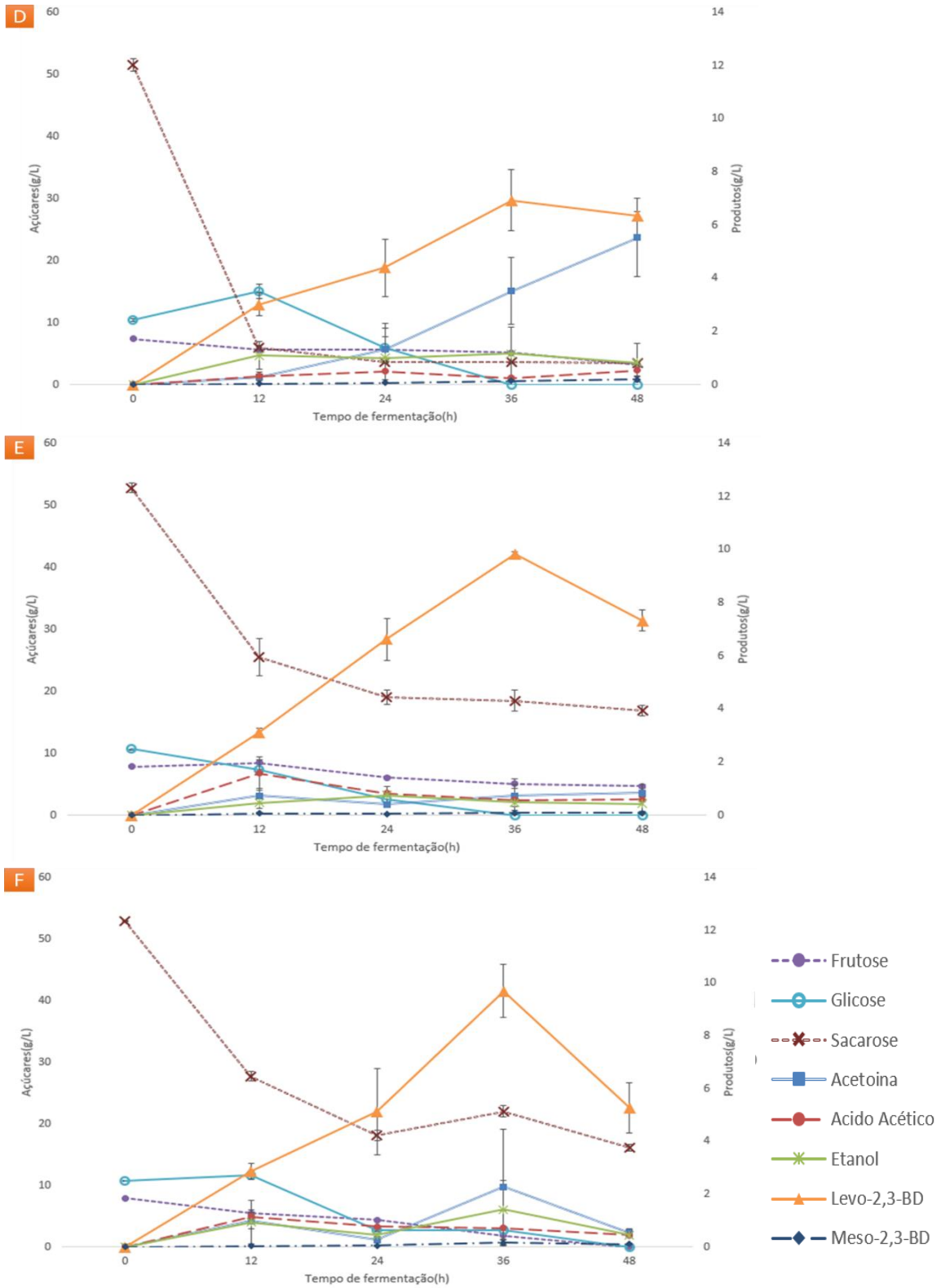


Figura 8. Cinética das fermentações em frasco agitado para diferentes parâmetros de agitação, temperatura e concentração de DAP. Experimentos D, E e F.

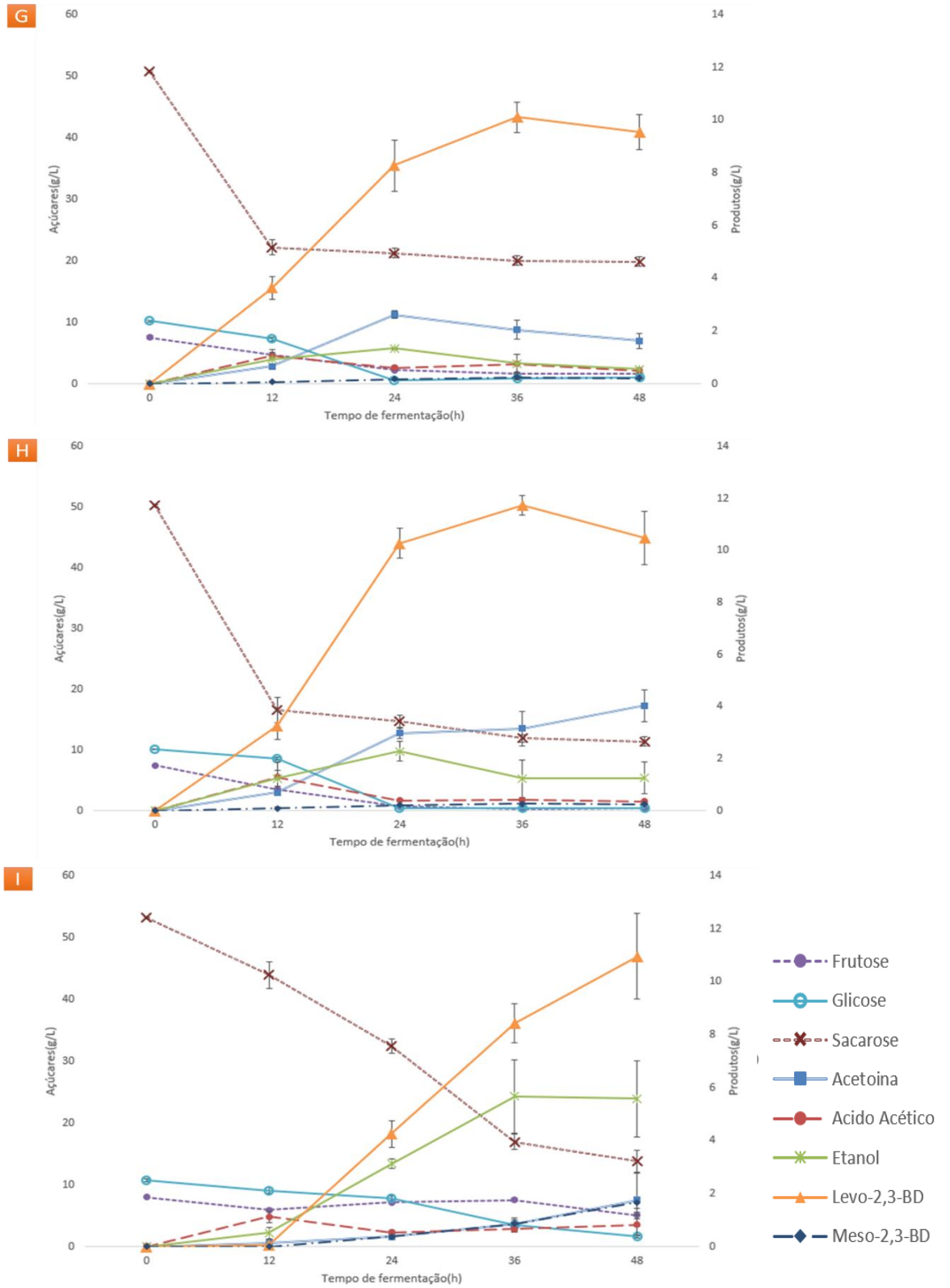


Figura 9. Cinética das fermentações em frasco agitado para diferentes parâmetros de agitação, temperatura e concentração de DAP. Experimentos G, H e I.

O acréscimo da temperatura se mostrou positivo em termos de produtividade, uma vez que o tempo para atingir a concentração máxima foi reduzido de 48 para 36 horas. Os experimentos com menores rotações apresentaram decréscimo da concentração de produtos a partir de 36 horas indicando o término da fermentação, para aqueles conduzidos a maiores rotações a fase estacionária ainda foi mantida em 48 horas. O consumo de substrato se deu de forma muito mais acentuada para as temperaturas de 32°C em relação aos conduzidos em temperaturas de 38 e 35°C, o que indica que possivelmente outras reações metabólicas ocorreram concomitantemente. O experimento I, conduzido a 35°C e 200 rpm produziu maiores concentrações de etanol, demonstrando a possibilidade de favorecimento da respiração nestas condições. A Tabela 5 reúne os dados cinéticos dos experimentos.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos dos ensaios do planejamento fatorial.

Experimento	C <sub>so</sub> (g L <sup>-1</sup> )	t <sub>MP</sub> (h)	C <sub>BDOmáx</sub> (g L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub>	P <sub>v</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	C (%)
A	70,58 ± 3,07	48	10,77±2,05	0,18±0,04	0,22±0,04	82,85±0,03
B	69,46 ± 1,75	48	11,13±1,16	0,18±0,02	0,23±0,02	89,32±0,01
C	68,44 ± 1,59	48	7,09±1,01	0,12±0,02	0,15±0,02	85,77±0,01
D	69,23 ± 1,35	48	6,35±0,14	0,10±0,00	0,13±0,01	90,55±0,01
E	71,25 ± 0,94	36	9,84±0,07	0,21±0,01	0,27±0,01	67,05±0,03
F	71,55 ± 0,11	36	9,69±1,00	0,21±0,02	0,27±0,03	62,98±0,02
G	68,48 ± 0,32	36	10,01±0,57	0,22±0,01	0,28±0,02	67,3±0,015
H	67,81 ± 0,19	36	11,72±0,37	0,21±0,01	0,33±0,01	81,43±0,01
I	71,82 ± 0,40	48	10,95±1,62	0,21±0,03	0,23±0,03	71,55±0,04

C<sub>so</sub>: Concentração inicial de substrato. C<sub>BDOmáx</sub>: concentração máxima obtida de levo-2,3-BDO; Y<sub>P/S</sub>: Rendimento de 2,3-BDO; t<sub>MP</sub>: Tempo de fermentação de máxima produção de 2,3-BDO; e P<sub>v</sub>: Produtividade volumétrica de 2,3-BDO; C%: Porcentagem de conversão de substrato.

A análise da Tabela 5 mostra que, de forma geral, o acréscimo da temperatura teve efeito positivo no rendimento de levo-2,3-BDO ao mesmo tempo em que desfavoreceu a conversão, resultado esperado uma vez que sob condições de restrição no fornecimento de oxigênio *P. polymyxa* mantém as vias de respiração e fermentação ativas, assim a redução de O<sub>2</sub> reduz a respiração e concentração celular, contribuindo para o rendimento de 2,3-BDO, ao mesmo tempo em que diminui a taxa de conversão global devido a uma menor densidade celular (CELIŃSKA; GRAJEK, 2009).

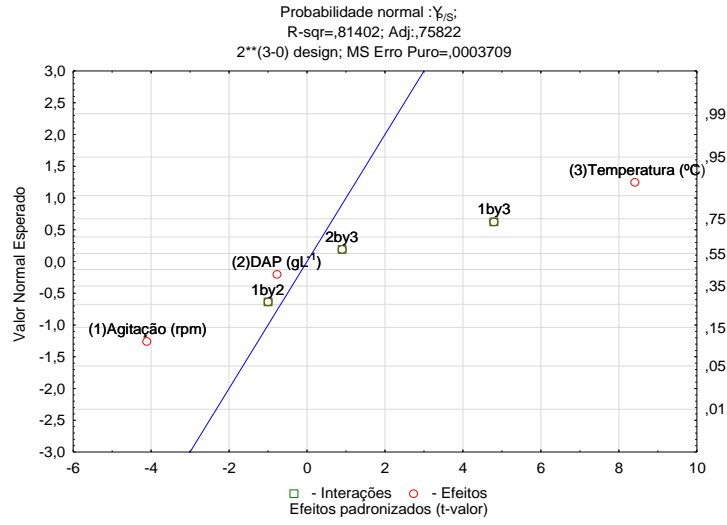
O gráfico de probabilidade normal e Pareto dos efeitos, Figuras 10 e 11 respectivamente, obtidos pela análise do planejamento fatorial (DOE) considerando 95% para o intervalo de confiança, utilizando o software Statistica 10, permitem entender melhor o efeito das variáveis nas respostas rendimento, conversão e concentração máxima de levo-2,3-butanodiol.

Para a resposta rendimento, a temperatura influenciou positivamente, de forma que os ensaios conduzidos a maiores temperaturas (38°C) atingiram rendimentos maiores que 0,2. Entretanto, a agitação teve efeito negativo, este pode ser observado pela comparação dos experimentos A e B conduzidos a 140 rpm e 32°C com os experimentos C e D, mantidos a mesma temperatura e rotação de 260 rpm, nos dois primeiros o rendimento foi de 0,18 decrescendo para até 0,10 com a redução da agitação. A elevação paralela de temperatura e agitação foi benéfica para o processo, rendimentos de até 0,22 foram atingidos nos ensaios conduzidos a 38°C e 260 rpm. A suplementação com DAP e as outras interações não se mostraram significativas para o rendimento.

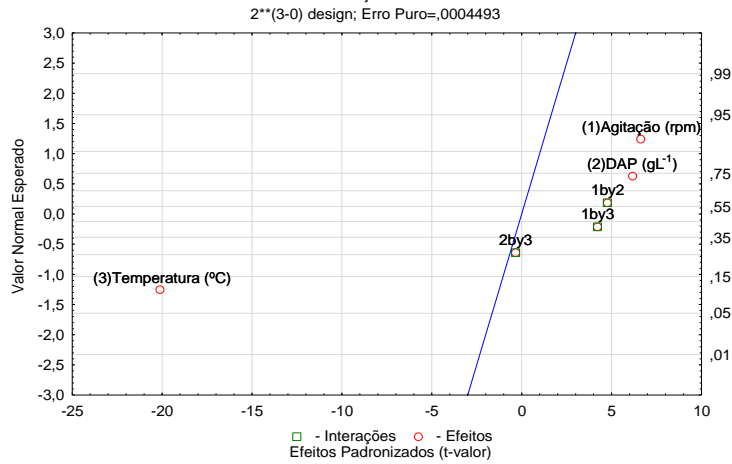
Para a conversão, o efeito da temperatura também foi o mais significativo, todavia seu impacto foi negativo e mais representativo em comparação aos outros efeitos. Agitação e suplementação com DAP tiveram influência positiva nas conversões. Os ensaios conduzidos a 32°C atingiram conversões entre 80 e 90%, enquanto os conduzidos a 38°C, com exceção do experimento H, resultaram em valores entre 60 e 67%. Os experimentos D e H representam o efeito da agitação e da suplementação com DAP, estes atingiram os maiores valores de conversão dentro de seus grupos de temperatura, 90,55% e 81,43% respectivamente.

A produção máxima de levo-2,3-butanodiol foi influenciada majoritariamente pelo efeito combinado de temperatura e agitação, apesar de as variáveis apresentarem efeitos opostos, temperatura positivo e agitação negativo, o acréscimo de ambos proporcionou um melhor desempenho para esta resposta. A concentração máxima de 11,72 g.L<sup>-1</sup> foi atingida no experimento H, conduzido a 38°C e 260 rpm. A suplementação com DAP e as demais interações não expressaram efeito significativo para a produção deste álcool.

a)



b)



c)

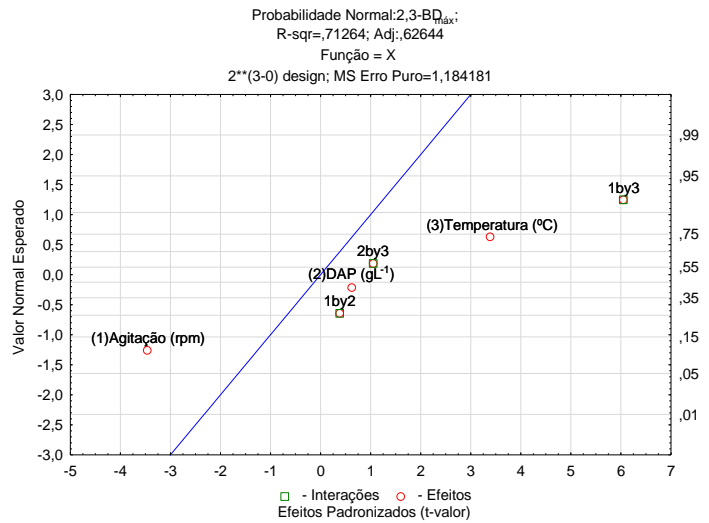
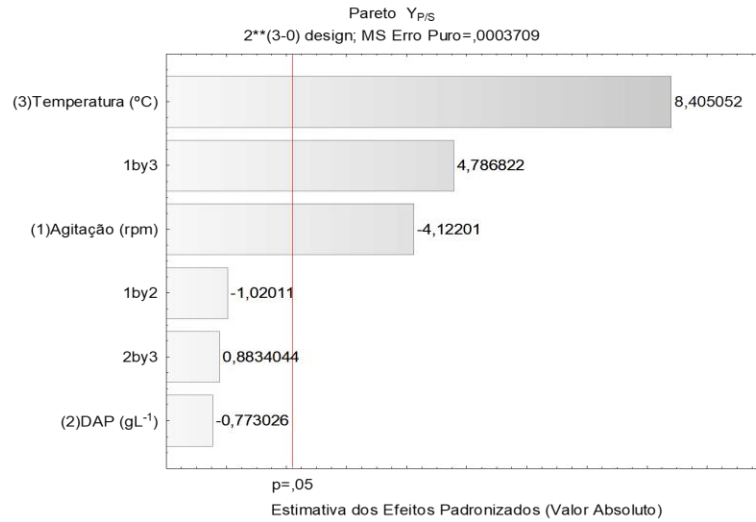
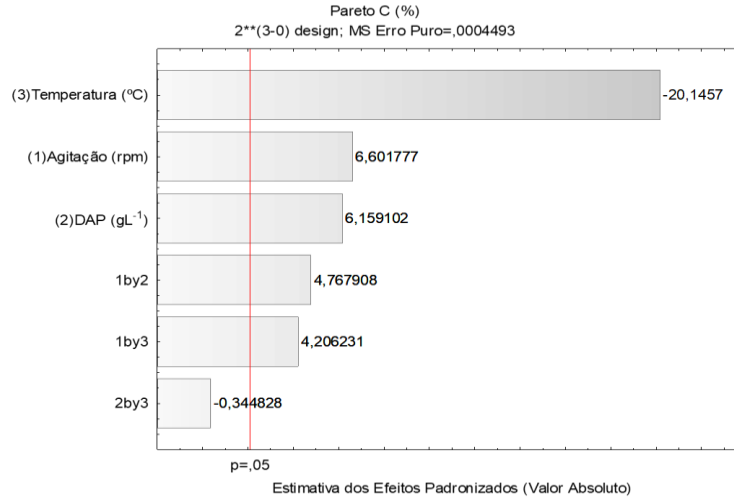


Figura 10. Gráficos de probabilidade normal para as respostas do planejamento fatorial. a) Rendimento b) Conversão c) Concentração máxima de levo-2,3-butanodiol

a)



b)



c)

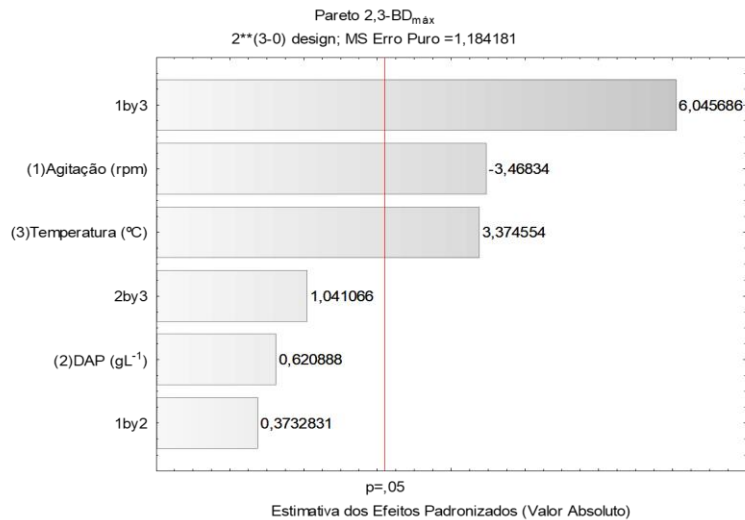


Figura 11. Gráficos de pareto para as respostas do planejamento fatorial. a) Rendimento b) Conversão c) Concentração máxima de levo-2,3-butanodiol

Considerando que os erros seguem uma distribuição normal, utilizou-se as médias quadráticas com o objetivo de avaliar a significância de cada modelo. A análise de variância ANOVA foi realizada para as respostas do modelo proposto pelo planejamento fatorial.

O modelo empírico para o rendimento segue os valores mostrados na Tabela 6, desconsiderando os valores com  $p > 0,05$ , este ficaria conforme a equação 4 a seguir. A máxima variação explicável para o modelo foi de 75,82%. Apesar deste ser significativo pelo Teste F relacionando as fontes de variação de regressão e resíduos, dado que o F calculado foi 5 vezes maior que o tabelado, um segundo teste F relacionando as médias quadráticas da falta de ajuste e erro puro sugere a falta de ajuste ao modelo linear, dado que o F calculado é maior que o tabelado. Desta forma, o modelo não é adequado para fins de predição. O gráfico de valores observados versus preditos (Figura 12) confirma esta hipótese devido a não distribuição aleatória dos valores. Adicionalmente, foi realizado um teste de curvatura na análise DOE onde a curvatura foi significativa, com p-valor de 0,0119, indicando que o modelo não é linear.

Tabela 6. Efeitos e coeficientes do modelo do planejamento fatorial para a resposta rendimento.

Fator	Efeitos	t(18)	p-valor	-95% (Limite de Confiança)	+95% (Limite de confiança)	Coefficientes
Média	0,183689	49,56201	0,000000	0,175903	0,191476	0,183689
(1) Agitação (rpm)	-0,032408	-4,12201	0,000640	-0,048926	-0,015890	-0,016204
(2) DAP (g/L-1)	-0,006078	-0,77303	0,449540	-0,022595	0,010440	-0,003039
(3) Temperatura (°C)	0,066082	8,40505	0,000000	0,049564	0,082599	0,033041
1 by 2	-0,008020	-1,02011	0,321193	-0,024538	0,008498	-0,004010
1 by 3	0,037635	4,78682	0,000148	0,021117	0,054152	0,018817
2 by 3	0,006945	0,88340	0,388665	-0,009572	0,023463	0,003473

$$Y_{P/S} = 0,184 - 0,0162 X_1 + 0,0330 X_3 + 0,0188 X_1 X_3$$

(Eq.4)

Tabela 7. Análise ANOVA para resposta rendimento  $Y_{P/S}$ 

Fonte de variação	S.Q.	Nº GL	M.Q.
Regressão	0,04190	6	0,00698
Resíduos	0,00957	20	0,00048
Falta de ajuste	0,00290	2	0,00145
Erro puro	0,00668	18	0,00037
S.Q. <sub>T</sub>	0,05147	26	
% de variação explicada	81,40%		
% máxima de variação explicável	75,82%		
<b>Valor F</b>	<b>Calculado</b>	<b>Tabelado</b>	
F <sub>6,20</sub>	14,58938	2,598978	
F <sub>2,18</sub>	3,905295	3,554557	

S.Q.: Soma quadrática; NºGL: Número de graus de liberdade. M.Q.= Média quadrática. S.Q.<sub>T</sub>: Soma quadrática total em torno da média.

O modelo empírico obtido para a conversão de açúcares está apresentado na Tabela 8 e exemplificado na Equação 5. A máxima variação explicável (Tabela 9) foi de 88,49%. Este modelo também foi estatisticamente significativo pelo teste F, onde o F calculado foi 11 vezes maior que o tabelado, entretanto, o segundo teste também mostra falta de ajuste ao modelo linear. Apesar do gráfico de valores preditos versus observados sugerir uma distribuição aleatória dos pontos, a hipótese de falta de ajuste do modelo linear foi confirmada pela análise de curvatura do modelo que apresentou  $p=0,000051 < 0,05$ , ou seja, esta é significativa e o modelo linear pode não ser adequado para a predição desta resposta.

Tabela 8. Efeitos e coeficientes do modelo do planejamento fatorial para a resposta conversão de açúcares.

Fator	Efeitos	t(18)	p-valor	-95% (Limite de Confiança)	+95% (Limite de confiança)	Coefficientes
Média	0,776434	190,3331	0,000000	0,767863	0,785004	0,776434
(1) Agitação (rpm)	0,057129	6,6018	0,000003	0,038949	0,075310	0,028565
(2) DAP (gL-1)	0,053298	6,1591	0,000008	0,035118	0,071479	0,026649
(3) Temperatura (°C)	-0,174333	-20,1457	0,000000	-0,192514	-0,156153	-0,087167
1 by 2	0,041260	4,7679	0,000154	0,023079	0,059440	0,020630
1 by 3	0,036399	4,2062	0,000531	0,018218	0,054580	0,018200
2 by 3	-0,002984	-0,3448	0,734220	-0,021165	0,015197	-0,001492

$$C\% = 0,776 + 0,0286 X_1 + 0,0266X_2 - 0,0872X_3 + 0,0206X_1X_2 + 0,0182X_1X_3$$

(Eq.5)



Tabela 9. Análise ANOVA para resposta conversão de açúcares C%

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº GL	Média Quadrática
Regressão	0,24973	7	0,03568
Resíduos	0,02292	19	0,00121
Falta de ajuste	0,01484	1	0,01484
Erro puro	0,00809	18	0,00045
TOTAL	0,27266	26	
% de variação explicada	91,59%		
% máxima de variação explicável	88,49%		
<b>Valor F</b>	<b>Calculado</b>		<b>Tabelado</b>
F <sub>7,19</sub>	29,56964		2,543534
F <sub>1,18</sub>	33,02014		4,413873

A máxima produção de levo-2,3-butanodiol foi descrita conforme os fatores do modelo empírico apresentado na Tabela 10 e mostrados na Equação 6. A máxima variação explicável foi de 67,34%. O teste F sugere que o modelo não foi significativo, uma vez que o F calculado foi apenas 3 vezes maior que o tabelado. Adicionalmente, o gráfico de valores predito versus observado mostra que os valores não se distribuem aleatoriamente, desta forma o modelo proposto não pode ser considerado como preditivo.

Tabela 10. Efeitos e coeficientes do modelo do planejamento fatorial para a resposta concentração de levo-2,3-butanodiol.

Fator	Efeitos	t(18)	p-valor	-95% (Limite de Confiança)	+95% (Limite de confiança)	Coeficientes
Média	9,73815	46,49959	0,000000	9,29816	10,17813	9,738148
(1) Agitação (rpm)	-1,54083	-3,46834	0,002743	-2,47418	-0,60749	-0,770417
(2) DAP (g/L-1)	0,27583	0,62089	0,542456	-0,65751	1,20918	0,137917
(3) Temperatura (°C)	1,49917	3,37455	0,003376	0,56582	2,43251	0,749583
1 by 2	0,16583	0,37328	0,713298	-0,76751	1,09918	0,082917
1 by 3	2,68583	6,04569	0,000010	1,75249	3,61918	1,342917
2 by 3	0,46250	1,04107	0,311627	-0,47085	1,39585	0,231250

$$C_{m\acute{a}x} = 9,738 - 0,770 X_1 + 0,750X_3 + 1,343X_1X_3$$

(Eq.6)

Tabela 11. Análise ANOVA para resposta concentração máxima de levo-2,3-butanodiol

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº GL	Média Quadrática
Regressão	77,90094	7	11,12871
Resíduos	24,41847	19	1,28518
Falta de ajuste	3,10320	1	3,10320
Erro puro	21,31527	18	1,18418
TOTAL	102,31941	26	
% de variação explicada	76,14%		
% máxima de variação explicável	67,34%		
<b>Valor F</b>	<b>Calculado</b>		<b>Tabelado</b>
F <sub>7,19</sub>	8,65923		2,543534
F <sub>1,18</sub>	2,62054		4,413873

Ainda que os modelos propostos não demonstrem caráter preditivo, a análise de superfície de resposta (Figura 13) foi realizada como referência para experimentos posteriores dentro da faixa de variáveis propostas. Além disto, observações experimentais também foram utilizadas para a seleção dos parâmetros posteriormente a estas análises.

Para construção da superfície de resposta, optou-se por manter a suplementação de DAP no ponto central (5 g.L<sup>-1</sup>) devido a sua significância para a conversão. Á vista disto, o rendimento seria favorecido para a temperatura de 38 °C independente da agitação empregada, a conversão por sua vez, seria potencializada na temperatura de 32°C. Já a concentração de levo-2,3-butanodiol atingiria melhores resultados nos extremos, menor agitação e menor temperatura (32 °C, 140 rpm) e maior agitação e maior temperatura (38 °C e 260 rpm).

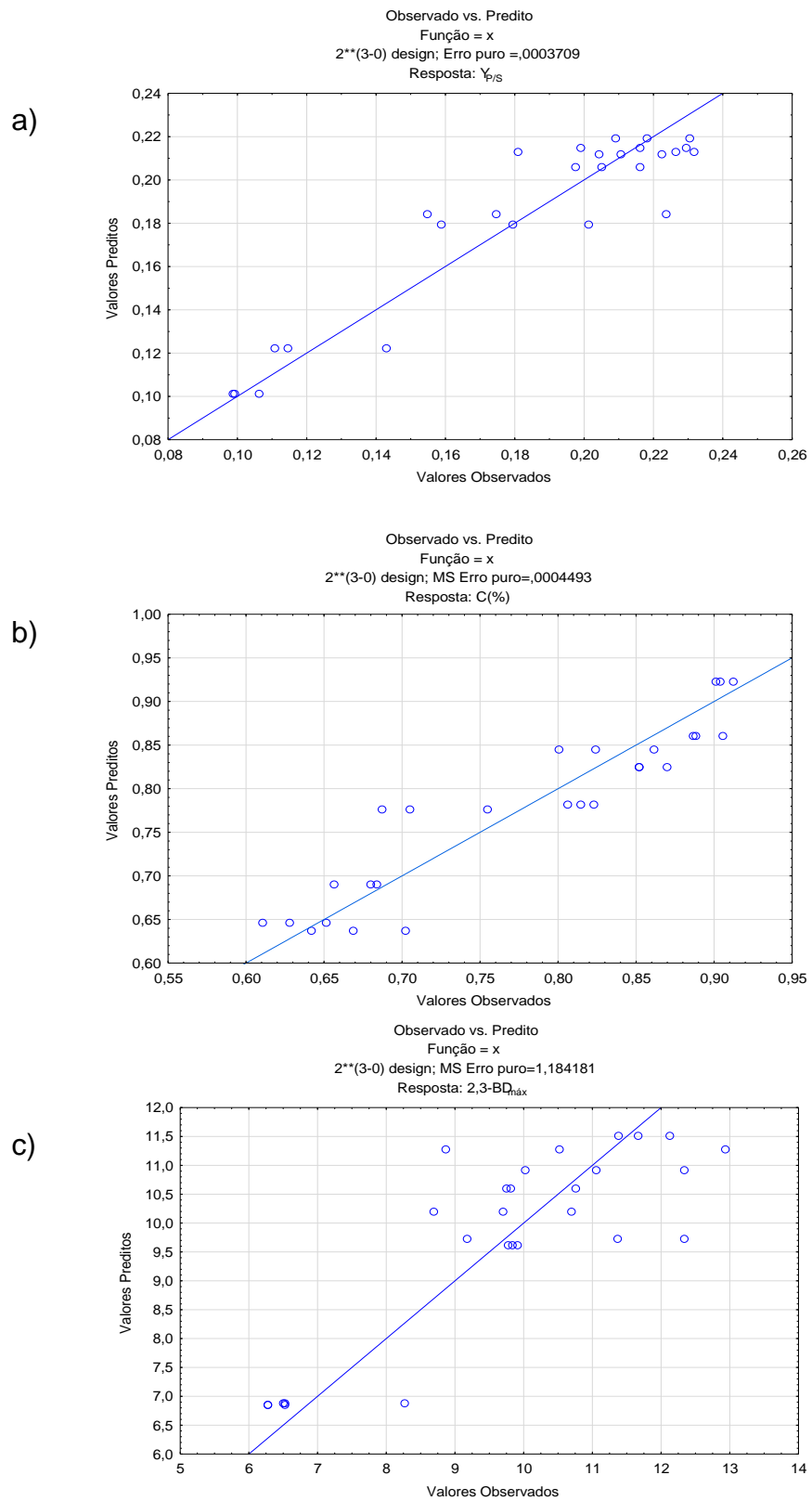
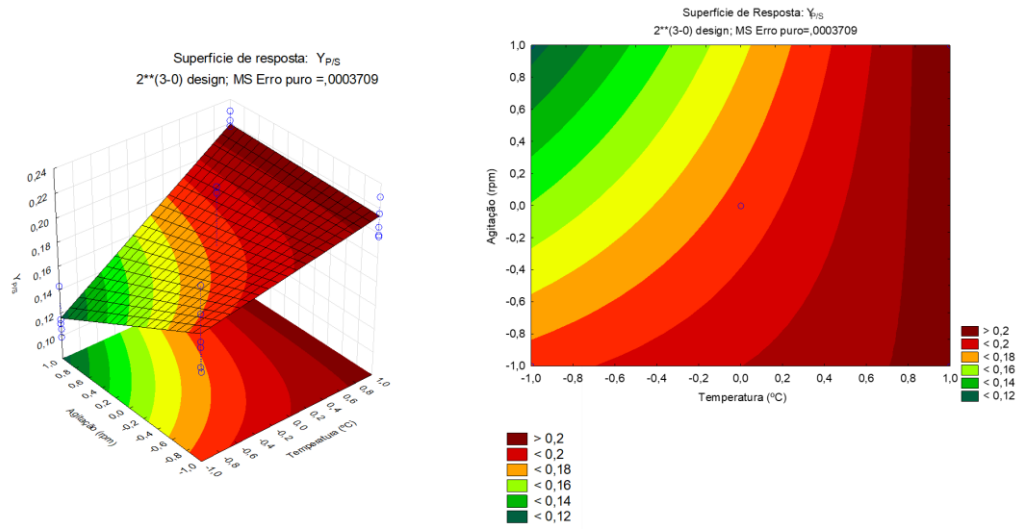
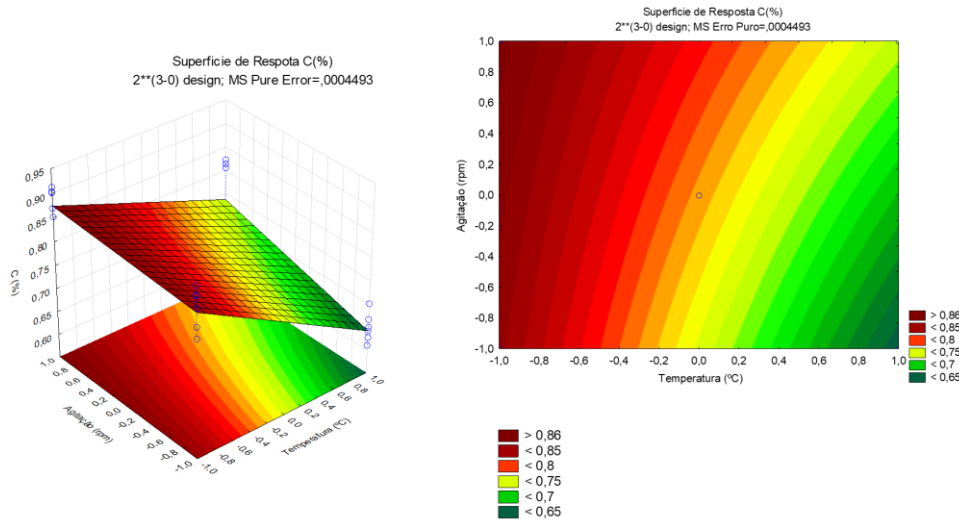


Figura 12. Gráfico dos valores preditos versus observados para as respostas do planejamento fatorial. a) Rendimento b) Conversão c) Concentração máxima de levo-2,3-butanodiol

a)



b)



c)

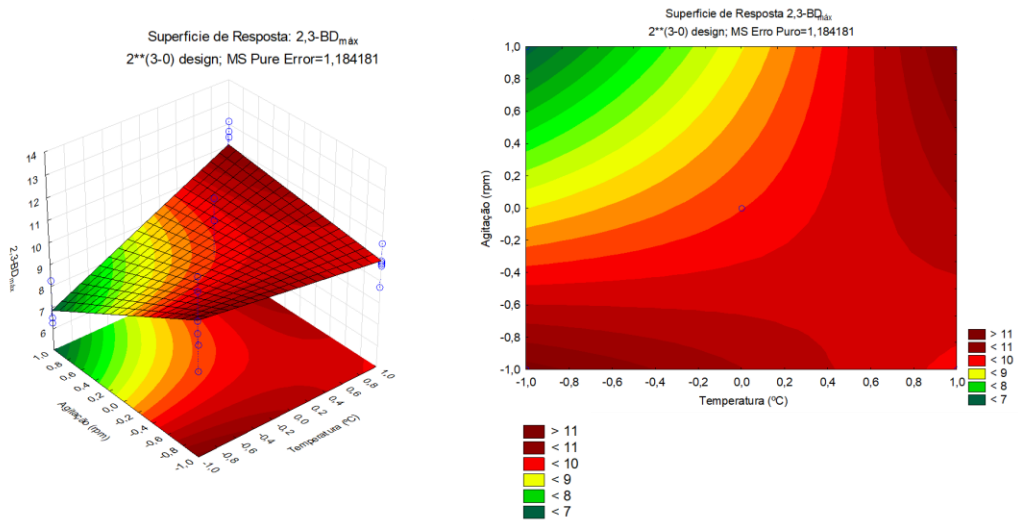


Figura 13. Superfícies de resposta para as respostas do planejamento fatorial. a) Rendimento b) Conversão c) Concentração máxima de levo-2,3-butanodiol

#### 4.1.1 Formação de EPS

As fermentações conduzidas apresentaram um aumento de viscosidade do meio durante o processo e se mostraram mais acentuadas e visíveis nos experimentos conduzidos a 32°C e 35°C (Figura 14), o maior consumo de substrato nestes experimentos sugere que parte do consumo foi destinado a produção de EPS. O acréscimo da temperatura para 38°C mostrou-se relevante em relação ao decréscimo da viscosidade do meio e consequente redução de custos com operações de *downstream*, uma vez que nesta temperatura não foi observado alteração visível da viscosidade, mesmo em menores agitações.

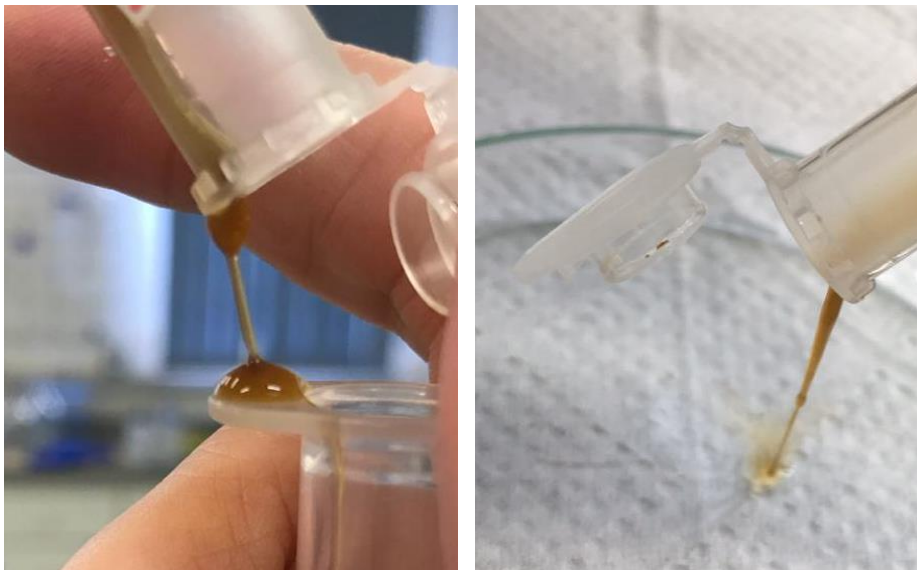


Figura 14 Aumento da viscosidade do meio nas temperaturas de 32°C e 35°C

Segundo Rütering et al. (2016) *P. polymyxa* é conhecida pela produção de dois polissacarídeos *levan* e *paenan* e suas concentrações são dependentes principalmente do tipo do substrato utilizado, *levan* é produzido durante o crescimento em sacarose e o heteropolissacarídeo *paenan* produzido quando o cultivo é realizado em carboidratos monoméricos como a glicose, dentre estes substratos a sacarose é majoritariamente empregada em bioprocessos com *P. polymyxa* para produção de EPS devido a obtenção de altos rendimentos do polissacarídeo do tipo *levan*, concentrações

de até 54 gL<sup>-1</sup> foram obtidas por Lee et al. (1997) utilizando o microrganismo *B. polymyxa* KCTC 8648P e sacarose como substrato. Ambos os polímeros podem interferir no processo de fermentação e de recuperação de produtos, uma vez que a viscosidade do meio aumenta, a transferência de massa e os processos de *downstream* ficam prejudicados (HÄSSLER et al., 2012).

Efeito análogo foi mostrado por Hässler et al. (2012), os autores estudaram uma faixa de temperatura entre 30 e 41,5 °C , de forma que a temperaturas entre 37°C e 40 °C foram indicadas como adequadas para o processo. Ainda segundo os autores a menor formação de EPS foi atingida na temperatura de 41,5°C, entretanto o crescimento e a concentração de produtos também foram reduzidos. Schilling et al. (2020) visando a redução deste fator, estudaram a supressão do gene responsável pela formação de EPS e esporos por *P. polymyxa* DSM 365, estes evidenciaram que foi possível a anulação de 100% dos genes responsáveis, além de atingir um aumento de produtividade em cerca de 45% para produção de 2,3-BDO e rendimento de 0,43. Este estudo evidencia que o efeito de formação do EPS poderia ter sido reduzido para o melaço com o emprego deste microrganismo geneticamente modificado. Todavia, neste trabalho foi assumida a dependência entre temperatura e alteração da viscosidade do meio pela formação de EPS.

#### **4.1.2 Seleção dos parâmetros experimentais**

A seleção das condições experimentais neste estudo levou em consideração a produção e a economia do processo como um todo, visando tanto o processo fermentativo quanto as etapas para recuperação do produto. Diante dos resultados encontrados temperaturas menores que 38°C foram desconsideradas, dado que a viscosidade do meio foi visivelmente alterada, prejudicando a transferência de massa e tornando o processo para recuperação dos produtos oneroso. Desta forma, as condições experimentais E, F, G e H foram inicialmente selecionadas, sendo comparadas com os parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 5. A Figura 15 demonstra estas comparações.

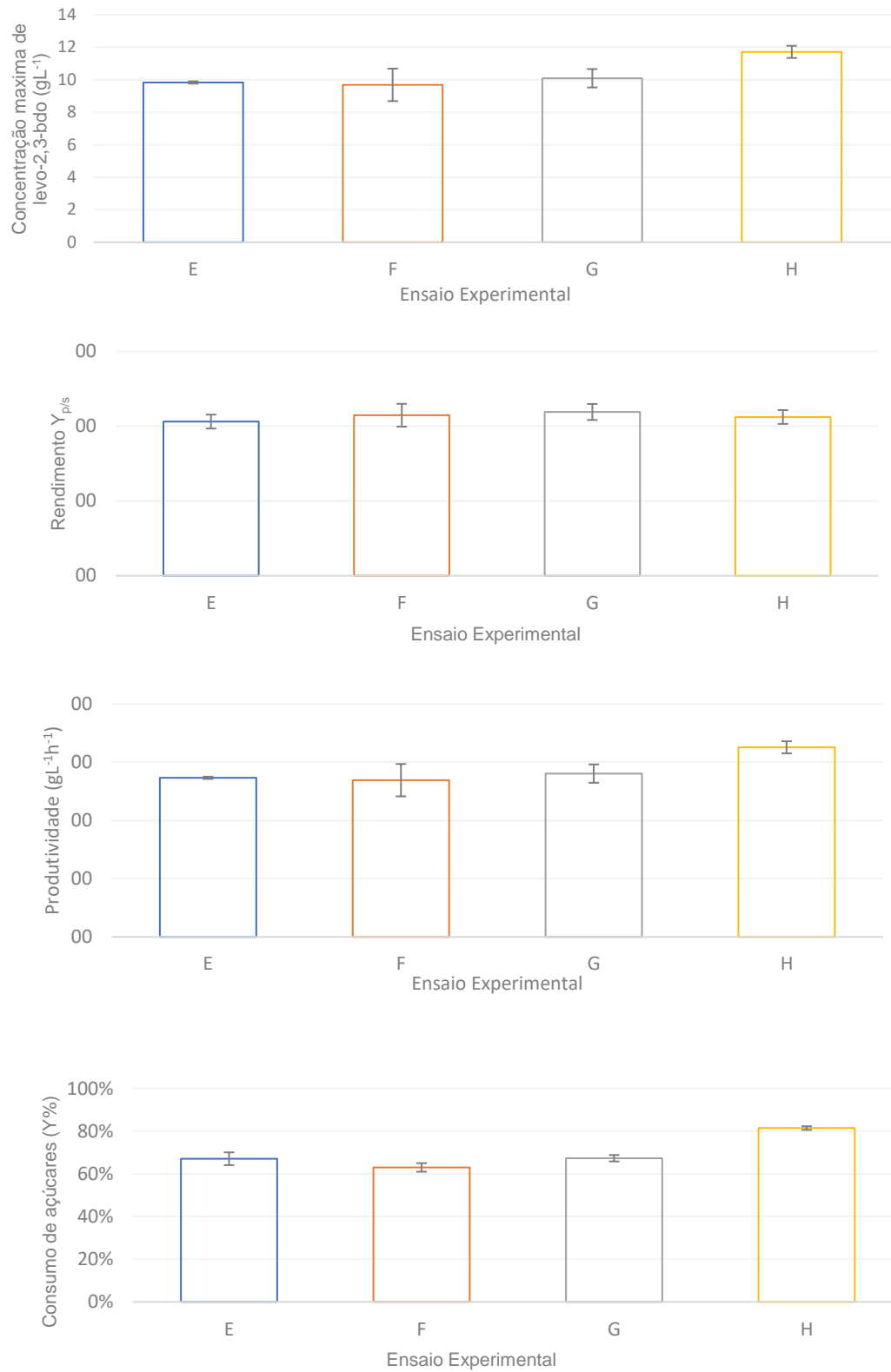


Figura 15. Parâmetros cinéticos dos ensaios pré-selecionados E, F, G e H. (a) Concentração máxima de Levo-2,3-butanodiol; (b) Rendimento de levo-2,3-butanodiol; (c) Produtividade; (d) Consumo de açúcares

A análise da Figura 15 permite perceber que o meio H apresentou melhores resultados para produção de *levo*-2,3-butanodiol. Em relação a concentração máxima de produto este atingiu cerca de  $11,7 \text{ g.L}^{-1}$  e produtividade de  $0,3 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Além disto, os experimentos conduzidos com rotação de 140 rpm apresentaram formação de biofilme na parede dos frascos, apesar de não ter sido perceptível a alteração de viscosidade do meio, estes foram desconsiderados, já que a formação destes filmes também representa um fator negativo para a viabilidade do processo. Adicionalmente, a análise das superfícies de resposta mostra que no caso da impraticabilidade de temperaturas menores, o melhor resultado de rendimento e concentração gerado com a escolha da temperatura de  $38^\circ\text{C}$  seria obtido com a agitação de 260 rpm. Desta forma, as condições do experimento H:  $38^\circ\text{C}$ , 260 rpm foram eleitas para experimentos futuros.

#### 4.1.2.1 Efeito da concentração de substrato

Com o objetivo de avaliar o efeito da concentração de substrato foi realizado um ensaio adicional (Ensaio S) com os parâmetros pré-selecionados anteriormente e concentração de açúcares redutores totais de  $50 \text{ g.L}^{-1}$ . As Figuras 16 e 17 mostram um comparativo entre os parâmetros cinéticos dos ensaios H e S para 36 horas de fermentação.

a)

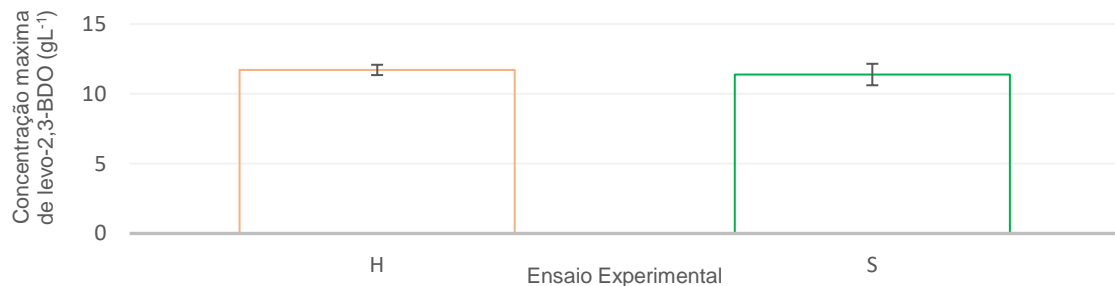
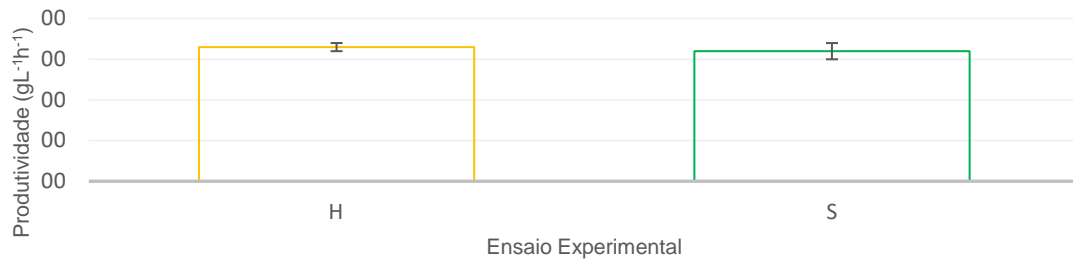


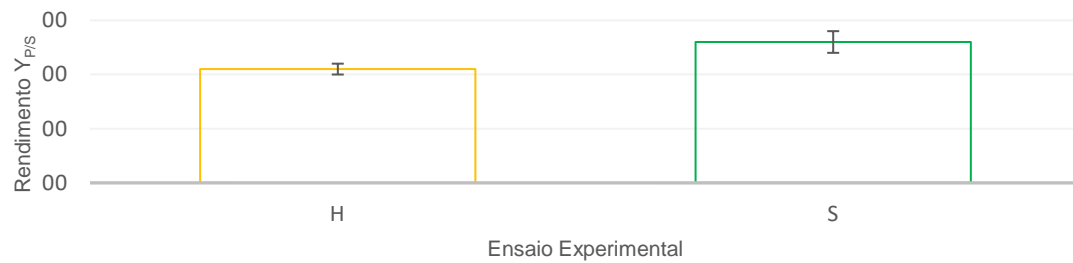
Figura 16 Parâmetros cinéticos dos ensaios H e S. (a) Concentração máxima de *Levo*-2,3-butanodiol.



b)



c)



d)

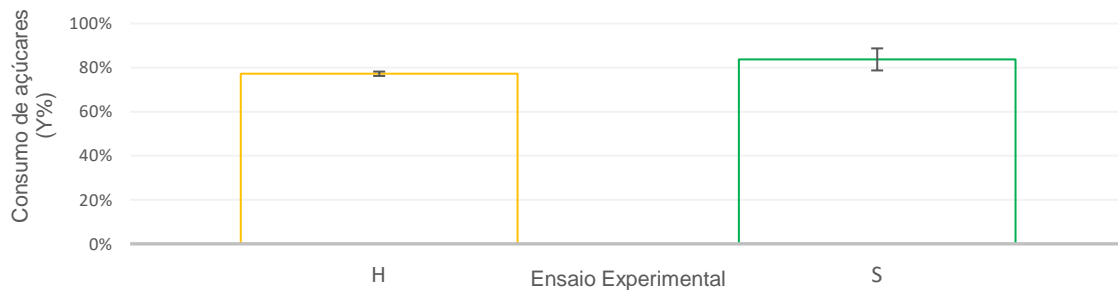


Figura 17. Parâmetros cinéticos dos ensaios H e S. (b) Produtividade; (c) Rendimento de levo-2,3-butanodiol; (d) Consumo de açúcares

A redução da carga de substrato não representou perda de desempenho do processo, indicando que é possível reduzir a carga para 50g L<sup>-1</sup>, proporcionando uma economia em gastos com substratos para o processo. Em relação ao experimento H, houve um pequeno ganho de rendimento e um aumento na conversão. A Tabela 12 resume as respostas encontradas nos ensaios.

Tabela 12. Parâmetros cinéticos dos ensaios H e S.

Experimento	$C_{so}$ (g L <sup>-1</sup> )	$t_{MP}$ (h)	$C_{BDOmáx}$ (g L <sup>-1</sup> )	$Y_{P/S}$	Pv (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	C (%)
H	67,81±0,19	36	11,72±0,37	0,21±0,01	0,33±0,01	77,19±0,01
S	50,11±1,62	36	11,39±0,77	0,26±0,02	0,32±0,02	84,22%±0,05

Diante dos resultados expostos, considerando a produção e rendimento de levo-2,3-butanodiol, além dos gastos produtivos, os parâmetros utilizados no ensaio S foram selecionados como mais adequados para os experimentos posteriores.

#### 4.2 Fermentação em meio sintético com açúcares puros

Foram realizados ensaios em meio sintético descrito pela literatura por Okonkwo *et al.* (2017). Os autores utilizaram a glicose como fonte de carbono, entretanto, com o objetivo de avaliar o perfil de consumo dos demais substratos envolvidos neste trabalho, este foi substituído por sacarose, frutose e xilose. Além disto, o consumo de xilose concomitante com estes também foi avaliado. Desta forma, foram realizados sete ensaios identificados conforme a Tabela 13.

Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer em câmara incubadora e os parâmetros utilizados foram os determinados na etapa anterior: concentração inicial de 50 gL<sup>-1</sup> de substrato, 260 rpm e temperatura de 38 °C.

Tabela 13. Planejamento dos ensaios com açúcares puros em meio sintético

Ensaio	Açúcar	Proporção
1-G	Glicose	1
2-S	Sacarose	1
3-F	Frutose	1
4-X	Xilose	1
5-GX	Glicose + Xilose	3:1
6-SX	Sacarose + Xilose	3:1
7-FX	Frutose + Xilose	3:1

A Figura 18 a seguir mostra as concentrações dos substratos puros com o tempo de fermentação, correspondentes aos ensaios 1-G, 2S, 3-F e 4-X. *P. polymyxa* não foi capaz de fermentar xilose como única fonte de carbono. A curva de concentração de sacarose apresentou inclinação mais acentuada atingindo a fase estacionária em 12 horas, enquanto frutose e glicose mostraram inclinações mais suaves e fase estacionária em 24 horas.

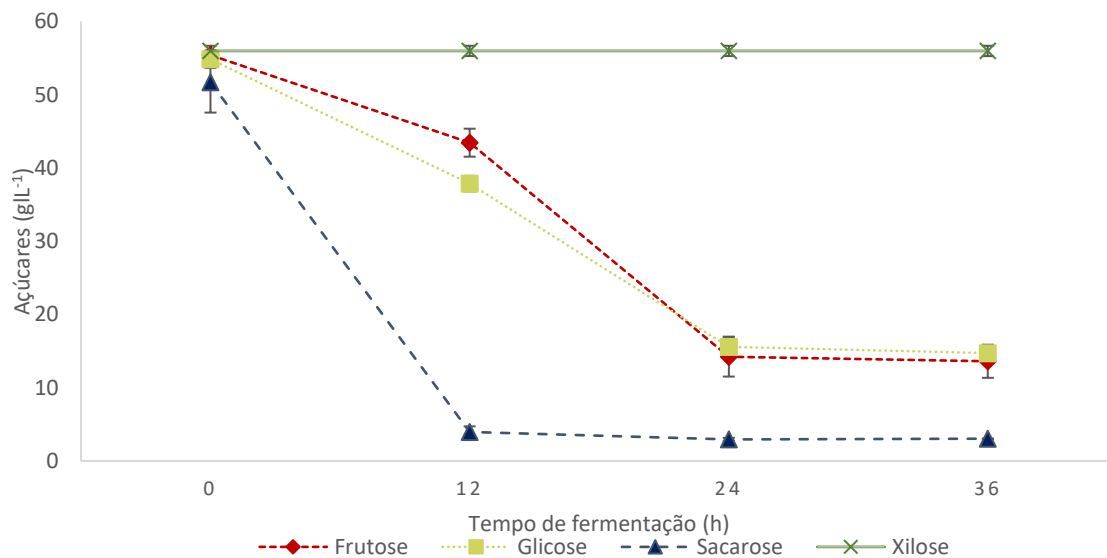


Figura 18. Cinética de consumo dos açúcares: frutose, glicose e sacarose (Ensaio 1-G, 2-S, 3-F e 4-X)

A Figura 18 mostra o consumo de xilose em presença dos outros substratos. Não foi observado consumo de xilose quando este estava em presença de glicose, apesar desta ter sido consumida totalmente em 36 horas, o microrganismo não metabolizou a pentose até o fim deste período. Marwoto et al. (2002) obtiveram resultado semelhante, o consumo de glicose e xilose em diferentes faixas de temperatura (30-40°C) foi estudado pelos autores, o consumo simultâneo só foi possível a 39°C, de forma que nas temperaturas mais baixas a glicose foi totalmente consumida e a xilose permaneceu no meio mesmo após longos períodos de fermentação.

Os ensaios com sacarose e frutose mostraram que a xilose pode ser consumida concomitantemente com estes. A Tabela 14 exhibe os parâmetros cinéticos para os ensaios.

Tabela 14. Parâmetros cinéticos para os ensaios com açúcares puros em meio sintético.

Ensaio	Açúcar	Proporção	C <sub>so</sub> (g L <sup>-1</sup> )	t(h)	C <sub>BDO36h</sub> (g L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub>	Pv (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	C (%)
1-G	Glicose	1	54,85±1,19	36	16,53±0,54	0,41±0,027	0,46±0,015	73,63%±0,019
2-S	Sacarose	1	51,69±4,13	36	13,28±2,00	0,26±0,027	0,37±0,056	94,33%±0,0030
3-F	Frutose	1	55,40±0,52	36	17,12±0,40	0,40±0,011	0,48±0,011	77,11%±0,042
4-X	Xilose	1	55,98±0,70	36	0	0	0	0
	Glicose +		54,89(39,64±1,41glicose:					
5-GX	Xilose	3:1	15,25±0,27 xilose)	36	16,62±0,18	0,40±0,0044	0,46±0,050	73,79±0,012
	Sacarose		51,85(37,63±1,74sacarose:					
6-SX	+ Xilose	3:1	14,22±0,14xilose)	36	13,72±0,50	0,32±0,0033	0,38±0,014	83,44%±0,0031
	Frutose		53,83(40,10±1,02frutose:					
7-FX	+ Xilose	3:1	13,73±0,35 xilose)	36	16,99±0,19	0,41±0,026	0,47±0,0053	76,46±0,014

C<sub>so</sub>: Concentração inicial de substrato. C<sub>BDO36h</sub>: concentração levo-2,3-BDO obtida em 36 horas de fermentação; Y<sub>P/S</sub>: Rendimento de 2,3-BDO; t: Tempo de fermentação; e Pv: Produtividade volumétrica de 2,3-BDO; C%: Porcentagem de conversão de substrato.

Glicose e frutose apresentaram melhor desempenho fermentativo frente a sacarose, os dois primeiros obtiveram rendimentos próximos de 0,4, enquanto a sacarose atingiu 0,26. O meio composto por frutose e xilose atingiu valores comparáveis ao meio com a hexose pura. Para o meio formado por sacarose e xilose observou-se um acréscimo no rendimento em cerca de 19% em relação ao meio contendo o dissacarídeo puro.

A produção de 2,3-levo-butanodiol foi próxima para os meios contendo frutose e glicose (17 g.L<sup>-1</sup> e 16,5 g.L<sup>-1</sup> respectivamente), já para a sacarose esta foi de cerca de 13 g.L<sup>-1</sup>. Apesar do acréscimo de xilose ter contribuído para o rendimento do processo, este não afetou consideravelmente a concentração de produto final, provavelmente porque em 36 horas de fermentação os meios contendo sacarose já atingiram a concentração máxima de produto, uma vez que a fase estacionária é evidenciada após 12 horas de fermentação.

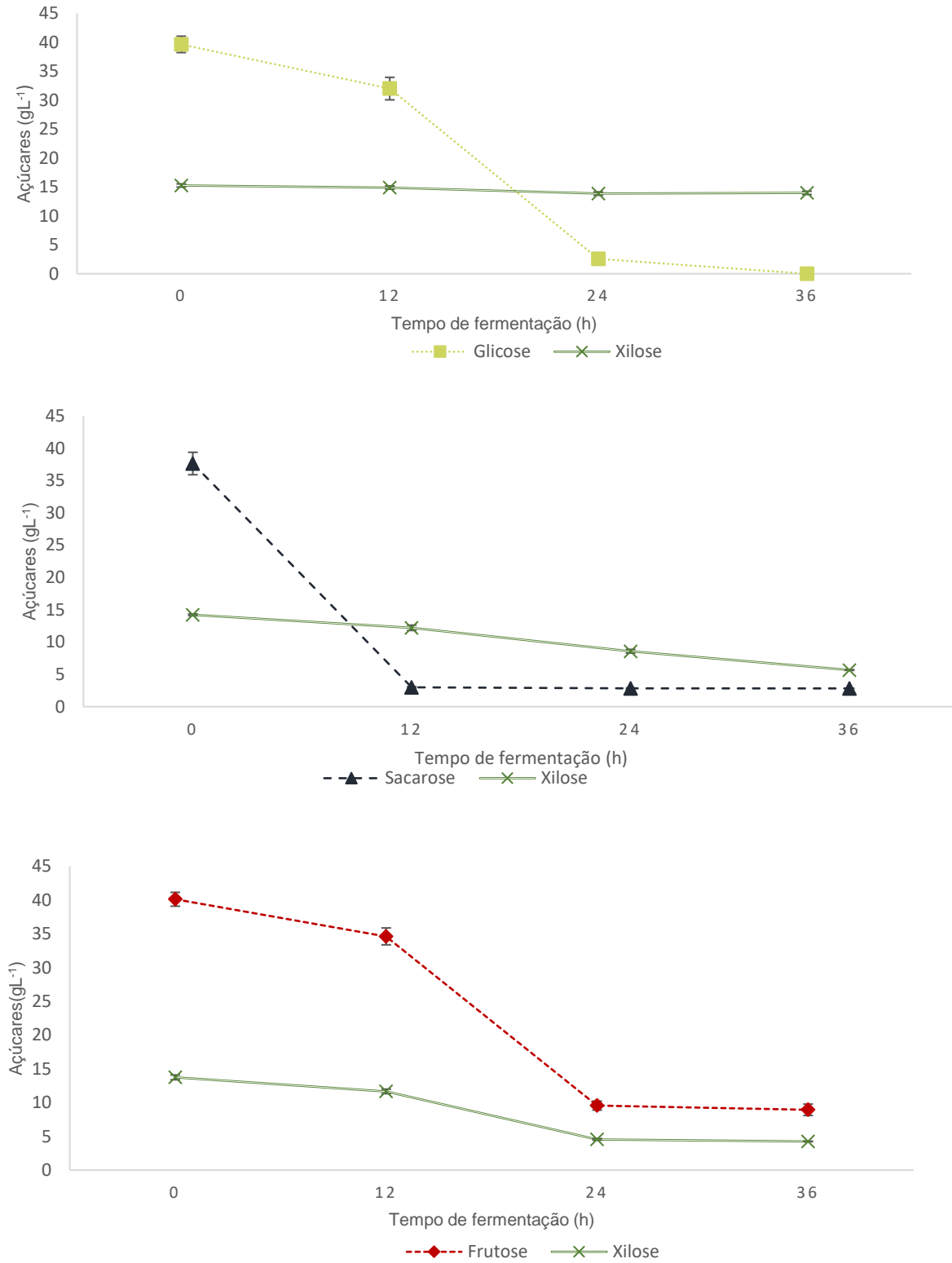


Figura 19. Cinética do consumo de xilose em presença de outros açúcares. Ensaio 5-GX, 6-SX e 7-FX.

As maiores taxas de conversão de açúcar foram encontradas nos meios contendo sacarose, para o meio puro este atingiu valores superiores a 90%, já para o mesclado com xilose o valor foi reduzido para cerca de 83%, porém ainda foi maior que a média dos outros substratos que se manteve entre 73 e 77%. Rütering et al. (2016) estudaram a produção de EPS por *Paenibacillus sp.* 2H2 e concluíram que a formação de EPS se inicia no fim da fase exponencial e principalmente na fase estacionária, como os experimentos com sacarose apresentaram uma fase estacionária maior considerando o tempo de fermentação de 36 horas, parte do açúcar pode ter sido destinado a esta rota. Ainda segundo os autores a sacarose em comparação com a glicose apresentou um melhor desempenho para formação de EPS, chegando a até 11,3 g.L<sup>-1</sup>, concentrações de 35,26 g.L<sup>-1</sup> foram apresentadas por Liu et al. (2010), utilizando *P. polymyxa* EJS-3 em meio contendo sacarose. Apesar desta hipótese, a viscosidade do meio se alterou de maneira menos proeminente que os experimentos conduzidos com melação, isto porque este último já possui viscosidade característica maior que o meio sintético, desta forma o efeito da formação de EPS foi mais eminente.

Os coprodutos da fermentação estão indicados na Figura 20. Uma maior concentração do isômero meso-2,3-butanodiol bem como de acetoína foram observados nos meios contendo sacarose. Okonkwo et al. (2017) observaram que o 2,3-BDO pode passar por isomerismo da forma *levo* para a *meso*, apesar de *P. polymyxa* produzir seletivamente a forma *levo*, quando esta está presente em quantidades tóxicas, o que ocorre nos maiores períodos de fermentação, o isomerismo age como uma estratégia metabólica de alívio de estresse, uma vez que a forma *meso* apresenta uma menor toxicidade. Além disto, ainda segundo os autores também é possível que ocorra a reação reversa, quando o 2,3-BDO volta a seu precursor acetoína devido a saturação no meio, já que também se mostra menos tóxica que o *levo*-isômero.

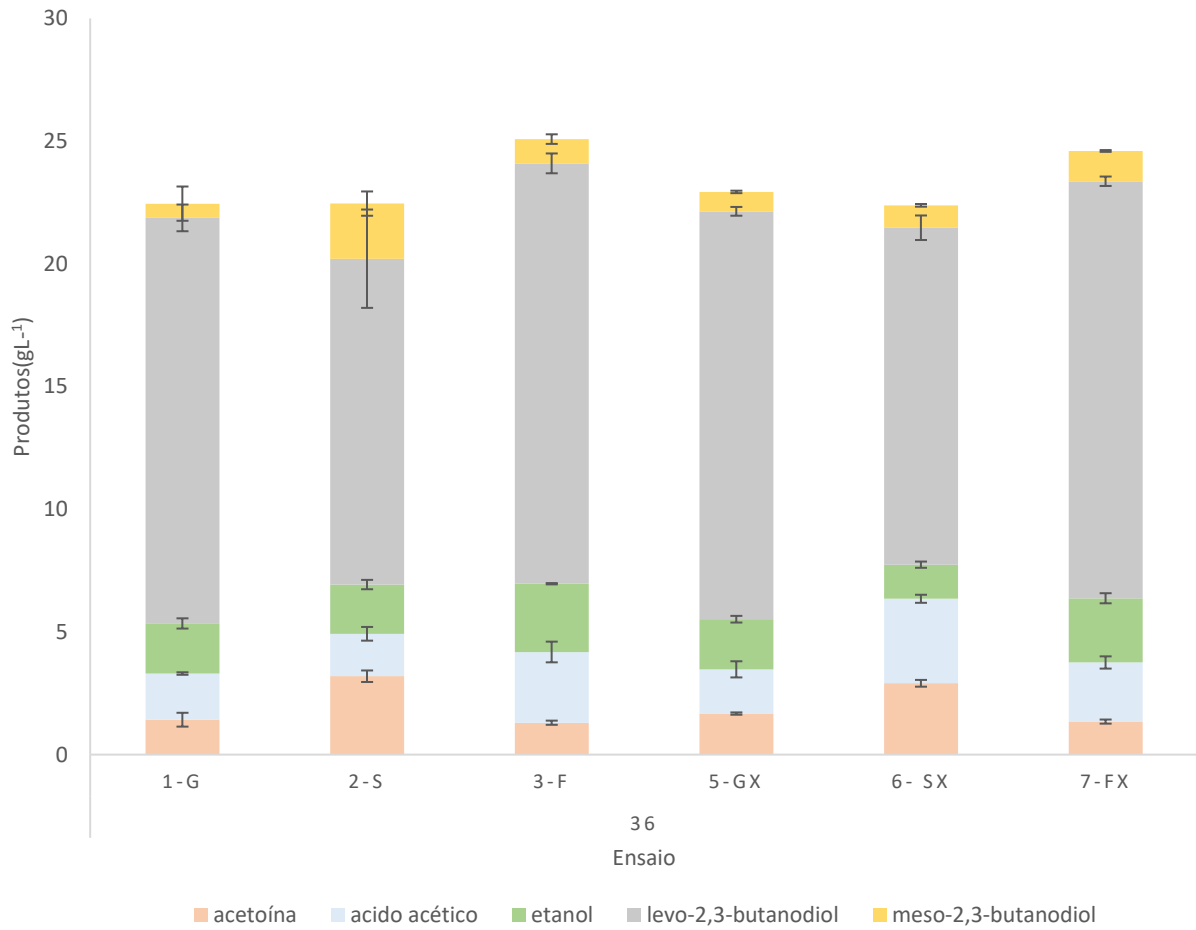


Figura 20. Fração de coprodutos nos ensaios conduzidos em meios sintéticos.

### 4.3 Comparação do desempenho da fermentação com meio contendo melaço versus meio sintético.

Para fins de comparação de desempenho o meio sintético utilizado como referência foi o ensaio contendo sacarose (2-S), uma vez que este é o açúcar majoritário na composição do melaço. O perfil de assimilação de substrato se mostrou diferente dos meios sintéticos (Figura 21), notou-se que em um primeiro momento ocorreu apenas a quebra de sacarose e o consumo concomitante de todos os substratos que compunham o meio ocorreu entre 12 e 24 horas, mesmo momento em que curva de produção de levo-2,3-butanodiol apresentou maior inclinação. Até o fim de 36 horas, glicose e frutose foram consumidas quase integralmente e um saldo de sacarose permaneceu em solução. A Figura 21 mostra o comparativo dos parâmetros cinéticos para os dois meios fermentativos.

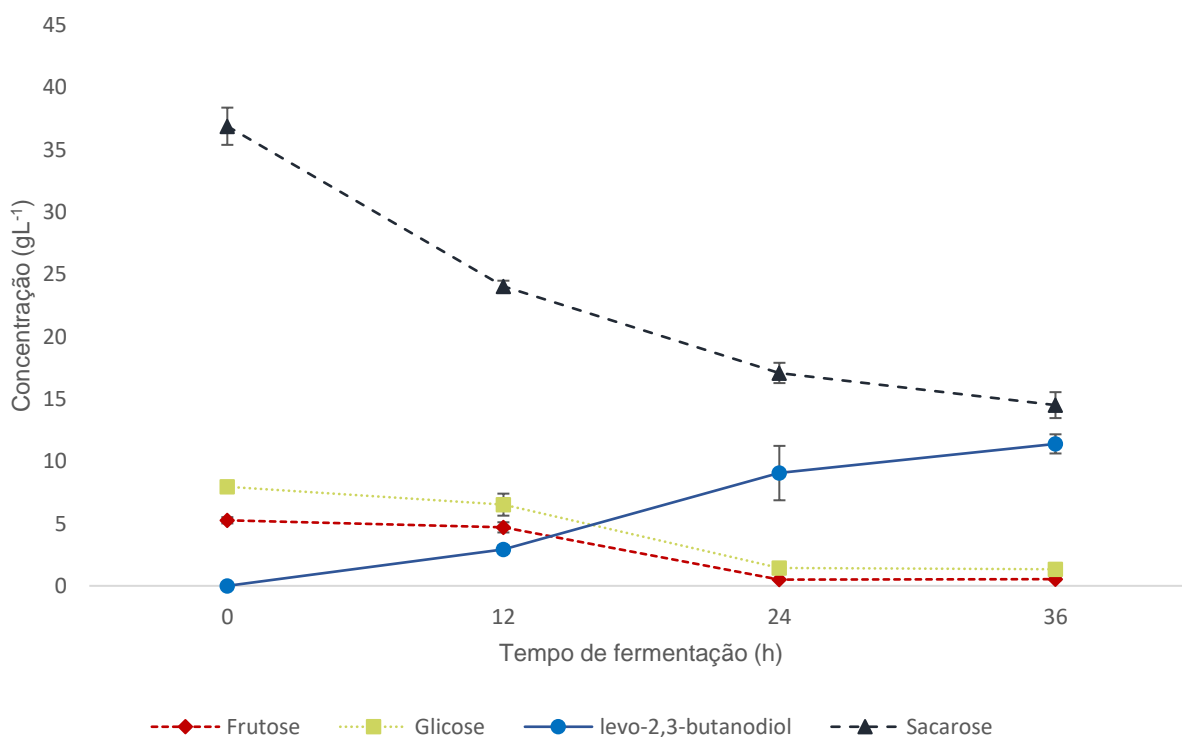


Figura 21. Perfil de consumo de açúcares e produção de levo-2,3-butanodiol para fermentação com melaço nas condições do ensaio S (38°C, 260 rpm)



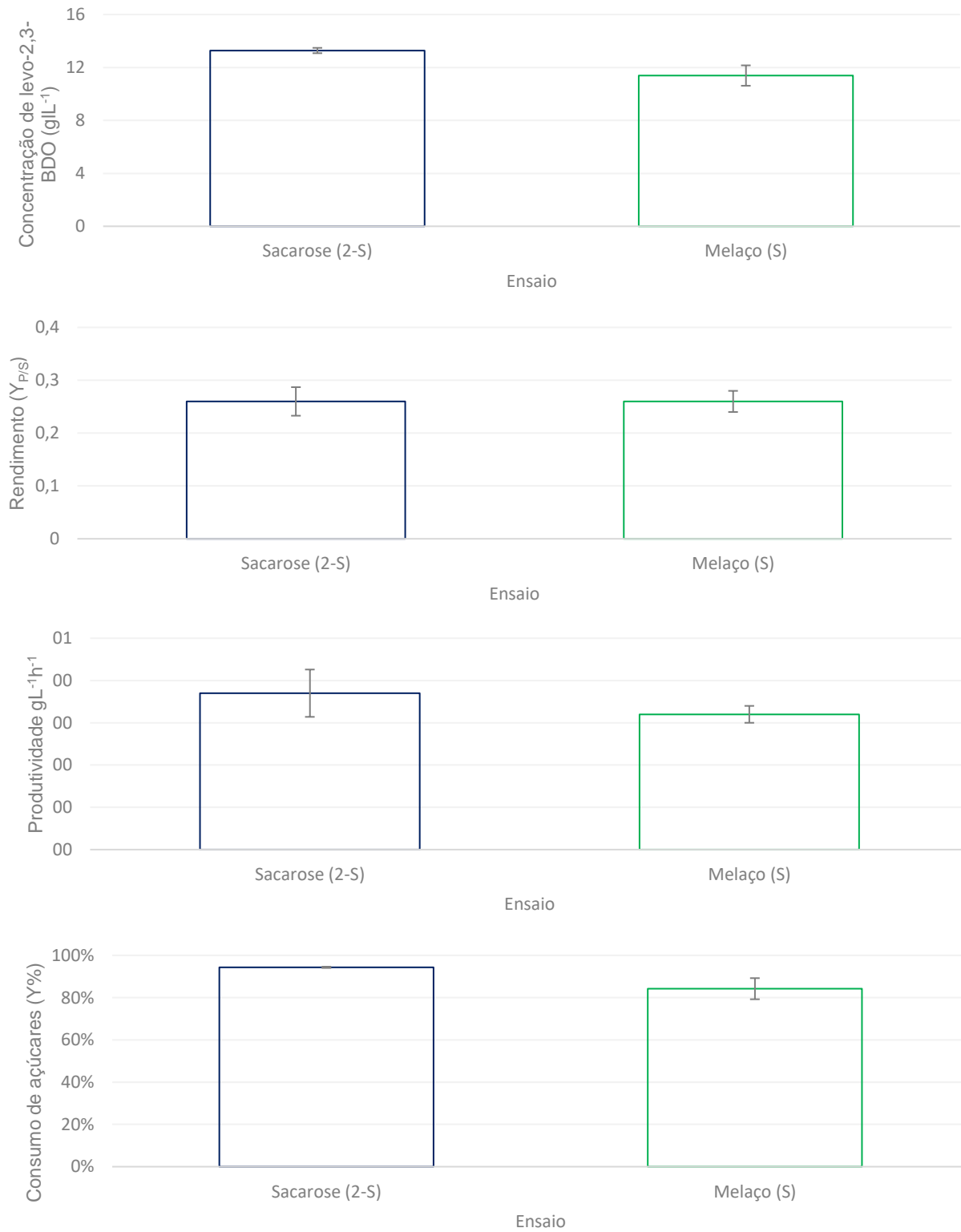


Figura 22. Comparativo dos parâmetros cinéticos das fermentações em meio sintético com sacarose e melaço

A produção de 2,3-BDO foi de cerca de  $14 \text{ g.L}^{-1}$  no meio sintético, chegando a concentrações de  $13 \text{ g.L}^{-1}$  e  $11 \text{ g.L}^{-1}$  no melaço. Por outro lado, os rendimentos foram muito próximos, cerca de 0,26, além disto, a conversão no meio sintético foi consideravelmente maior. A Figura 23 evidencia que a formação de coprodutos foi significativamente menor no meio contendo melaço (S), possivelmente porque a difusão do oxigênio no meio sintético foi facilitada em relação ao melaço e a rota de respiração se manteve mais ativa. Uma vez que este último teve a viscosidade visivelmente alterada durante a fermentação, o processo de transporte de oxigênio foi dificultado devido a película formada entre *headspace* e o meio fermentativo.

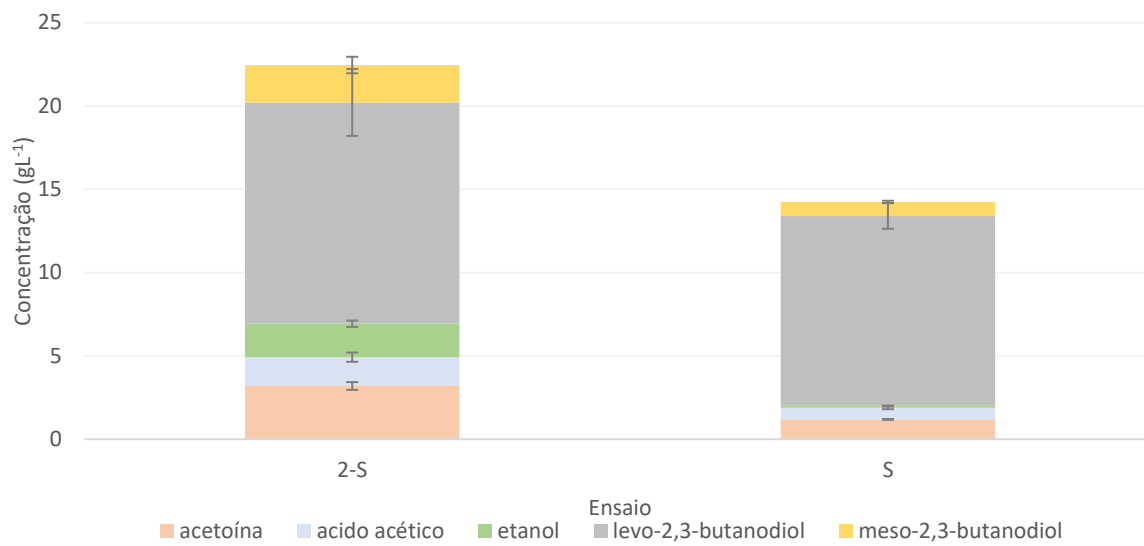


Figura 23. Formação de co-produtos no meio sintético e melaço (Ensaio 2-S e S)

Os resultados apresentados evidenciam que o melaço teve desempenho positivo em relação a substituição do meio sintético, já que este atingiu rendimento semelhante ao meio sintético, além de gerar uma menor concentração de subprodutos; isto representa uma diminuição de gastos com processo, uma vez que o substrato e as etapas de separação de produtos representam uma parcela considerável deste. Adicionalmente, Dai et al. (2015) evidenciaram que a etapa de esterilização do meio pode ser eliminada com a utilização de melaço como substrato e o microrganismo *Enterobacter cloacae* CGMCC 6053. Os autores partiram da hipótese de que o crescimento microbiano não seria favorecido em um meio com concentrações altas de açúcares (40-50%) como

o melaço, por meio da comparação da performance de um meio estéril e não estéril estes chegaram a resultados semelhantes para a formação de diol. Estes testes não foram realizados no trabalho em questão, mas reforçam a oportunidade de aplicação de melaço como meio de cultura, visando a viabilidade do processo.

#### **4.4 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico puro e destoxificado via *overliming***

Foram realizados experimentos em câmara incubadora para avaliar a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana de açúcar. Em um primeiro momento este foi utilizado em sua forma bruta, ou seja, sem nenhum tratamento para remoção de inibidores fermentativos e em um segundo momento este passou por uma etapa de *overliming*. As concentrações dos componentes do hidrolisado bruto foram de (g.L<sup>-1</sup>): 23,3 xilose, 6,5 glicose, 3,7 ácido acético, 0,5 furfural, 0,6 HMF e 1,3 de compostos fenólicos. Após o tratamento estas foram de (g.L<sup>-1</sup>): 21,2 xilose, 5 de glicose, 3,3 ácido acético, 0,2 furfural, 0,3 HMF e 0,97 de compostos fenólicos.

Em nenhum destes dois ensaios observou-se formação de produtos e crescimento celular. Os experimentos em meio sintético contendo apenas xilose também não foram bem sucedidos, demonstrando que nestas condições experimentais *P. polymyxa* DSM 365 não foi capaz de fermentar em um meio contendo apenas este monômero. Adicionalmente, os inibidores dos hidrolisados também podem ter contribuído para a inibição metabólica do microrganismo. Marwoto et al. (2002) estudaram a conversão de xilose em 2,3-butanodiol por *P. polymyxa*, os autores utilizaram meio anaeróbico com borbulhamento de nitrogênio, neste estudo a fermentação foi possível ainda que pequenas concentrações de produto tenham sido geradas. O processo foi realizado em batelada a 30°C e 120 rpm utilizando diferentes concentrações de xilose: g.L<sup>-1</sup> 15, 30 e 45 e foram obtidas concentrações de levo-2,3-BDO de aproximadamente g.L<sup>-1</sup> 2,5, 3,7 e 5,1, respectivamente. Os autores concluíram que a temperatura e concentração inicial de xilose desempenham papel importante no metabolismo deste açúcar, o acréscimo da temperatura para 39°C no meio contendo 15 g.L<sup>-1</sup> de xilose levou a um salto na produção do álcool de 2 para 6 g.L<sup>-1</sup>.

Todavia, Okonkwo; Ujor & Ezeji (2021) relataram resultados favoráveis em relação a fermentação do hidrolisado de palha de milho por *P. polymyxa* DSM 365, os autores atingiram rendimento de 0,23 utilizando hidrolisado puro suplementado com os mesmos minerais utilizados deste trabalho. Adicionalmente, a fermentação da xilose também foi analisada, foram encontradas concentrações de 2,3-BDO de 29 g.L<sup>-1</sup> e rendimento de 0,31 para concentração inicial de substrato de aproximadamente 100 g.L<sup>-1</sup>. Ambos os experimentos foram realizados em tubos de ensaio de 125 mL contendo 30 mL de meio e os parâmetros de temperatura e agitação empregados foram 35°C e 200 rpm. Isto sinaliza a hipótese de que o metabolismo desta pentose pode ser mais sensível a influência das condições experimentais do que os demais açúcares, desta forma, mais estudos precisam ser realizados no que se refere a seleção destas variáveis para a fermentação de hidrolisados contendo xilose.

#### 4.5 Fermentações em batelada alimentada

Os ensaios em batelada alimentada foram desenhados com o objetivo de reduzir o efeito dos inibidores presentes no hidrolisado explicitados anteriormente. O processo foi iniciado com melação diluída contendo aproximadamente 50 g.L<sup>-1</sup> de substrato e posteriormente o meio foi alimentado com hidrolisado bruto (~20 g.L<sup>-1</sup> de xilose) e suplementado com minerais em 18 horas de fermentação, totalizando 100 mL de meio. As condições experimentais utilizadas foram as determinadas nos experimentos anteriores: 38°C, 260 rpm e 5 g.L<sup>-1</sup> de DAP. A fermentação foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio e 10% de inóculo. As proporções volumétricas para a alimentação (melação: hidrolisado) utilizadas foram: (I) 1:2; (II) 1:1 e (III) 2:1. A Tabela 15 a seguir explica o delineamento desta etapa.

Tabela 15. Delineamento dos experimentos em batelada alimentada

Experimento	C <sub>so</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	Proporção (M:H)	V <sub>melação</sub> (mL)	V <sub>hidrolisado</sub> (mL)
I	50	1:2	30	60
II	50	1:1	45	45
III	50	2:1	60	30

C<sub>so</sub>: Concentração inicial de substrato; Proporção (MH): Proporção volumétrica entre o volume de melação e a alimentação de hidrolisado; V<sub>melação</sub>: Volume inicial de melação; V<sub>hidrolisado</sub>: Volume de alimentação de hidrolisado em 18 horas.

As Figuras 24 e 25 mostram a cinética de fermentação para estes experimentos, a seta mostra o momento em que foi realizado o pulso de alimentação (18H D). Após esta etapa a fermentação não evoluiu, isto é evidenciado pelo fato de que as concentrações após a diluição permaneceram quase que constantes, ou seja, não houve consumo de substrato nem mesmo produção de *levo-2,3-butanodiol*. O experimento com hidrolisado suplementado (dados não mostrados) foi preparado conforme o experimento I e não obteve sucesso após a alimentação.

O experimento com substratos isolados mostrou que era esperado a assimilação de dos componentes do melaço juntamente com a xilose proveniente do hidrolisado, desta maneira, o insucesso das fermentações em batelada alimentada pode ser atribuído a presença dos inibidores do hidrolisado ou a ausência de uma fase de adaptação fermentativa para a xilose. A Tabela 16 mostra a concentração destes em cada ensaio após as diluições. Dado que a maior diluição (Experimento III) não foi suficiente para mitigar o efeito dos inibidores, as concentrações de um ou mais inibidores presentes podem ter sido responsáveis por este efeito, estavam contidas no meio: 0,30 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético, 0,04 g.L<sup>-1</sup> de furfural, 0,05 g.L<sup>-1</sup> de HMF e 0,11 g.L<sup>-1</sup>. Nos estudos de Okonkwo; Ujor & Ezeji (2021) concentrações de 0,0235 g.L<sup>-1</sup> de HMF, 2,546 g.L<sup>-1</sup> de furfural e aproximadamente 4 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético não foram suficientes para inibir a atividade de *P. polymyxa* DSM 365. Além disto, os autores mostraram que o microrganismo é capaz de utilizar o furfural e o HMF como fonte de carbono. Em virtude destas conclusões, este trabalho assumiu a hipótese de que a inibição da fermentação foi ocasionada pela presença dos compostos fenólicos, e a concentração de 0,11 g.L<sup>-1</sup> destes já seria suficiente para este efeito. Todavia, maiores estudos precisam ser realizados em relação aos possíveis componentes do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana de açúcar e seu efeito inibitório no microrganismo *P. polymyxa* DSM 365.

Tabela 16. Concentração dos inibidores após a diluição calculados por balanço de massa

Diluição	V <sub>hidrolisado0</sub> (mL)	Ácido Acético (g.L <sup>-1</sup> )	Furfural (g.L <sup>-1</sup> )	HMF (g.L <sup>-1</sup> )	Compostos fenólicos (g.L <sup>-1</sup> )
Hidrolisado concentrado		3,70	0,50	0,60	1,30
I (1:2)	60	2,22	0,30	0,36	0,78
II (1:1)	45	1,00	0,14	0,16	0,35
III (2:1)	30	0,30	0,04	0,05	0,11

V<sub>hidrolisado0</sub>: Volume de alimentação de hidrolisado em 18horas.

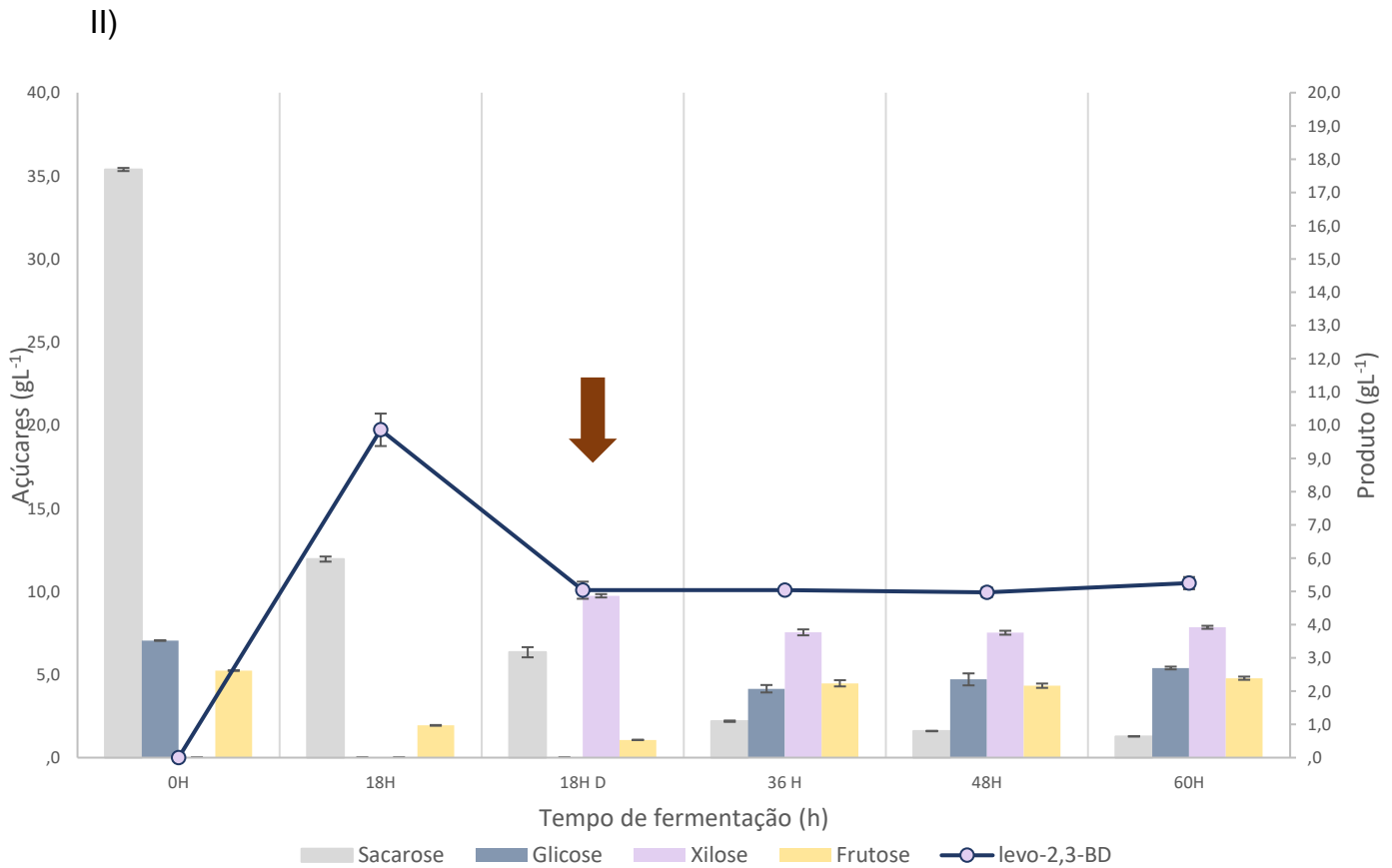
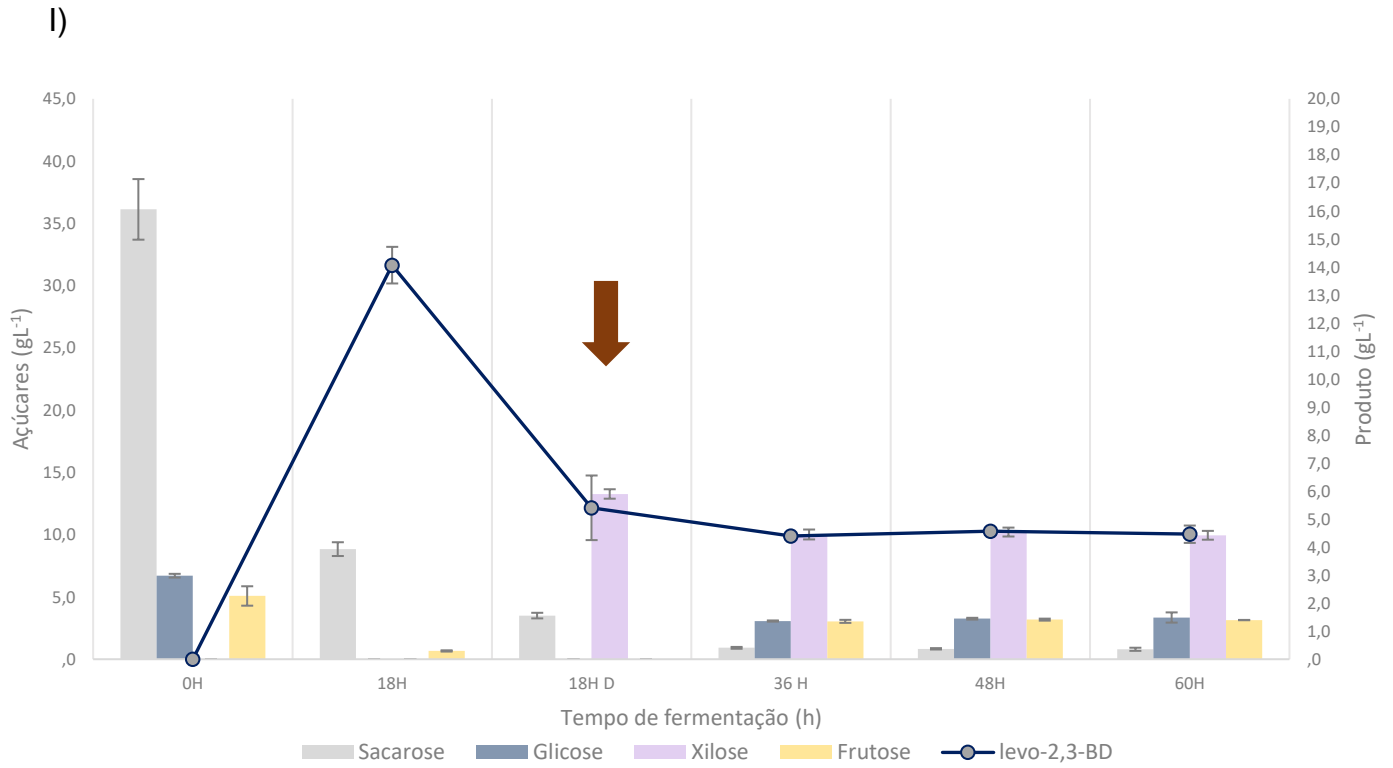


Figura 24. Cinética da fermentação para batelada alimentada. Experimento I (1:2); II (1:1) e III (2:1).

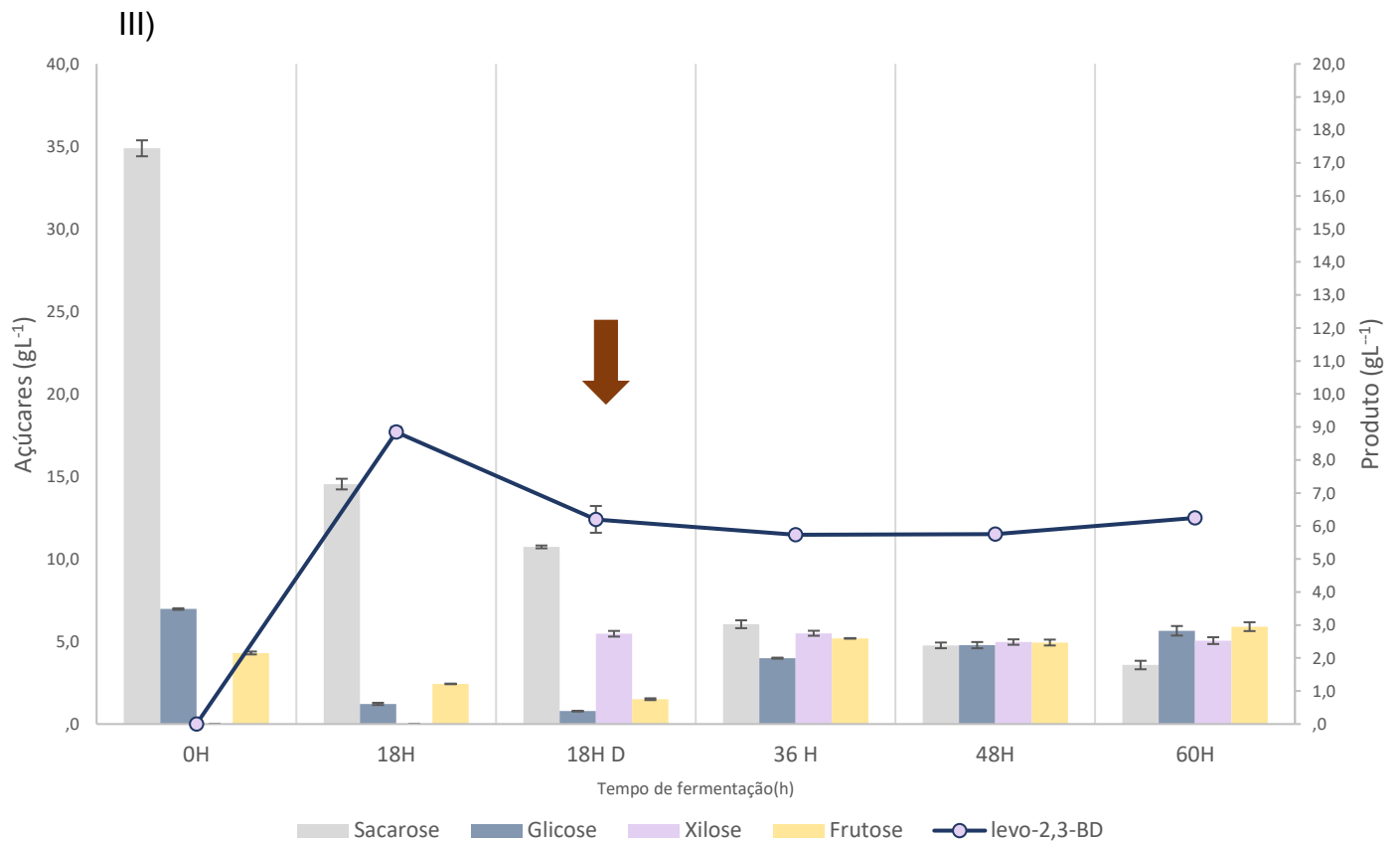


Figura 25 (cont.). Cinética da fermentação para batelada alimentada. Experimento I (1:2); II (1:1) e III (2:1).

Embora os experimentos em batelada alimentada não tenham sido bem sucedidos, conclusões proveitosas podem ser obtidas a respeito do volume inicial de inóculo nos ensaios. Dado que um mesmo volume de inóculo inicial (10 mL) foi utilizado, correspondente a 10% do volume final, a fração inicial de células foi diferente para cada diluição (I-25%; II- 18%; III- 14%). A Tabela 17 mostra os parâmetros cinéticos para 18 horas de fermentação, o teste de Tukey a 95% de confiança foi realizado para fins de comparação entre as situações. A análise mostra que o aumento da porcentagem de inóculo em relação ao volume inicial empregado apresentou efeito significativo na produção de levo-2,3-butanodiol e rendimento, atingindo valores de 14 g.L<sup>-1</sup> e 0,37, respectivamente para o experimento com 25% de inóculo. A alteração de 18% para 14% não apresentou diferença significativa para as respostas anteriores. A redução da concentração de inóculo inicial sugere um decréscimo das respostas do processo, desta

forma visando as operações de batelada alimentada, a maior concentração de inóculo inicial poderia ser empregada para potencializar a fase inicial da fermentação. Além disso, a menor proporção volume meio/ volume do frasco pode ter proporcionado melhores condições de transferência de massa, agitação e aeração gerando melhores respostas de processo.

Tabela 17. Parâmetros cinéticos para o experimento de batelada alimentada até o momento da alimentação.

Experimento	V <sub>melaço0</sub> (mL)	C <sub>so</sub> (g L <sup>-1</sup> )	t(h)	C <sub>BDO18</sub> (g L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub>	Pv (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	C (%)
I	30	47,91±2,95	18	14,06±0,53 <sup>a</sup>	0,37±0,030 <sup>a</sup>	1,76±0,067 <sup>a</sup>	80,07%±0,022 <sup>a</sup>
II	45	47,66±0,13	18	9,86±0,40 <sup>b</sup>	0,29±0,010 <sup>b</sup>	1,23±0,050 <sup>b</sup>	70,87%±0,0037 <sup>b</sup>
III	60	51,68±0,56	18	8,85±0,12 <sup>b</sup>	0,26±0,0026 <sup>b</sup>	1,11±0,015 <sup>b</sup>	64,79%±0,0068 <sup>c</sup>

Médias e desvios seguidos por letras diferentes são estatisticamente diferentes um do outro (Teste de Tukey com 95% de confiança). V<sub>melaço0</sub>: Concentração inicial de melaço; C<sub>so</sub>: Concentração inicial de substrato. C<sub>BDO18</sub>: concentração levo-2,3-BDO obtida em 18 horas de fermentação; Y<sub>P/S</sub>: Rendimento de 2,3-BDO; t: Tempo de fermentação; e Pv: Produtividade volumétrica de 2,3-BDO; C%: Porcentagem de conversão de substrato.



#### 4.6 Sugestões para trabalhos futuros

Este trabalho buscou o emprego do hidrolisado hemicelulósico bruto em batelada alimentada iniciada com melaço, dado que esta não evoluiu após a alimentação, trabalhos futuros poderiam ser realizados em relação a avaliação e otimização das concentrações de inibidores e fração de diluição, visando a combinação da proporção melaço/hidrolisado. As vias de metabolismo de xilose e produção de exopolissacarídeos por *P. polymyxa* também devem ser objetos de atenção em próximos estudos. Adicionalmente, mais trabalhos podem ser conduzidos em busca de um modelo empírico que incorpore uma faixa maior para os parâmetros estudados considerando os parâmetros de fermentação e fenômenos de transporte envolvidos no processo, dado que o microrganismo se mostrou sensível a estas variações.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES

O desenvolvimento do presente estudo possibilitou a análise da produção do isômero levogiro de 2,3-butanodiol a partir de melaço e hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana de açúcar. Os parâmetros temperatura e agitação apresentaram importância em todas as respostas analisadas do processo, enquanto a suplementação de DAP impactou apenas a conversão de açúcares. A viscosidade do meio foi visivelmente comprometida em temperaturas menores ou iguais 32 °C. O acréscimo simultâneo da agitação e temperatura foi positivo para a produção de 2,3-butanodiol e não foi possível perceber alterações na viscosidade nas bateladas conduzidas em temperaturas de 38 °C e rotação de 260 rpm. O melaço se mostrou um substrato em potencial, uma vez que resultados de rendimento e concentração do álcool próximos foram obtidos em comparação a um meio sintético rico em minerais descrito pela literatura, a produção de 2,3-BDO chegou a 14 g.L<sup>-1</sup> no meio sintético e 13 g.L<sup>-1</sup> no melaço, os rendimentos para ambos foram cerca de 0,26. A conversão de açúcares foi cerca de 10% maior no meio sintético, este apresentou 94% versus 84% para o melaço. A fermentação não obteve sucesso para o meio composto por hidrolisado bruto e destoxificado, provavelmente devido a presença de inibidores provenientes do pré-tratamento, desta forma, maiores estudos ainda precisam ser realizados acerca dos potenciais inibidores para este processo.

As fermentações em batelada alimentada foram conduzidas com o objetivo de viabilizar a fermentação do hidrolisado pela diluição dos inibidores. A fermentação não prosseguiu após a alimentação com hidrolisado independente da proporção de diluição utilizada. À vista disso, mais estudos precisam ser feitos em relação ao efeito destes inibidores e as proporções de diluição. Apesar deste resultado, o estudo demonstrou o potencial do melaço como substrato abundante e de baixo custo para a produção de 2,3-butanodiol no Brasil.

## REFERÊNCIAS

ALCARDE, A.R. **Processamento da cana-de-açúcar**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, Brasília, 2007. ALCARDE, A. **Cana de açúcar**.

ARRUDA, P. V. et al. Efeito da destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana sobre a remoção de fenóis, a perda de açúcares e a bioconversão de xilose em xilitol. **Nucleus**, v. 5, n. 1, p. 166–182, 2008.

BARBOSA, A. M. et al. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos Production and Applications of Fungal Exopolysaccharides. **Ciencias exatas e tecnologicas**, v. 25, n. 1, p. 29–41, 2004.

BARRETT, E. L. et al. Production of 2,3-Butylene Glycol from Whey by *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 12, p. 2507–2514, 1983.

BERBERT-MOLINA, A.; SATO, S.; SILVEIRA, M. M. Ammonium Phosphate as a Sole Nutritional Supplement for the Fermentative Production of 2,3-Butanediol from Sugar Cane Juice. **Production**, p. 40–40, 2001.

BIAŁKOWSKA, A. M. et al. Application of enzymatic apple pomace hydrolysate to production of 2,3-butanediol by alkaliphilic *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 12, p. 1609–1621, 2015.

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

BIAŁKOWSKA, A. M. et al. Effects of genetic modifications and fermentation conditions on 2,3-butanediol production by alkaliphilic *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2663–2676, 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.

BLOMQUIST, K. et al. Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 5, p. 1392–1404, 1993.

CANILHA, L. et al. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1–8, p. 84–92, 2010.

CELI, E.; GRAJEK, W. Biotechnological production of 2,3-butanediol — Current state and prospects. v. 27, p. 715–725, 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.

CHENG, 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.

CHENG, K. K. et al. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 105–109, 2008.

CHO, S. et al. High production of 2,3-butanediol from biodiesel-derived crude glycerol by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* M1. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2015.

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.

DAI, J. Y. et al. Enhanced Production of 2,3-Butanediol from Sugarcane Molasses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 6, p. 3014–3024, 2015.

DE CARVALHO, W. et al. Detoxification of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate with ion-exchange resins for xylitol production by calcium alginate-entrapped cells. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, n. 8, p. 863–868, 2004.

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.

ESENER, A. A.; ROELS, J. A.; KOSSEN, N. W. F. The influence of temperature on the energetics of *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25,

n. 8, p. 293–2098, 1983.

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.

GARCIA, A. D. Produção fermentativa de 2,3-butanodiol a partir de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. **Tese de doutorado**, 2006.

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

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GRÄFJE, H. , KÖRNIG, W. , WEITZ, H. , REISS, W. , STEFFAN, G. , DIEHL, H. , BOSCHE, H. , SCHNEIDER, K. AND KIECZKA, H. Butanediols, Butenediol, and Butynediol. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 2000.

GRZENIA, D. L.; SCHELL, D. J.; RANIL WICKRAMASINGHE, S. Membrane extraction for detoxification of biomass hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 248–254, 2012.

GUO, X. et al. Comparison of methods for detoxification of spruce hydrolysate for bacterial cellulose production. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2013.

GUPTA, R. et al. **Study of charcoal detoxification of acid hydrolysate from corncob and its fermentation to xylitol**. [s.l.] Elsevier B.V., 2017. v. 5

HAGHIGHI MOOD, S. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

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

HE, Z. et al. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 168–178, 2007.

HUMPHREY, A. Shake flask to fermentor: What have we learned? **Biotechnology Progress**, v. 14, n. 1, p. 3–7, 1998.

ICIS. **Rubber industry seeks bio-based chemicals potential**.

JANSEN, N.; FLICKINGER, M. C.; TSAO, G. T. Production of 2,3-Butanediol from D-Xylose by. **Biotechnology and bioengineering**, v. 26, p. 362–369, 1984.

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

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

JONSSON, L. J. et al. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 691–697, 1998.

JUNG, M. Y. et al. Engineered *Enterobacter aerogenes* for efficient utilization of sugarcane molasses in 2,3-butanediol production. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 21–27, 2013.

KO, M. et al. 2, 3-Butanediol Production by Acetogenic Bacteria, an Alternative Route to Chemical Synthesis, Using Industrial Waste Gas. **Biotechnology Letters**, v. 77, n. 15, p. 5467–5475, 2011.

KOUTINAS, A. A. et al. Techno-economic evaluation of a complete bioprocess for 2,3-butanediol production from renewable resources. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 55–64, 2016.

LAL, S.; TABACCHIONI, S. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 2–10, 2009.

LAUBE, V. M.; D. GROLEAU; MARTIN, S. M. 2,3-Butanediol production from xylose and other hemicellulosic components by *Bacillus polymyxa*. **Biotechnology Letters**, v. 6, n. 4, p. 576, 1984.

LEE, H. K.; MADDOX, I. S. MICROBIAL PRODUCTION OF 2,3-BUTANEDIOL FROM WHEY PERMEATE. **Biotechnology Letters**, v. 6, n. 12, p. 815–818, 1984.

LEE, I. Y. et al. Optimization of fermentation conditions for production of

exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*. **Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 2, p. 71–75, 1997.

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, 2010.

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, 2014a.

LI, L. et al. Efficient simultaneous saccharification and fermentation of inulin to 2,3-butanediol by thermophilic *Bacillus licheniformis* ATCC 14580. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 20, p. 6458–6464, 2014b.

LI, L. et al. Metabolic engineering of *Enterobacter cloacae* for high-yield production of enantiopure (2R,3R)-2,3-butanediol from lignocellulose-derived sugars. **Metabolic Engineering**, v. 28, p. 19–27, 2015.

LIU, J. et al. **Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3** **Carbohydrate Polymers**, 2010.

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.

MAGEE, R.; KOSARIC, N. The microbial production of 2, 3-butanediol. **Advances in Applied Microbiology**, v. 32, p. 89–161, 1987.

MARTÍN, C. et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose--utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microbiol Technol**, v. 31, p. 274–282, 2012.

MARTINEZ, A. et al. Effects of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  treatments ('overliming') on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 5, p. 526–536, 2000.

MARWOTO, B. et al. Enhancement of (RR)-2,3-butanediol production from xylose by *Paenibacillus polymyxa* at elevated temperatures. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 2, p. 109–114, 2002.

MAZUMDAR, S.; LEE, J.; OH, M. Microbial production of 2, 3 butanediol from

seaweed hydrolysate using metabolically engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 329–336, 2013.

MEIRELLES, L. B.; SILVA, S. C. .; RAJAGOPAL, K. **Caracterização da nafta petroquímica para a produção de aromáticos**. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **Anais...** Florianópolis- SC: 2014

MELAÇOS BRASILEIROS. **Especificações Técnicas**. Disponível em: <<https://melacos.com.br/especificacoes-tecnicas>>. Acesso em: 20 ago. 2001.

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

MOHAGHEGHI, A.; RUTH, M.; SCHELL, D. J. Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1806–1811, 2006.

MONAVARI, S.; GALBE, M.; ZACCHI, G. The influence of solid/liquid separation techniques on the sugar yield in two-step dilute acid hydrolysis of softwood followed by enzymatic hydrolysis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, p. 1–9, 2009.

MOTIWANI, M. et al. MICROBIAL PRODUCTION OF 2,3-BUTANEDIOL FROM WATER HYACINTH. **Bioresource Technology**, v. 44, p. 187–195, 1993.

NAKASHIMADA, Y. et al. Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*. **Australasian Plant Pathology**, v. 1, n. 2, p. 293, 2000.

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.

NASIDI, M. et al. Improved production of ethanol using bagasse from different sorghum cultivars. **Biomass and Bioenergy**, v. 72, p. 288–299, 2015.

NEWES, E. **Bioproducts Transition System Dynamics**.

NOVA CANA. **Disponibilidade de bagaço e palha para os processos de hidrólise**. Disponível em: <<https://www.novacana.com/estudos/disponibilidade-bagaco-palha-para-processos-hidrolise-241013>>.

OKONKWO, C. et al. Process Development for Enhanced 2,3-Butanediol



Production by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. **Fermentation**, v. 3, n. 2, p. 18, 2017.

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.

OKONKWO, C.; UJOR, V.; EZEJI, T. Production of 2, 3-Butanediol from non-detoxified wheat straw hydrolysate: Impact of microbial inhibitors on *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. **Industrial Crops & Products**, v. 159, n. November 2020, 2021.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 17–24, 2000.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresour Technol**, v. 74, p. 25–33, 2000.

PATURAU, J. **By-products of the cane sugar industry. An introduction to their industrial utilization**. [s.l.] Elsevier Science Publishers BV, 1989.

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.

QURESHI, N. et al. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I - Use of barley straw hydrolysate. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 4, p. 559–565, 2010.

QURESHI, N. et al. High solid fed-batch butanol fermentation with simultaneous product recovery: Part II—process integration. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 4, p. 967–972, 2018.

RAMACHANDRAN, K. B.; HASHIM, M. A.; FERNANDEZ, A. A. Kinetic study of 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 70, n. 4, p. 235–240, 1990.

ROBERTSON, N. C.; MITCHELL, R. L. United states patent office 2,689,253. p. 6–9, 1954.

RODRIGUES, R. C. L. B. C. L. B. et al. THE INFLUENCE OF pH , TEMPERATURE AND HYDROLYZATE CONCENTRATION ON THE REMOVAL OF

VOLATILE AND NONVOLATILE COMPOUNDS FROM SUGARCANE BAGASSE ACTIVATED CHARCOAL BEFORE OR AFTER VACUUM EVAPORATION. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 3, p. 1–15, 2001.

RÜTERING, M. et al. **Controlled production of polysaccharides-exploiting nutrient supply for levan and heteropolysaccharide formation in Paenibacillus sp.** **Carbohydrate Polymers**, 2016.

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

SCHILLING, C. et al. Engineering of the 2,3-butanediol pathway of *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. **Metabolic Engineering**, v. 61, n. July, p. 381–388, 2020.

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

SIKORA, B. et al. Application of byproducts from food processing for production of 2,3-butanediol using *Bacillus amyloliquefaciens* TUL 308. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 6, p. 610–619, 2016.

SINGH, A.; MISHRA, P. Microbial Production of 2,3-Butanediol. In: **Progress in Industrial Microbiology**. [s.l.: s.n.]. v. 33p. 221–247.

SOLTYS, K. A.; BATTI, A. K.; KONERU, B. Successful nonfreezing, subzero preservation of rat liver with 2,3-butanediol and type I antifreeze protein. **Journal of Surgical Research**, v. 96, n. 1, p. 30–34, 2001.

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, 2009.

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

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. In: **Comprehensive Biotechnology : The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine**. [s.l: s.n.]. p. 933–947.

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.

WANG, A. et al. Efficient 2,3-Butanediol production from Cassava powder by a crop-biomass-utilizer, enterobacter cloacae subsp. dissolvens SDM. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. 1–8, 2012.

WANG, N.; HONG-ZHANG, C. Microbial 2,3-Butanediol Production by Paenibacillus polymyxa Using Hemicelluloses Sugars from Steam Exploded Corn Stover. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 8, p. 308–316, 2014.

XIE, N. Z. et al. Genome sequence of type strain Paenibacillus polymyxa DSM 365, a highly efficient producer of optically active (R,R)-2,3-butanediol. **Journal of Biotechnology**, v. 195, p. 72–73, 2015.

YAN, Y.; LEE, C.; LIAO, J. C. Enantioselective synthesis of pure (R,R)-2,3-butanediol in Escherichia coli with stereospecific secondary alcohol dehydrogenases. p. 3914–3917, 2009.

YANG, T. et al. Enhanced 2,3-butanediol production from biodiesel-derived glycerol by engineering of cofactor regeneration and manipulating carbon flux in Bacillus amyloliquefaciens. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2015.

ZHAO, X.; SONG, Y.; LIU, D. Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of alkali/peracetic acid-pretreated sugarcane bagasse for ethanol and 2,3-butanediol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 4, p. 413–419, 2011.