125-111
BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentação

AVALIAÇÃO DE CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR
PARA OBTENÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL

Marília Amorim Berbert de Molina

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Prof. Assoc. Sunao Sato

São Paulo
1995

14852

USP-CQ

MONOGRAFIAS

14852-F

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Berbert de Molina, Marília Amorim

B484a Avaliação de caldo de cana-de-açúcar para obtenção de 2,3-butanodiol / Marília Amorim Berbert de Molina. --São Paulo, 1995.
1v (várias paginações).

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Far-
macêutica.

Orientador: Sato, Sunao

1. Fermentação : Tecnologia química 2. Engenharia bioquímica
3. Microbiologia industrial I. T. II. Sato, Sunao, orientador.

660.28449 CDD

Marília Amorim Berbert de Molina

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Título da Dissertação:

"Avaliação de caldo de cana-de-açúcar para obtenção de 2,3-butanodiol"

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreolli Pinto

Presidente e Orientador

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

1º Examinador

Profa. Assoc. Sunao Sato

2º Examinador

São Paulo, 29 de Setembro de 1995

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sunao Sato, pela orientação, estímulo e amizade em todos os momentos.

Aos Diretores do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico pela oportunidade de realização deste trabalho e pelo indispensável apoio.

Ao Dr. Mauricio Moura da Silveira, pelos ensinamentos, incentivo constante e imprescindível contribuição à minha formação profissional.

A Arnaldo Márcio Ramalho Prata, pela sua amizade e inestimável colaboração.

A Daniel Clebsch, Adriane Cury Schmid e Emerson Sabino, pela colaboração na execução dos experimentos.

A Fátima Jonas, Gilmar Erzinger, Jorge López e Paulo Ivo Koehntopp, pelo auxílio nas análises cromatográficas.

A Patrick Gurgel, um grande amigo, pelas sugestões e pelos momentos de agradável convivência.

Aos amigos Elisabeth Wisbeck, Andréa Schneider e Marcelo Bertasso, pelo estímulo e apoio, sempre.

A Inês Roberto e Adalberto Pessoa Jr. pelo companheirismo e agradáveis horas de estudo.

Ao Dr. Jörg Saar, pelas sugestões e auxílio na etapa final do trabalho.

A Sérgio e Marion pelo imenso carinho, fundamental apoio em todos os momentos e especial amizade.

Aos colegas do CDB e da FCF que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao Manolo, Bernardo e Gabriel

A meus pais, Pedro e Zélia

A parte experimental deste trabalho foi realizada nos laboratórios do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico (CDB), em Joinville, SC.

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a possibilidade do emprego de caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) como matéria-prima para obtenção de 2,3-butanodiol por fermentação, utilizando a bactéria *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199. A pesquisa compreendeu o teste de diferentes nutrientes para a composição de um meio de fermentação eficiente com o caldo de cana e experimentos em que a influência da concentração inicial de sacarose (S_0) sobre o processo em regime descontínuo foi estudada.

Ensaio realizados em frascos agitados, com S_0 entre 140 e 150 g/L, mostraram que a fermentação de caldo de cana clarificado não suplementado com nutrientes não é viável. Por outro lado, a adição de 5,0 a 10,0 g/L de fosfato de amônio ao caldo levou a concentrações finais de 2,3-butanodiol de até 64 g/L e rendimentos, em relação ao máximo teórico, da ordem de 81 % em cerca de 38 horas. Estes resultados se aproximam daqueles alcançados na fermentação do caldo enriquecido com vários nutrientes, usado como referência, na qual foram produzidos 66,7 g/L de diol com um rendimento de 85,6%. A utilização de concentrações de fosfato de amônio de até 4,0 g/L resultou em fermentações incompletas.

A cinética da fermentação foi estudada com o caldo diluído a, aproximadamente, 180 g/L de sacarose e suplementado com 8,0 g/L de fosfato de amônio e, também, com o meio rico, em regime descontínuo em fermentador de bancada. Foram obtidos, nestes ensaios, concentrações de butanodiol de 71,7 e 71,1 g/L, rendimentos de 78,0 e 74,1 %, produtividades de 2,1 e 2,0 g/Lh e tempos de fermentação de 34,5 e 35,7 horas, respectivamente. A principal diferença foi observada na concentração de biomassa que atingiu 9,1 g/L, no meio com fosfato, e 11,8 g/L no meio rico. As máximas velocidades específicas de crescimento ($\mu_{x,m}$), 0,61 e 0,45 h⁻¹, observadas com oxigênio dissolvido acima de zero, indicam que o crescimento celular, no meio rico, foi inibido pela alta concentração de nutrientes. Na sequência das fermentações, com concentrações nulas de oxigênio dissolvido, a produção de diol foi iniciada e as máximas velocidades específicas de formação de produto ($\mu_{p,m}$), 0,53 h⁻¹ com fosfato de amônio e 0,45 h⁻¹ com o meio rico,

foram atingidas, sugerindo que altas concentrações de nutrientes afetam, também, a formação de produto. Nos dois ensaios foi observada a ocorrência de uma fase estacionária de crescimento que, no caso do meio contendo fosfato de amônio, teve uma duração 12 horas mais longa devido a um insuficiente suprimento de oxigênio ou do esgotamento de algum nutriente. Neste ponto, foi verificada uma queda das velocidades específicas de formação de produto (μ_p).

Com o caldo diluído a cerca de 20 g/L de sacarose e 8,0 g/L de fosfato de amônio, a fermentação transcorreu em um tempo muito longo (23,5 horas) para a baixa concentração de sacarose empregada. Com S_0 semelhante e o meio rico, o tempo de processo foi de apenas 6,5 h, o que demonstra que, no primeiro caso, ocorreu uma diluição excessiva dos nutrientes naturalmente presentes no caldo.

O estudo do efeito da concentração inicial de sacarose sobre a fermentação, conduzido em fermentador de bancada e com o meio rico em nutrientes, mostrou que este parâmetro influencia fortemente o crescimento celular e a produção de 2,3-butanodiol. O aumento de S_0 levou a valores decrescentes dos fatores de conversão de substrato em células, enquanto os rendimentos em diol aumentaram com S_0 até 152 g/L. Valores crescentes de S_0 provocaram uma inibição do crescimento celular, evidenciada pela diminuição de $\mu_{x,m}$ de 0,91 a 0,45 h⁻¹, com S_0 entre 24 e 181 g/L. Valores aproximadamente constantes de $\mu_{p,m}$ (0,62 a 0,68 h⁻¹) foram observados com S_0 até 152 g/L, enquanto uma queda acentuada foi verificada com $S_0=181$ g/L ($\mu_{p,m}=0,45$ h⁻¹). As máximas produtividades (3,2 g/Lh) foram obtidas com valores de S_0 de 105 e 152 g/L.

Os dados gerados neste trabalho permitem concluir que caldo de cana-de-açúcar é uma matéria-prima adequada para a produção de 2,3-butanodiol por *Klebsiella pneumoniae*.

ABSTRACT

The use of sugar cane (*Saccharum officinarum*) juice, as raw material for the fermentative production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199, was evaluated in this work. The research was focused on testing different nutrients to formulate an efficient fermentation medium with the juice and some experiments to study the effect of the initial sucrose concentration (S_0) on the batch process.

Shaker flasks experiments with S_0 between 140 and 150 g/L have shown that the fermentation of sugar cane juice without added nutrients is not viable. On the other hand, the addition of 5.0 to 10.0 g/L ammonium phosphate to the juice led, after 38 hours, to final 2,3-butanediol concentrations of 64 g/L, with yields of 81% of the theoretical maximum. These results are similar to those found in the fermentation of a reference medium composed of juice enriched with several nutrients in which 66.7 g/L butanediol and a yield of 85.6% were obtained. Ammonium phosphate concentrations up to 4.0 g/L resulted in incomplete fermentations.

The fermentation kinetics was studied in a laboratory scale fermentor, with the sugar cane juice diluted to ca. 180 g/L sucrose. Both ammonium phosphate (8.0 g/L) and reference media were tested. In these experiments, after process times close to 35 hours, butanediol concentrations of 71.7 and 71.1 g/L, yields of 78.0 and 74.1%, and productivities of 2.1 and 2.0 g/Lh, respectively, were obtained. The most important difference was the final biomass concentration that reached 9.1 g/L with the ammonium phosphate medium and 11.8 g/L with the rich medium. The maximum specific growth rates ($\mu_{x,m}=0.61$ and 0.45 h^{-1}), measured with dissolved oxygen concentrations above zero, have indicated that cell growth in the rich medium was inhibited by high nutrient concentration. In the sequence, when the oxygen concentration was zero, butanediol production started and maximum specific production rates ($\mu_{p,m}$) of 0.53 h^{-1} with the ammonium phosphate medium and 0.45 h^{-1} with the rich medium were reached. These values suggest that nutrient concentration in the rich medium also affects product formation. In both runs, a stationary growth phase was noticed. In the experiment with the

ammonium phosphate medium, the stationary phase was 12 hours longer due to the insufficient oxygen supply rate or the shortage of some nutrient. At that moment, decreasing specific product formation rates (μ_p) were observed.

With the sugar cane juice diluted to approximately 20 g/L and 8.0 g/L ammonium phosphate, fermentation time was 23.5 hours, too long to such sucrose concentration. With similar S_0 and the rich medium, fermentation time was reduced to 6.5 hours. That shows that, in the first case, natural nutrients of the juice were excessively diluted.

The study on the effect of the initial sucrose concentration on the process, performed in a laboratory fermentor with the rich medium, has shown that this parameter strongly affects both cell growth and 2,3-butanediol production. Increasing S_0 led to decreasing cell yields and, for S_0 up to 152 g/L, diol yields increased. Cell growth inhibition was stronger as higher sucrose concentrations were used. This is evidenced by the values of $\mu_{x,m}$ that decreased from 0.91 to 0.45 h⁻¹ as S_0 was augmented from 24 to 181 g/L. Approximately constant $\mu_{p,m}$ (0.62 to 0.68 h⁻¹) were observed with S_0 up to 152 g/L. With $S_0=181$ g/L, $\mu_{p,m}$ is reduced to 0.45 h⁻¹. The maximum productivities (3.2 g/Lh) were obtained with S_0 between 105 and 152 g/L.

From the results of this work, one can conclude that sugar cane juice is a suitable raw material for the production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*.

ÍNDICE

NOMENCLATURA	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	ix
I INTRODUÇÃO	1
II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
II.1 2,3-Butanodiol: características e aplicações	3
II.2 Microrganismos Produtores	6
II.3 Mecanismo Bioquímico	8
II.4 Fatores que Afetam o Processo Fermentativo	13
II.4.1 Temperatura	13
II.4.2 pH	14
II.4.3 Concentração inicial de substrato	15
II.4.4 Suprimento de oxigênio	18
II.4.5 Concentração de 2,3-butanodiol	21
II.4.6 Meios de cultivo	22
II.4.7 Tratamentos do caldo de cana-de-açúcar	24
II.5 Formas de Condução do Processo Fermentativo	25
II.6 Recuperação do Produto	28
III OBJETIVOS	30
IV MATERIAL E MÉTODOS	31

IV.1 Matéria-Prima	31
IV.1.1 Obtenção	31
IV.1.2 Tratamentos	31
IV.2 Microrganismo	32
IV.2.1 Manutenção da Cultura	34
IV.3 Meios de Cultivo	34
IV.3.1 Gelose simples	34
IV.3.2 Meios a base de caldo de cana-de-açúcar	34
IV.4 Ensaios Realizados: condições de operação e preparo de inóculos	37
IV.4.1 Ensaios em Frascos Agitados	37
IV.4.2 Ensaios em Fermentador	37
IV.5 Métodos Analíticos	40
IV.5.1 Coleta e preparo de amostras	40
IV.5.2 Concentração celular	40
IV.5.3 Concentração de sacarose	42
IV.5.4 Concentração de produtos da fermentação	43
IV.5.5 Concentração de oxigênio dissolvido	45
IV.6 Metodologia Utilizada nos Cálculos	46
IV.6.1 Fatores de conversão, rendimentos e produtividades	46
IV.6.2 Velocidades específicas	47
IV.6.3 Concentração de oxigênio na saturação	48
IV.6.4 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	49
V RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
V.1 Tratamento do Caldo de Cana-de-Açúcar	51
V.2 Definição da Composição do Meio de Fermentação	56

V.2.1 Avaliação de diferentes formulações de meio a base de caldo de cana-de açúcar	56
V.2.2 Concentração de fosfato de amônio a ser empregada na formulação do meio de cultivo	65
V.3 Estudo Cinético da Fermentação de Caldo de Cana-de-Açúcar	81
V.4 Efeito da Concentração Inicial de Sacarose sobre a Cinética da Fermentação	93
VI CONCLUSÕES	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
Apêndice A - Curvas de calibração	
Apêndice B - Exemplo de cálculo da concentração de oxigênio na saturação	
Apêndice C - Tabelas com resultados experimentais e velocidades específicas	

NOMENCLATURA

A_a - atividade de água

C_i - concentração do íon (mol/L)

C_j - concentração de uma substância não-eletrolítica (g/L)

C_* - concentração de oxigênio na saturação no meio (mmol/L)

$C_{0,s}$ - concentração de oxigênio na saturação em água (mmol/L)

dX/dt - velocidade de crescimento celular (g/Lh)

dS/dt - velocidade de consumo de substrato (g/Lh)

dP/dt - velocidade de formação de produto (g/Lh)

dC/dt - variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo (mmol/Lh)

H_i - "salting-out" de um íon (L/mol)

I_i - força iônica do íon (mol/L)

K_j - parâmetro que determina a influência de substâncias não-eletrolíticas sobre a solubilidade do oxigênio em líquidos (L/g)

K_{La} - coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1})

m_o - coeficiente de manutenção para o oxigênio (mmol O_2 /g cél.h)

nm - nanômetro

n - número de unidades de um íon em uma substância

P - concentração de produto (soma das concentrações de 2,3-butanodiol e acetoína) (g/L)

P_f - concentração final de produto (soma das concentrações finais de 2,3-butanodiol e acetoína) (g/L)

P_0 - concentração inicial de produtos (soma das concentrações de 2,3-butanodiol e acetoína) (g/L)

p - produtividade (g/Lh)

Q_{O_2} - velocidade específica de respiração (mmol O_2 /g cél.h)

R - rendimento da fermentação (%)

S - concentração de sacarose (g/L)

S_f - concentração final de sacarose (g/L)

S_0 - concentração inicial de sacarose (g/L)

t - tempo (h)

vvm - volume de ar por volume de meio por minuto

X - concentração celular (g/L)

X_f - concentração final de células (g/L)

X_0 - concentração inicial de células (g/L)

$Y_{p/s}$ - fator de conversão de substrato em produto

$Y_{x/s}$ - fator de conversão de substrato em células

z_i - carga do íon

α, β - percentagens da concentração de saturação em oxigênio no meio

ΔX - diferença entre a concentração final e inicial de células

ΔS - diferença entre a concentração final e inicial de substrato

ΔP - diferença entre a concentração final e inicial de produto

μ_x - velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

$\mu_{x,m}$ - máxima velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

μ_s - velocidade específica de consumo de substrato (h^{-1})

μ_p - velocidade específica de formação de produto (h^{-1})

$\mu_{p,m}$ - máxima velocidade específica de formação de produto (h^{-1})

LISTA DE FIGURAS

Figura II.1.1 - Estereoisômeros de 2,3-butanodiol	3
Figura II.3.1 - Vias metabólicas de formação dos produtos da fermentação de carboidratos por <i>Klebsiella pneumoniae</i> ^{35,57}	10
Figura II.3.2 - Modelos propostos para explicar o mecanismo de formação dos estereoisômeros de 2,3-butanodiol por <i>K. pneumoniae</i> . (A) VOLOCH <i>et alii</i> ¹⁸ (B) UI <i>et alii</i> ¹⁹ .	12
Figura V.1.1 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol [B], em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M1). Ensaio S1 (agitação recíproca a 120 min ⁻¹).	55
Figura V.2.1.1 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol [B], em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M1). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min ⁻¹).	60
Figura V.2.1.2 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar não suplementado com nutrientes (meio M2). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min ⁻¹).	61
Figura V.2.1.3 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol [B], em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M3). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min ⁻¹).	62
Figura V.2.1.4 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol [B], em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M4). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min ⁻¹).	63

- Figura V.2.1.5 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol [B], em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M5). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min^{-1}). 64
- Figura V.2.2.1 - Consumo de sacarose na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com diferentes concentrações de fosfato de amônio (meios M5 a M14). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min^{-1}). 65
- Figura V.2.2.2 - Fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e em produto ($Y_{P/S}$) obtidos na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com diferentes concentrações de fosfato de amônio (meios M5 a M14). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min^{-1}). 67
- Figura V.2.2.3 - Produtividades alcançadas na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com diferentes concentrações de fosfato de amônio (meios M5 a M14). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min^{-1}). 69
- Figura V.2.2.4 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 1,0 g/L de fosfato de amônio (meio M6). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min^{-1}). 71
- Figura V.2.2.5 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 2,0 g/L de fosfato de amônio (meio M7). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min^{-1}). 72
- Figura V.2.2.6 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 2,5 g/L de fosfato de amônio (meio M8). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min^{-1}). 73

Figura V.2.2.7 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 3,0 g/L de fosfato de amônio (meio M9). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

74

Figura V.2.2.8 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 3,5 g/L de fosfato de amônio (meio M10). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

75

Figura V.2.2.9 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 4,0 g/L de fosfato de amônio (meio M11). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

76

Figura V.2.2.10 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 5,0 g/L de fosfato de amônio (meio M12). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

77

Figura V.2.2.11 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 6,0 g/L de fosfato de amônio (meio M5). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

78

Figura V.2.2.12 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 8,0 g/L de fosfato de amônio (meio M13). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

79

Figura V.2.2.13 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 10,0 g/L de fosfato de amônio (meio M14). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹). 80

Figura V.3.1 - Logaritmo neperiano das concentrações celulares em função do tempo, nas primeiras 5 horas de fermentação do Ensaio F5 (meio M1; S₀=181,0 g/L; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 83

Figura V.3.2 - Fatores de conversão de substrato em células (Y_{X/S}) e em produto (Y_{P/S}) em função do tempo. Ensaio F5 (meio M1; S₀=181,0 g/L; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 84

Figura V.3.3 - Velocidade específica de formação de produto (μ_p) em função da velocidade específica de crescimento (μ_x). Ensaio F5 (meio M1; S₀=181,0 g/L; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 85

Figura V.3.4 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A], 2,3-butanodiol (P) [B] e oxigênio dissolvido (C) [B] em função do tempo. Ensaio F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 89

Figura V.3.5 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) [A] e formação de produto (μ_p) [B] em função do tempo. Ensaio F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 90

Figura V.3.6 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A], 2,3-butanodiol (P) [B] e oxigênio dissolvido (C) [B] em função do tempo. Ensaio P1 (meio M13; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 91

Figura V.3.7 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) [A] e formação de produto (μ_p) [B] em função do tempo. Ensaio P1 (meio M13; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 92

- Figura V.4.1 - Fatores de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) e em produto ($Y_{p/s}$) em função da concentração inicial de sacarose (S_0). Ensaios F1 a F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 97
- Figura V.4.2 - Máximas velocidades específicas de crescimento (μ_x) e de formação de produto (μ_p) em função da concentração inicial de sacarose (S_0). Ensaios F1 a F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 98
- Figura V.4.3 - produtividade em função da concentração inicial de sacarose (S_0). Ensaios F1 a F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 99
- Figura V.4.4 - Tempo de fermentação em função da concentração inicial de sacarose (S_0). Ensaios F1 a F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 100
- Figura V.4.5 - Concentrações de sacarose (S) e células (X) em função do tempo. Ensaio P2 (meio M13; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 102
- Figura V.4.6 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x) e consumo de sacarose (μ_s) em função do tempo. Ensaio P2 (meio M13; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 102
- Figura V.4.7 - Concentrações de sacarose (S) e células (X) em função do tempo. Ensaio P3 (meio M13; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 103
- Figura V.4.8 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A], 2,3-butanodiol (P) e oxigênio dissolvido (C) [B] em função do tempo. Ensaio F1 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 104

- Figura V.4.9 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) [A] e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) [B] em função do tempo. Ensaio F1 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 105
- Figura V.4.10 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A], 2,3-butanodiol (P) e oxigênio dissolvido (C) [B] em função do tempo. Ensaio F2 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 106
- Figura V.4.11 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) [A] e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) [B] em função do tempo. Ensaio F2 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 107
- Figura V.4.12 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A], 2,3-butanodiol (P) e oxigênio dissolvido (C) [B] em função do tempo. Ensaio F3 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 108
- Figura V.4.13 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) [A] e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) [B] em função do tempo. Ensaio F3 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 109
- Figura V.4.14 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A], 2,3-butanodiol (P) e oxigênio dissolvido (C) [B] em função do tempo. Ensaio F4 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 110
- Figura V.4.15 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) [A] e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) [B] em função do tempo. Ensaio F4 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). 111

LISTA DE TABELAS

Tabela II.1.1 - Propriedades físicas dos estereoisômeros de 2,3-butanodiol.	4
Tabela II.5.1 - Alguns resultados descritos na literatura para a fermentação butileno-glicólica por <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	27
Tabela IV.3.2.1 - Concentração de sais nos diferentes meios a base de caldo de cana-de-açúcar.	36
Tabela V.1.1 - Resultados obtidos nos diferentes tratamentos para clarificação do caldo de cana-de-açúcar.	52
Tabela V.1.2 - Resultados gerais da fermentação de caldo de cana-de-açúcar submetido ao tratamento T8, após 48 horas. Ensaio S1 (meio M1; agitação recíproca a 120 min ⁻¹).	53
Tabela V.2.1.1 - Resultados gerais da fermentação de diferentes meios a base de caldo de cana-de-açúcar, após 48 horas. Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min ⁻¹).	58
Tabela V.2.2.1 - Resultados gerais da fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com diferentes concentrações de fosfato de amônio (meios M5 a M14). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min ⁻¹).	66
Tabela V.3.1 - Resultados gerais da fermentação de meios a base de caldo de cana-de-açúcar. Ensaio P1 a F5 (frequência do agitador, 500 min ⁻¹ ; aeração, 0,43 vvm).	82
Tabela V.4.1 - Resultados gerais da fermentação de caldo de cana-de-açúcar diluído a uma concentração de sacarose de 24,3 g/L. Ensaio P2 (meio M13; frequência do agitador, 500 min ⁻¹ , aeração 0,43 vvm).	93

Tabela V.4.2 - Resultados gerais da fermentação de caldo de cana-de-açúcar diluído a uma concentração de sacarose de 25,6 g/L. Ensaio P3 (meio M13; frequência do agitador, 500 min⁻¹, aeração 0,43 vvm). 94

Tabela V.4.3 - Resultados gerais da fermentação de caldo de cana-de-açúcar diluído a diferentes concentrações de sacarose. Ensaios F1 a F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹, aeração 0,43 vvm). 96

TABELAS DO APÊNDICE A

Tabela A.1 - Absorbâncias a 560 nm de suspensões de *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199, cultivada em meio a base de caldo de cana-de-açúcar (M1), em diferentes concentrações. Espectrofotômetro SHIMADZU UV 160A. A1

Tabela A.2 - Absorbâncias a 505 nm de soluções-padrão de sacarose, previamente hidrolisadas com HCl 2N, pelo método GOD-POD. Espectrofotômetro SHIMADZU UV 160A. A2

Tabela A.3 - Área dos picos do cromatograma da análise de soluções-padrão de 2,3-butanodiol obtidas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Cromatógrafo MERCK-HITACHI acoplado a detector de índice de refração ERC-7515A ERMA CR. INC. A3

Tabela A.4 - Área dos picos do cromatograma da análise de soluções-padrão de acetoína obtidos por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Cromatógrafo MERCK-HITACHI (detector de índice de refração ERC-7515A ERMA CR. INC.). A4

TABELAS DO APÊNDICE C

Tabela C.1 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M1). Ensaio S1 (agitação recíproca a 120 min ⁻¹).	C1
Tabela C.2 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M1). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min ⁻¹).	C1
Tabela C.3 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar não suplementado com nutrientes (meio M2). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min ⁻¹).	C2
Tabela C.4 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M3). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min ⁻¹).	C2
Tabela C.5 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M4). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min ⁻¹).	C3
Tabela C.6 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M5). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min ⁻¹).	C3
Tabela C.7 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 1,0 g/L de fosfato de amônio (meio M6). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min ⁻¹).	C4

Tabela C.8 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 2,0 g/L de fosfato de amônio (meio M7). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

C4

Tabela C.9 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 2,5 g/L de fosfato de amônio (meio M8). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

C5

Tabela C.10 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 3,0 g/L de fosfato de amônio (meio M9). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

C5

Tabela C.11 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 3,5 g/L de fosfato de amônio (meio M10). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

C6

Tabela C.12 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 4,0 g/L de fosfato de amônio (meio M11). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

C6

Tabela C.13 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 5,0 g/L de fosfato de amônio (meio M12). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

C7

Tabela C.14 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 6,0 g/L de fosfato de amônio (meio M5). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

C7

Tabela C.15 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 8,0 g/L de fosfato de amônio (meio M13). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min ⁻¹).	C8
Tabela C.16 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 10,0 g/L de fosfato de amônio (meio M14). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min ⁻¹).	C8
Tabela C.17 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P) em função do tempo. Ensaio P1 (meio M1; frequência do agitador, 500 min ⁻¹ , aeração, 0,43 vvm).	C9
Tabela C.18 - Concentração de oxigênio dissolvido (C) em função do tempo. Ensaio P1 (meio M1; frequência do agitador, 500 min ⁻¹ , aeração, 0,43 vvm).	C10
Tabela C.19 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) em função do tempo. Ensaio P1 (meio M13; frequência do agitador, 500 min ⁻¹ ; aeração, 0,43 vvm).	C11
Tabela C.20 - Concentrações de células (X) e sacarose (S) em função do tempo. Ensaio P2 (M13; frequência do agitador, 500 min ⁻¹ ; aeração, 0,43 vvm).	C12
Tabela C.21 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x) e consumo de sacarose (μ_s) em função do tempo. Ensaio P2 (meio M13; frequência do agitador, 500 min ⁻¹ ; aeração, 0,43 vvm).	C13
Tabela C.22 - Concentrações de células (X) e sacarose (S) em função do tempo. Ensaio P3 (meio M13; frequência do agitador, 500 min ⁻¹ ; aeração, 0,43 vvm).	C14

Tabela C.23 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P) em função do tempo. Ensaio F1 (meio M1; frequência do agitador, 500 min ⁻¹ ; aeração, 0,43 vvm).	C15
Tabela C.24 - Concentração de oxigênio dissolvido (C) em função do tempo. Ensaio F1 (meio M1; frequência do agitador, 500 min ⁻¹ ; aeração, 0,43 vvm).	C16
Tabela C.25 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) em função do tempo. Ensaio F1 (meio M1; frequência do agitador, 500 min ⁻¹ ; aeração, 0,43 vvm).	C17
Tabela C.26 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo de fermentação. Ensaio F2 (meio M1; frequência do agitador, 500 min ⁻¹ ; aeração, 0,43 vvm).	C18
Tabela C.27 - Concentração de oxigênio dissolvido (C) em função do tempo. Ensaio F2 (meio M1; frequência do agitador, 500 min ⁻¹ ; aeração, 0,43 vvm).	C19
Tabela C.28 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) em função do tempo. Ensaio F2 (meio M1; frequência do agitador, 500 min ⁻¹ ; aeração, 0,43 vvm).	C20
Tabela C.29 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P) em função do tempo. Ensaio F3 (meio M1; frequência do agitador, 500 min ⁻¹ ; aeração, 0,43 vvm).	C21
Tabela C.30 - Concentração de oxigênio dissolvido (C) em função do tempo. Ensaio F3 (meio M1; frequência do agitador, 500 min ⁻¹ ; aeração, 0,43 vvm).	C22

- Tabela C.31 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) em função do tempo. Ensaio F3 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). C23
- Tabela C.32 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P) em função do tempo. Ensaio F4 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm) C24
- Tabela C.33 - Concentração de oxigênio dissolvido (C) em função do tempo. Ensaio F4 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). C25
- Tabela C.34 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) em função do tempo. Ensaio F4 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). C26
- Tabela C.35 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P) em função do tempo. Ensaio F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). C27
- Tabela C.36 - Concentração de oxigênio dissolvido (C) em função do tempo. Ensaio F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). C28
- Tabela C.37 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) em função do tempo. Ensaio F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm). C29

I INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos visando a produção de 2,3-butanodiol por via fermentativa datam do início do século. Estas pesquisas, porém, somente se intensificaram na década de 40, mais especificamente durante a 2ª Grande Guerra. Neste caso, a escassez de borracha, produto estratégico à época do conflito, levou a um grande esforço por parte de grupos de pesquisa nos EUA e no Canadá para o desenvolvimento do processo, culminando com a construção de uma planta piloto para a produção do diol e sua subsequente transformação em 1,3-butadieno. Esta linha de pesquisa foi depois abandonada devido ao estabelecimento de uma rota petroquímica economicamente mais favorável^{35,75}.

Embora a obtenção de 1,3-butadieno e outros produtos normalmente derivados do petróleo, a partir de butanodiol, não possa competir com os processos hoje em uso, os estudos sobre a fermentação butileno-glicólica, em virtude da possibilidade de utilização de matérias-primas renováveis e de baixo custo, continuam a ser realizados. Na literatura especializada são descritos vários trabalhos em que a viabilidade técnica desta fermentação é demonstrada^{3,58,63,85}. Deste modo, o interesse industrial pelo 2,3-butanodiol depende, em grande parte, da disponibilidade e do preço do petróleo no mercado mundial.

Entre outras potenciais aplicações do 2,3-butanodiol, destacam-se a produção de metil-etil-cetona, solvente orgânico amplamente empregado na indústria química^{34,40,75}, diacetil, usado como flavorizante na indústria de alimentos^{35,69}, éter tetrametilico, possível substituto do éter metil-terc-butilico (MTBE) como aditivo à gasolina⁷⁵, e diésteres, eficientes plastificantes de polímeros termoplásticos⁷⁵.

A maior parte das pesquisas sobre a produção fermentativa de 2,3-butanodiol foi realizada com a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, um microrganismo anaeróbio facultativo que excreta uma mistura de meso e L(+)-2,3-butanodiol como principais produtos do metabolismo de carboidratos^{22,35}. Nestes trabalhos foram empregadas diferentes matérias-primas como melaço de cana-de-açúcar^{2,3}, soro de queijo^{5,30,65} e hidrolisados amiláceos³ e

de madeira^{16,20,81,83}. Com relação ao caldo de cana-de-açúcar, matéria-prima abundante e de custo relativamente baixo no Brasil, no entanto, não foi encontrada qualquer publicação sobre a sua aplicação no estudo da fermentação butileno-glicólica. Entretanto, os estudos com melão de cana citados anteriormente e outros realizados com sacarose em meio sintético^{46,63}, nos quais excelentes resultados foram obtidos, sugerem um grande potencial do caldo de cana para uso neste processo.

Neste sentido, procurou-se, neste trabalho, avaliar o caldo de cana-de-açúcar como fonte natural de carboidratos para a obtenção de 2,3-butanodiol por via fermentativa com *Klebsiella pneumoniae*, abordando aspectos consensualmente considerados na literatura como importantes para este processo: a composição do meio de produção e o efeito da concentração inicial de substrato.

II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 2,3-Butanodiol: características e aplicações

O 2,3-butanodiol, que recebe também os nomes de 2,3-butileno glicol, 2,3-dihidroxiбутano e dimetiletenoglicol, é um líquido viscoso, incolor e inodoro^{28,35}. É encontrado em pequenas quantidades em tecidos de plantas e animais superiores, assim como em vários produtos alimentícios, neste caso, pela ação de microrganismos²⁸.

Quanto à configuração estereoquímica, pode se apresentar sob três diferentes formas: meso, dextro e levo isômero^{28,40,49} (Figura II.1.1). Se a síntese for essencialmente química, o produto obtido será opticamente inativo e consistirá de uma mistura das formas meso, D(-) e L(+)⁴⁰. Por outro lado, se obtido por via fermentativa, a forma isomérica resultante e sua proporção no meio irá depender do microrganismo produtor^{28,35,49}, como é mostrado no item II.2.

Figura II.1.1 - Estereoisômeros de 2,3-butanodiol

Um resumo das propriedades físicas dos isômeros meso e D(-), bem como da mistura racêmica (quantidades equimolares das formas D(-) e L(+)), é mostrada na Tabela II.1.1.

Tabela II.1.1 - Propriedades físicas dos estereoisômeros de 2,3-butanodiol²⁸.

Constante	D (-)	Meso	Mistura Racêmica
Ponto de ebulição (°C)	179-180	181-182	177
Ponto de congelamento (°C)	-60	0,0	-
Viscosidade (cp)	21,8	65,6	-
Rotação específica a 26°C	-13,3	0,0	0,0

Na prática, o elevado ponto de ebulição dos isômeros se constitui no principal entrave do processo de recuperação do 2,3-butanodiol por destilação. A grande quantidade de energia requerida, neste caso, compromete a viabilização econômica do método^{35,75}.

Por outro lado, o baixo ponto de congelamento do isômero *levo* representa uma vantagem com relação à utilização comercial do 2,3-butanodiol. Sua aplicação como agente anti-congelante tem sido enfaticamente indicada em substituição ao etileno glicol, um composto tradicionalmente usado com esta finalidade em países frios^{28,34,49}.

A aplicação do 2,3-butanodiol, de forma direta, é também discutida por alguns autores. FLICKINGER¹⁵ ressalta que o calor de combustão do diol (27.200 KJ/Kg) se compara favoravelmente ao do etanol (29.100 KJ/Kg) e do metanol (22.100 KJ/Kg), indicando a possibilidade de sua utilização como combustível. Ainda, segundo TEGTMEIER⁶⁹, o diol pode ser usado industrialmente como solvente e agente de extração.

A maioria dos autores considera, no entanto, que o 2,3-butanodiol é um importante intermediário químico, podendo ser utilizado na produção de vários compostos de aplicação industrial em substituição a derivados de petróleo^{22,35,69,75}. As reações são bem conhecidas e sua aplicação industrial depende do preço do petróleo.

LEDINGHAM & NEISH²⁸, em uma extensa revisão sobre o assunto, destacam a conversão do diol em 1,3-butadieno, diacetil e metil-etil-cetona, como formas potenciais de seu emprego. No caso específico do butadieno, um monômero usado na produção de borracha sintética e plásticos, a obtenção a partir de butanodiol foi intensamente estudada durante a II Guerra Mundial. Nesta época, a produção do diol por fermentação chegou a ser testada em escala semi-industrial^{28,29,34,40,49,75}. Esta aplicação deve ser hoje reavaliada, uma vez que a obtenção de butadieno por via petroquímica apresenta-se como uma opção mais econômica⁶⁹.

O diacetil, obtido facilmente por desidrogenação catalítica do 2,3-butanodiol^{28,35,40}, é um aditivo altamente valorizado na indústria de alimentos, como flavorizante^{35,69}, além de apresentar propriedades antissépticas²⁸.

Metil-etil-cetona (MEK), produto resultante da desidratação catalítica de 2,3-butanodiol, tem ampla aplicação industrial como solvente orgânico^{34,35,40,75}. Além disto, possui um calor de combustão maior que o do etanol podendo, por essa razão, substituí-lo como aditivo à gasolina⁷².

Uma série de outras reações químicas podem ser conduzidas para formar derivados de 2,3-butanodiol que seriam, então, empregados na produção de vários outros compostos. Polímeros de poliuretano, tintas de impressão, perfumes, fármacos, agentes emulsificantes e umidificantes são alguns exemplos citados na literatura^{28,34,35,69}.

VOLOCH *et alii*⁷⁵ descrevem, ainda, duas reações alternativas para gerar produtos passíveis de aplicação industrial. Segundo estes pesquisadores, a reação de 2,3-butanodiol com ácidos monobásicos forma diésteres que podem ser usados como plastificantes de polímeros termoplásticos como nitrato de celulose, cloreto de polivinil, poliacrilatos, entre outros. A segunda opção, o éter tetrametílico, resultante da reação do diol com acetona, pode substituir o éter metil-terc-butílico (MTBE) como aditivo à gasolina.

TEGTMEIER⁶⁹ destaca, finalmente, o fato do butanodiol ser um composto biodegradável. Esta é uma característica interessante do ponto de vista ecológico, uma vez que o diol pode ser empregado na fabricação de produtos menos agressivos ao meio ambiente.

II.2 Microrganismos Produtores

A formação de 2,3-butanodiol foi observada em algumas espécies de leveduras^{28,34}. FIELDS & RICHMOND¹⁴, verificaram também sua síntese em duas espécies de fungos filamentosos, *Rhizopus nigricans* e *Penicillium expansum*, tendo glicose como substrato. No entanto, em ambos os casos, os rendimentos e a eficiência de conversão foram extremamente baixos, com produtividades insignificantes.

Várias bactérias, porém, se destacam pela capacidade de excretar quantidades consideráveis de 2,3-butanodiol como produto final no metabolismo de carboidratos. Espécies pertencentes aos gêneros *Klebsiella* (*Aerobacter*), *Bacillus*, *Serratia* e *Pseudomonas* (*Aeromonas*) foram utilizadas em diversos estudos da fermentação butileno-glicólica, demonstrando ser bons produtores deste diol^{128,34,35,57,75}.

Dependendo do microrganismo empregado, vários sub-produtos são também formados, caracterizando tipos diferentes de fermentação.

A fermentação com *Serratia marcescens* se caracteriza pela formação de quantidades apreciáveis de ácidos orgânicos (lático, fórmico, acético e succínico), CO₂ e, principalmente, meso-2,3-butanodiol. Acetoína e etanol são também excretados em menores concentrações^{34,49}. Segundo MAGEE & KOSARIC³⁵, esta bactéria pode utilizar glicerol e celobiose como fontes de carbono, enquanto o metabolismo de xilose é dependente da linhagem empregada.

Aeromonas hydrophila é citada em vários trabalhos das décadas de 40 e 50 e, mais recentemente, por WILLETTS^{78,79,80} que efetuou estudos visando a produção de 2,3-butanodiol por esta bactéria. Bons rendimentos foram obtidos na fermentação de meio à base de amido solúvel suplementado com baixos níveis de acetato de sódio. Foi sugerido,

ainda, que *A. hydrophila* pode ser utilizada em processos de conversão de pentoses, geradas na hidrólise de resíduos hemicelulósicos, em 2,3-butanodiol³⁵.

A produção fermentativa de 2,3-butanodiol por membros da família *Bacillaceae* têm sido, também, estudada desde o início do século. Os primeiros trabalhos empregaram as bactérias *Bacillus polymyxa* e *Bacillus subtilis*^{1,29,49}. Estudos mais recentes foram feitos com *Bacillus licheniformis*⁴¹ e *Bacillus amyloliquefaciens*⁴. No entanto, apenas *Bacillus polymyxa* é considerado com potencial para uso industrial. Sua maior vantagem está no fato de excretar essencialmente *levo*-2,3-butanodiol^{11,26,29,34}. Além disto, é capaz de utilizar vários monossacarídeos (glicose, xilose, galactose, trealose)⁴⁹, dissacarídeos (lactose, celobiose, manose, levulose, sacarose, maltose)^{11,49} e polissacarídeos (amido, inulina e xilana)^{26,49}. Esta capacidade em hidrolisar amido representa uma vantagem, uma vez que pode ser empregado na fermentação de matérias-primas amiláceas naturais. Algumas desvantagens são, entretanto, atribuídas a *B. polymyxa* e devem ser consideradas no seu emprego em processos produtivos. Em primeiro lugar, etanol, em quantidades equivalentes ao butanodiol, é formado, prejudicando o rendimento do composto de interesse. Além disto, a estocagem e transferências sucessivas da cultura levam à perda de sua atividade fermentativa^{34,35}. A cultura é, também, muito susceptível ao ataque por bacteriófagos³⁴.

No presente trabalho, assim como na maioria das pesquisa feitas sobre esta fermentação, foi utilizada a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, linhagem NRRL B199 (ATCC 8724), também referida como *Aerobacter aerogenes* e *Klebsiella oxytoca*⁸. *K. pneumoniae* é apontada por muitos pesquisadores como o microrganismo com maior potencial de aplicação em processos industriais para obtenção de 2,3-butanodiol.

Morfologicamente, *K. pneumoniae* se apresenta como um bastonete de comprimento entre 0,6 e 6,0 μm e diâmetro entre 0,3 e 1,5 μm . É Gram negativo e não possui capacidade de esporulação⁸.

Comparada com *B. polymyxa*, *K. pneumoniae* produz o dobro de diol e muito menos etanol, em processos com aeração moderada³⁴. Apresenta boa estabilidade numa ampla faixa de condições ambientais, podendo ser cultivada e estocada em meios simples sem perda da viabilidade^{34,35}. Esta bactéria conduz, ainda, uma fermentação mais completa,

o que representa uma vantagem em relação à recuperação de produto e à economia do processo de forma geral^{34,35}.

K. pneumoniae metaboliza prontamente vários mono e dissacarídeos. Entre os primeiros, os mais comumente utilizados para esta fermentação foram glicose^{44,50,53,58,44}, galactose¹⁰ e xilose^{16,23,42,84}. Dentre os dissacarídeos, encontram-se trabalhos com lactose^{10,55} e sacarose^{46,63}. Por esta razão, este microrganismo tem sido empregado na avaliação de vários substratos, matérias-primas e resíduos agro-industriais. São exemplos encontrados na literatura: melaço de cana^{2,3} e de beterraba³⁴, licor sulfítico³⁸, hidrolisados de madeira (celulósicos e hemicelulósicos)^{16,20,81,82,83,86} e de cereais amiláceos³, soro de queijo^{5,30,31,65}, entre outros.

Como produtos de fermentação, *K. pneumoniae* excreta uma mistura dos isômeros L(+) e meso-2,3-butanodiol, com ampla predominância desta última forma (86 a 95%), além de etanol, ácidos orgânicos, CO₂ e H₂. Acetoína (acetil-metil-carbinol), um composto precursor do butanodiol na sua via de produção, está normalmente presente no meio³⁵.

Por ter sido o microrganismo escolhido para condução dos ensaios fermentativos deste trabalho, as discussões dos itens seguintes se restringirão à bactéria *K. pneumoniae*.

II.3 Mecanismo Bioquímico

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria anaeróbia facultativa, tendo, portanto, dois mecanismos alternativos para a obtenção da energia que necessita para seu crescimento e manutenção. O metabolismo é predominantemente respiratório quando oxigênio está amplamente disponível, e fermentativo sob condições de limitação de oxigênio⁶⁶. Segundo JANSEN *et alii*²⁴, as reações catabólicas no metabolismo de açúcares divergem a partir da formação de um composto chave: o piruvato. Este composto pode ser oxidado a dióxido de carbono pela via dos ácidos tricarboxílicos (TCA), com conseqüente produção de energia (ATP) e recuperação de coenzima NAD⁺, ou ser convertido em vários produtos por mecanismo fermentativo anaeróbio.

A formação de piruvato a partir de glicose se dá pela via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ou glicolítica, amplamente utilizada por bactérias na degradação de carboidratos⁶⁶. Para o metabolismo do piruvato formado, *K. pneumoniae* utiliza a via mista ácido-2,3-butanodiol, que se caracteriza pela geração de diferentes compostos além do diol⁵⁷. Neste caso, rotas independentes levam à produção de ácidos orgânicos (lático, fórmico e acético), etanol, acetoína, CO₂ e H₂^{35,57}. Segundo JANSEN & TSAO²², o produto predominante, sob condições de limitação de oxigênio, é 2,3-butanodiol. A Figura II.3.1 mostra a sequência das reações na formação dos diversos compostos na via mista ácido-2,3-butanodiol^{35,57}.

O mecanismo de utilização de sacarose por *K. pneumoniae* envolve a prévia hidrólise do dissacarídeo em seus monômeros, glicose e frutose, catalisada pela enzima invertase²⁵. Estes açúcares são, então, metabolizados a piruvato pela via glicolítica.

Conforme MAGEE & KOSARIC³⁵, em condições aeróbias o piruvato é degradado a acetil-CoA pela ação do complexo multienzimático piruvato desidrogenase. Por outro lado, em condições de limitação de oxigênio, três outros sistemas enzimáticos atuam sobre o piruvato: lactato desidrogenase, acetolactato sintase e piruvato-formiato liase. São formados, assim, lactato, α -acetolactato e formiato, respectivamente. Formiato-hidrogênio liase, um segundo complexo, catalisa a degradação do ácido fórmico a CO₂ e H₂⁶⁶.

Três enzimas participam da rota de formação de 2,3-butanodiol a partir do piruvato: acetolactato sintase, acetolactato descarboxilase e acetoína redutase³⁵. Os dois primeiros passos, que levam à formação de acetoína, foram inicialmente deduzidos por JUNI, em 1952^{22,75}. Numa primeira etapa, duas moléculas de piruvato são condensadas para formar α -acetolactato, em reação catalisada por acetolactato sintetase. O segundo passo consiste na conversão, por descarboxilação, do α -acetolactato em acetoína, com a participação da enzima acetolactato descarboxilase. Finalmente, acetoína redutase catalisa a redução reversível de acetoína a 2,3-butanodiol, havendo, neste ponto, reoxidação do NADH₂ a NAD⁺ ²². Segundo VOLOCH *et alii*⁷⁵, além da redução enzimática, acetoína pode ser oxidada a diacetil pelo oxigênio presente no meio de fermentação.

1. Enzimas da via glicolítica	7. Acetolactato sintase
2. Piruvato-formiato liase	8. Acetolactato descarboxilase
3. Acetaldeído desidrogenase	9. Acetoina redutase (Butanodiol desidrogenase)
4. Etanol desidrogenase	10. Lactato desidrogenase
5. Fosfo-transacetilase	11. Formiato-hidrogênio liase
6. Acetato quinase	

Figura II.3.1 - Vias metabólicas de formação dos produtos da fermentação de carboidratos por *Klebsiella pneumoniae*^{35,57}.

STÖRMER⁶⁸ isolou a acetolactato sintase em 1967 e, no ano seguinte, publicou trabalhos em que estudou a regulação desta enzima por acetato, sulfato e fosfato. O autor concluiu que a enzima tem um pH ótimo em 5,8 e que a atividade é inibida por sulfato e fosfato, enquanto acetato age como indutor. Mostrou, finalmente, que acetato causa a indução das três enzimas que levam à formação de 2,3-butanodiol a partir do piruvato. Posteriormente, este mesmo autor relatou que o acetato, em sua forma dissociada, era responsável pela indução de acetolactato sintase em *K. pneumoniae*⁶⁷. MAGEE & KOSARIC³⁵ ressaltam que a faixa ótima de pH para a atividade desta enzima, 5,5 a 6,5, corresponde justamente àquela em que acetato se encontra dissociado no meio. Essas observações demonstram a importância do acetato na regulação metabólica do catabolismo de piruvato.

O pH ótimo de acetolactato descarboxilase isolada de *K. pneumoniae* está na faixa de 6,2 a 6,4. Em pH 5,8, a atividade é 25% menor que a atividade máxima³³.

Acetoína redutase foi isolada e purificada de extratos celulares de *Aerobacter aerogenes* por BRYN *et alii*⁷. Diversos estudos foram feitos, no passado, para comprovar a natureza estereoespecífica desta enzima, uma vez que três formas isoméricas distintas podem resultar na redução de acetoína a butanodiol³⁵.

Dois modelos foram propostos mais recentemente para explicar o mecanismo de conversão de acetoína a butanodiol por *K. pneumoniae*. O primeiro deles, idealizado por VOLOCH *et alii*⁷⁶, prevê a participação de três enzimas na reação: D(-)-acetoína redutase (E1), L(+)-acetoína redutase (E2) e acetoína racemase (E3). A fração E1 catalisa a redução de D(-)-acetoína a meso-2,3-butanodiol, mas não utiliza L(+)-acetoína. A fração E2 catalisa a redução de L(+)-acetoína a L(+)-2,3-butanodiol, porém não reduz D(-)-acetoína. E3, finalmente, converte D(-)-acetoína a L(+)-acetoína. Este modelo presume que, reagindo acetoína racêmica com excesso de NADH na presença de D(-)-acetoína, seriam formados meso-2,3-butanodiol e L(+)-acetoína.

O segundo modelo, preconizado por UI *et alii*⁷³, propõe a formação sucessiva de meso-2,3-butanodiol, L(+)-acetoína e L(+)-2,3-butanodiol em reações catalisadas por três

desidrogenases. Difere, portanto, do modelo de Voloch *et alii*⁷⁶ pela ausência de uma acetoína racemase.

A figura II.3.2 apresenta, de forma esquemática, os modelos citados.

E_1 = D(-)-Acetoína redutase
 E_2 = L(+)-Acetoína redutase
 E_3 = Acetoína racemase

E_1 = Meso-2,3-Butanodiol desidrogenase
 E_2 = Meso-2,3-Butanodiol desidrogenase
 E_3 = L(+)-2,3-Butanodiol desidrogenase

Figura II.3.2 - Modelos propostos para explicar o mecanismo de formação dos estereoisômeros de 2,3-butanodiol por *Klebsiella pneumoniae*. (A) VOLOCH *et alii*⁷⁶ (B) UI *et alii*⁷³.

Segundo STÖRMER⁶⁸, o papel fisiológico da formação de 2,3-butanodiol seria evitar uma super-produção de acetato e, conseqüentemente, regular o pH intracelular. Uma segunda função metabólica diz respeito à manutenção do balanço $\text{NAD}^+/\text{NADH}_2$ no interior da célula. A redução de acetoína a butanodiol permite a regeneração da coenzima NAD^+ , a partir de NADH_2 , durante o catabolismo de carboidratos. Quando todo substrato é consumido, o NADH_2 não é mais formado e, devido à reversibilidade da reação catalisada por acetoína redutase, esta coenzima pode ser regenerada. Neste contexto, o butanodiol atuaria como uma reserva de poder redutor³⁵.

II.4 Fatores que Afetam o Processo Fermentativo

II.4.1 Temperatura

Diferentes temperaturas de condução de processo são encontradas nas publicações referentes à fermentação butileno-glicólica com *Klebsiella pneumoniae*. Parece haver um consenso, no entanto, de que a faixa ideal para o crescimento celular e formação do diol está entre os limites de 30° e 37°C. De fato, encontram-se trabalhos onde foram utilizadas as temperaturas de 30°C^{10,20,42,52,85}, 32°C¹⁶, 35°C^{2,54,58} e 37°C^{17,21,23,63}. TOPIWALA & SINCLAIR⁷¹, em um dos poucos trabalhos que fogem a esta relação, concluíram que a máxima velocidade específica de crescimento ($\mu_{x,m}$) desta bactéria ocorre a 38°C.

A influência da temperatura sobre a velocidade de crescimento de *K. pneumoniae* foi estudada por ESENER *et alii*¹³, em regime descontínuo, tendo glicerol com única fonte de carbono e energia. De acordo com o modelo proposto por estes pesquisadores, a variação das máximas velocidades específicas de crescimento é relativamente pequena na faixa de 33 a 38°C. Os maiores valores de $\mu_{x,m}$ foram observados, porém, a 37°C. Segundo estes autores, esta deve ser a temperatura utilizada em um processo industrial em que se deseja maiores velocidades de produção de biomassa.

OLSON & JOHNSON⁴⁴, estudando a produção de 2,3-butanodiol em sistema contínuo, tendo glicose como substrato limitante, concluiu que a temperatura de 30°C levava às maiores concentrações do produto no meio (cerca de 100 g/L). Os próprios autores admitem, no entanto, que os menores rendimentos, obtidos a temperaturas mais elevadas (35 ou 36°C), podem ter resultado do efeito inibidor causado pela adição de grandes quantidades de antiespumante no meio. Nestas temperaturas a espuma formada no reator é mais persistente, exigindo o emprego de maiores quantidades de antiespumante.

FULMER *et alii*¹⁷, conseguiram bons rendimentos em butanodiol em fermentação em batelada de sacarose por *Aerobacter aerogenes*, a 37°C. Utilizando este mesmo substrato, em experimentos em cultivo contínuo, PIRT & CALLOW⁴⁶ relataram que, acima de 37°C, o crescimento de *A. aerogenes* é muito sensível à temperatura e que, a 40°C, a formação de biomassa é praticamente paralisada. Neste trabalho, os autores concluíram que a máxima produção de diol ocorre entre 35 e 37°C, enquanto o crescimento celular é favorecido a 30°C. As máximas velocidades específicas de consumo de sacarose foram observadas a 37°C.

II.4.2 pH

Assim como a temperatura, o pH é um importante parâmetro na regulação do metabolismo bacteriano para produção de 2,3-butanodiol. Segundo ZENG⁸⁷, esta variável afeta fortemente a formação dos diferentes metabólitos na fermentação butileno-glicólica, sendo os valores ótimos para condução do processo dependentes do microrganismo e do substrato empregados. LONG & PATRICK³⁴ afirmam, em sua revisão sobre o assunto, que além destes dois fatores, condições ambientais como a temperatura e a tensão de oxigênio no meio também influenciam o pH ótimo para esta bioconversão.

De forma geral, condições alcalinas favorecem a produção de ácidos orgânicos, enquanto a formação de acetoína e 2,3-butanodiol é privilegiada em valores de pH ligeiramente ácidos^{35,36,39}.

PIRT & CALLOW⁴⁶ avaliaram o efeito do pH sobre o metabolismo de sacarose por *K. pneumoniae* em condições parcialmente aeróbias. Segundo suas conclusões, a máxima velocidade específica de consumo do substrato ocorreu a pH 5,5, enquanto a produção de biomassa foi ligeiramente superior em pH 6,3. Os resultados mostraram, ainda, que a produção de butanodiol é máxima na faixa de pH entre 5,0 e 6,0 e que valores acima de 6,0 favorecem a formação de ácido láctico em detrimento do diol.

O trabalho desenvolvido por JANSEN *et alii*²³ demonstrou que, na fermentação de xilose, o maior acúmulo de 2,3-butanodiol se dá em pH entre 5,2 e 5,6. Em pH 6,0 e acima deste nível, observou-se um decréscimo no rendimento do produto. Estes experimentos, conduzidos em regime descontínuo, demonstraram também o efeito do pH sobre o crescimento celular. A maior velocidade específica de crescimento foi verificada em pH 5,2. Acima deste valor, a velocidade diminuiu progressivamente com o aumento do pH. Não houve crescimento celular quando o pH do meio era de 4,5.

II.4.3 Concentração inicial de substrato

É consenso na literatura especializada que os dois fatores que mais afetam a produção fermentativa de 2,3-butanodiol são a concentração de substrato e o suprimento de oxigênio para o meio. Os resultados de diferentes fermentações dependem, muitas vezes, da ação conjunta destes dois parâmetros. Entretanto, para uma melhor organização do texto, a influência destas duas variáveis será discutida separadamente.

Alguns estudos encontrados na literatura destacam a influência da concentração inicial de substrato (S_0) sobre a cinética da fermentação butileno-glicólica por *K. pneumoniae*. Embora os resultados pareçam ser dependentes do tipo de carboidrato ou matéria-prima empregados no processo fermentativo, a maioria dos estudos demonstraram que este parâmetro afeta tanto o crescimento celular quanto a formação de produtos por esta bactéria.

Em experimentos onde avaliaram o efeito da concentração inicial de glicose sobre os resultados da fermentação por *Aerobacter aerogenes* (*K. pneumoniae*) NRRL B-199, SABLAYROLLES & GOMA⁵⁸ concluíram que esta variável influencia os rendimentos e as velocidades específicas de produção de biomassa e de butanodiol por este microrganismo. Neste trabalho, o fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) variou inversamente com o aumento de S_0 , apresentando um valor mínimo de 0,045 e máximo de 0,21 para concentrações iniciais de glicose de 195 e 22 g/L, respectivamente. Um efeito contrário foi observado sobre o metabolismo da glicose em produtos. Segundo os autores, estes resultados decorrem, também, da transferência de oxigênio para o meio, como é discutido no item seguinte (II.4.4). A maior concentração final em 2,3-butanodiol, 88 g/L, com um fator de conversão de substrato em produtos ($Y_{p/s}$) de 0,45 (90% do máximo teórico), foi obtida com S_0 igual a 195 g/L. A produtividade alcançou seu valor máximo (2,02 g/Lh) quando a concentração de glicose era de 107 g/L. Os autores relatam, ainda, que as máximas velocidades específicas de crescimento ($\mu_{x,m}$) e de formação de butanodiol ($\mu_{p,m}$) são afetadas pelo aumento de S_0 em concentrações acima de 50 g/L, sendo este efeito mais pronunciado sobre $\mu_{x,m}$ que sobre $\mu_{p,m}$.

QURESHI & CHERYAN⁵² demonstraram, igualmente, que elevadas concentrações de glicose resultam em altas concentrações de butanodiol e baixos rendimentos em biomassa, em cultivo de *Klebsiella oxytoca* (*K. pneumoniae*) NRRL B199 em batelada. Estes autores verificaram uma forte influência de S_0 sobre as velocidades específicas de crescimento (μ_x) e de formação de butanodiol (μ_p). Enquanto μ_x cai progressivamente com o aumento de S_0 , um efeito inverso é observado sobre μ_p . Em razão destes dados, os autores sugerem que a cinética de produção de 2,3-butanodiol por esta bactéria seja classificada como semi-associada ao crescimento.

Tendo xilose como fonte de carbono, JANSEN *et alli*²³ verificaram que a máxima velocidade específica de crescimento ($1,05 \text{ h}^{-1}$) de *K. pneumoniae* ocorreu quando a concentração desta pentose era de 20 g/L no início da fermentação. Concentrações entre 5 e 150 g/L foram avaliadas. Os autores afirmam que acima de 160 g/L não houve

crescimento da bactéria. De acordo com suas conclusões, o decréscimo na velocidade específica de crescimento com o aumento da concentração do substrato se deve à diminuição da atividade de água (A_w) no meio de cultivo. Esta observação é coerente com os resultados obtidos por ESENER *et alii*¹² em estudo sobre a influência da A_w sobre a velocidade de crescimento de *K. pneumoniae*. Neste trabalho, foi verificada uma queda constante na velocidade específica de crescimento da bactéria com a redução da atividade de água de 0,995 para 0,970. Para um valor de A_w de 0,985, μ_x atingiu apenas 50% do seu valor máximo, enquanto A_w abaixo de 0,975 praticamente inibiu o crescimento. SCOTT⁶⁰, confirmam que espécies de *Klebsiella* apresentam baixa osmotolerância, sendo seu crescimento significativamente afetado por concentrações elevadas de soluto no meio.

No trabalho de JANSEN *et alii*²³, os melhores rendimentos em butanodiol foram obtidos com concentrações de xilose entre 100 e 150 g/L. Em concordância com os resultados encontrados por SABLAYROLLES & GOMA⁵⁸ para glicose, a máxima produtividade foi observada com concentração inicial do substrato de 100 g/L.

RAMACHANDRAN *et alii*⁵⁵, estudando o efeito da concentração inicial de lactose sobre a cinética desta fermentação, afirmam que concentrações entre 26 e 150 g/L não inibem o crescimento de *Klebsiella oxytoca* (*K. pneumoniae*) ATCC 8724 (NRRL B199). Os autores apresentam um gráfico onde correlacionam a variação da concentração celular com o tempo, para todas as condições avaliadas. Os perfis das curvas de crescimento são coincidentes nas 10 primeiras horas de cultivo e, em nenhum caso, foi observada a ocorrência de fase "lag". Os autores não fazem menção a uma possível adaptação das culturas a altas concentrações de substrato.

Em fermentação em batelada de sacarose por *K. pneumoniae* NRRL B199, SILVEIRA⁶⁴ concluiu que concentrações de até 100 g/L deste açúcar não prejudicam o rendimento e a produtividade do processo. Ao contrário, os melhores resultados foram obtidos com S_0 próximo a esta concentração. Por outro lado, o crescimento celular foi extremamente inibido por concentrações de sacarose em torno de 200 g/L. FULMER *et alii*¹⁷, trabalhando também com sacarose e uma cepa diferente de *Aerobacter*,

demonstraram que os rendimentos em butanodiol, assim como as velocidades de produção, foram máximos com concentrações de substrato de 80 g/L. Acima destes níveis, ambos foram prejudicados. Não foi possível comparar as condições de cultivo utilizadas por estes pesquisadores, apenas fica claro que FULMER *et alli*¹⁷ trabalharam com um meio de cultivo mais simples.

II.4.4 Suprimento de oxigênio

A transferência de oxigênio para o meio influencia decisivamente os resultados da fermentação butileno-glicólica por *K. pneumoniae*, independentemente da fonte de carbono utilizada^{23,34,35,63}. Um alto suprimento de oxigênio favorece o crescimento celular em detrimento da produção de butanodiol. Por outro lado, uma transferência muito baixa resulta em baixas concentrações celulares, o que leva a uma queda na velocidade global do processo e, conseqüentemente, da produtividade. É consenso entre diferentes autores, que a condição ótima para a formação de produtos é alcançada com uma velocidade intermediária de transferência de oxigênio para o cultivo^{23,55,58,63}.

SABLAYROLLES & GOMA⁵⁸ estudaram os efeitos da aeração sobre o crescimento e a produção de 2,3-butanodiol por *Aerobacter aerogenes* (*K. pneumoniae*) NRRL B199, em meio sintético tendo glicose como fonte de carbono. O estudo foi feito em regime descontínuo, variando-se o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) inicial de 30 a 300 h⁻¹, com uma concentração inicial de substrato (S_0) de 45 g/L. Os resultados mostraram que os rendimentos em biomassa aumentaram consideravelmente para valores crescentes de K_La , enquanto um efeito oposto foi observado sobre os rendimentos em butanodiol. Com K_La de 150 e 300 h⁻¹, o fator de conversão de glicose em diol foi de cerca de 0,2 g/g, o que representa apenas 40% do rendimento máximo teórico. Com valores mais baixos de K_La (50 e 100 h⁻¹), rendimentos de até 88% foram alcançados.

Comportamentos semelhantes foram descritos por JANSEN *et alii*²³, com xilose como substrato, RAMACHANDRAN *et alii*⁵⁵ com lactose, e SILVEIRA *et alii*⁶³ com sacarose, em fermentações em que foi utilizada a mesma linhagem bacteriana.

SILVEIRA *et alii*⁶³, avaliando uma ampla faixa de K_La (8 a 620 h⁻¹) na fermentação em batelada de sacarose, verificaram que as maiores concentrações de butanodiol e os maiores valores de $Y_{P/S}$, foram obtidas com um suprimento mais brando de oxigênio (K_La entre 8 e 55 h⁻¹). No entanto, no segundo caso, a produtividade foi quase três vezes maior. Com um K_La de 120 h⁻¹, o fator de conversão em produto foi ligeiramente inferior, mas a produtividade teve um aumento de mais de 50%. A conversão em células foi visivelmente favorecida por K_La de 320 e 620 h⁻¹ ($Y_{X/S}$ de 0,20 e 0,28, respectivamente). Esse nível de aeração prejudicou, no entanto, a formação do diol.

Alguns autores identificaram diferentes fases na cinética do processo fermentativo, relacionadas à transferência de oxigênio para o meio^{23,48,64}.

PIRT⁴⁸, estudando a fermentação de glicose em regime contínuo, caracterizou três fases distintas em função do oxigênio: totalmente aeróbia, parcialmente aeróbia e anaeróbia. Na primeira fase, com excesso de oxigênio disponível no meio, o substrato foi completamente convertido em massa celular e CO₂. Na segunda fase, um pequeno suprimento de oxigênio permitiu a produção de 2,3-butanodiol, acetoina, células, acetato e CO₂, inibindo a formação de etanol. Finalmente, em anaerobiose, obtida pela passagem de nitrogênio no reator, no início do ensaio, a síntese celular e a produção de CO₂ atingiram seus níveis mais baixos e a maior parte da glicose foi desviada para a produção de 2,3-butanodiol, acetoina, etanol, formato e acetato.

As fases da fermentação nas quais a concentração de oxigênio dissolvido (C) era maior que zero ou, ao contrário, igual a zero, foram caracterizadas por JANSEN *et alii*²³ como não-limitada e limitada, respectivamente. Segundo os autores, com oxigênio em solução e após um período de "lag", o crescimento celular teve um perfil exponencial (μ_x máximo e constante) e o açúcar foi completamente oxidado a CO₂ e água. Com o aumento da densidade celular, a demanda de oxigênio também aumentou e, conseqüentemente, a concentração de O₂ dissolvido caiu rapidamente a valores muito próximos de zero. A partir

deste instante, com limitação de oxigênio, a velocidade de crescimento passou a ser linear (dX/dt constante) e teve início a formação de butanodiol.

Esse mesmo perfil cinético foi observado por SILVEIRA *et alii*⁶³, em fermentações com altos valores de K_La (120, 320 e 620 h^{-1}). Quando um K_La muito baixo foi empregado (8 h^{-1}), entretanto, uma interrupção do crescimento celular foi observada após um período de crescimento linear. Neste ponto, apenas uma pequena parcela do substrato havia sido consumida e, portanto, a maior parte da sacarose foi dirigida para a formação de butanodiol. Segundo os autores, neste caso, o suprimento de oxigênio para a massa celular presente no reator era mínimo e a velocidade específica de respiração (Q_{O_2}) reduziu-se, praticamente, a um valor igual a m_o (coeficiente de manutenção para oxigênio).

De acordo com JANSEN *et alii*²⁴, o fluxo de carbono na fermentação de xilose por *K. pneumoniae*, segue três vias distintas: (1) formação de massa celular; (2) fermentação, com formação de ATP, CO_2 e 2,3-butanodiol, e (3) respiração, com formação de ATP e CO_2 . Com base nesta divisão, estes autores apresentaram uma explicação para a cinética deste processo. Quando há grande disponibilidade de oxigênio em solução, a bactéria obtém a energia que necessita para seu crescimento e manutenção por meio do metabolismo oxidativo (ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons). Neste caso, o oxigênio molecular, que é o aceptor final de elétrons nesta via metabólica, participa do processo produção de energia (ATP) e recuperação da coenzima NAD^+ . Entretanto, na medida que o oxigênio dissolvido no meio atinge uma concentração próxima a zero, as quantidades de ATP e NAD^+ produzidas pela respiração se tornam limitadas. Assim, para obtenção da energia necessária ao crescimento e para manter o balanço $NAD^+/NADH$, as células utilizam, também, a via fermentativa que gera, entre outros produtos, 2,3-butanodiol. Como o rendimento em ATP é muito menor na via glicolítica que na via oxidativa, e como uma grande parcela de substrato é direcionada para a formação de butanodiol na fermentação, o rendimento em células será também menor sob condições de limitação de oxigênio²⁴.

O efeito conjunto das duas variáveis, concentração inicial de substrato e suprimento de oxigênio, fica claramente evidenciado em trabalho de SILVEIRA *et alii*⁶². Os autores demonstraram que uma baixa transferência de O₂ para o meio, associada a uma concentração elevada de sacarose (200 g/L), favorece a conversão em produtos, sendo possível obter Y_{p/s} próximos ao máximo teórico. Quando concentrações de açúcar de 40 ou 200 g/L e alta transferência de O₂ foram utilizadas, uma maior massa celular foi obtida, resultando numa redução significativa do tempo de fermentação. Desta forma, um aumento de cerca de 50% foi observado na produtividade

II.4.5 Concentração de 2,3-butanodiol

Poucos trabalhos discutem o efeito da concentração de 2,3-butanodiol sobre os resultados da fermentação butileno-glicólica. Sabe-se que elevadas concentrações do produto são necessárias para viabilizar, economicamente, a recuperação do produto do meio de fermentação. Porém, tais concentrações são obtidas a partir de concentrações de açúcar também elevadas, normalmente inibidoras para o cultivo. Em batelada alimentada, onde o problema da inibição é contornado (item II.5), concentrações de diol de até 113 g/L⁸⁵ foram obtidas.

SABLAYROLLES & GOMA⁵⁸ afirmam que a concentração de 2,3-butanodiol exerce uma grande influência sobre o crescimento de *K. pneumoniae* mas, por outro lado, afeta muito pouco as velocidades específicas de formação do próprio produto. Os autores relacionaram os valores das velocidades específicas de crescimento (μ_x) e formação de produto (μ_p) com concentrações crescentes de butanodiol. Os máximos valores de μ_x foram alcançados com concentrações de butanodiol muito baixas (< 1 g/L), decrescendo rapidamente a medida em que estes níveis eram aumentados. Por outro lado, com concentrações de 0 a 80 g/L de butanodiol, μ_p se manteve inalterado. Resultados semelhantes foram obtidos por RAMACHANDRAN *et alii*⁵⁵, em fermentações com lactose.

Em experimentos conduzidos em frascos agitados, JANSEN *et alii*²³ verificaram que a velocidade específica de crescimento de *K. pneumoniae* decresceu linearmente com o aumento da concentração de butanodiol no meio e que o crescimento celular foi paralisado quando a concentração deste diol era maior que 65 g/L. Neste trabalho, concentrações crescentes de butanodiol foram adicionadas ao meio de cultivo contendo 80 g/L de xilose no início da fermentação. Em ensaios realizados em fermentador, em regime de batelada alimentada nos quais concentrações de diol da ordem de 60 g/L foram obtidas, os autores verificaram um comportamento similar. O efeito da concentração de diol sobre as velocidades de formação do produto não foram reportadas.

SILVEIRA⁶⁴ verificou que em fermentações em batelada alimentada, com sacarose como substrato, concentrações de butanodiol/acetoína de até 60 g/L não exerceram influência sobre μ_p . Concentrações finais de 94 g/L da mistura diol/acetoína foram obtidas neste trabalho.

II.4.6 Meios de cultivo

De uma maneira geral, *Klebsiella pneumoniae* (*Aerobacter aerogenes*) é uma bactéria pouco exigente em termos nutricionais, podendo crescer relativamente bem em meios sintéticos contendo apenas açúcar e sais minerais^{28,34}. No entanto, o enriquecimento do meio de cultivo com diferentes fontes orgânicas de nutrientes tem demonstrado afetar, muitas vezes, os resultados da fermentação butileno-glicólica^{3,84}.

Segundo MAGEE & KOSARIC³⁵, o meio de cultivo para a produção de butanodiol deve incluir, além de uma fonte de carbono e nitrogênio, elementos-traço e fatores de crescimento. Em grande parte das pesquisas envolvendo a obtenção de butanodiol por *K. pneumoniae*, foram utilizados meios de cultivo de composição química definida, contendo um ou mais tipos de açúcar, sais de fosfato e amônio e vários elementos-traço. São exemplos os meios empregados por PIRT & CALLOW⁴⁶ e JANSEN *et alii*²³ em que sacarose e xilose, respectivamente, foram utilizadas como substrato em presença de sulfato

de amônio, fosfato de potássio e traços de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} . Meios semelhantes foram utilizados por diversos pesquisadores em processos com a mesma bactéria^{10,53,55,58,63}.

De acordo com LONG & PATRICK³⁴, a deficiência mais comum nas matérias-primas naturais empregadas na fermentação butileno-glicólica está no conteúdo de nitrogênio. Esta deficiência pode ser inerente à matéria-prima ou originar-se de perdas ocorridas durante o processo de pré-tratamento, normalmente necessário ao preparo do material para a fermentação. Para suprir esta necessidade, compostos nitrogenados como extrato de levedura, uréia, peptona, entre outros, têm sido utilizados na composição de meios de cultivo para esta fermentação^{2,3,44}.

Na fermentação em batelada de melaço de cana-de-açúcar por *Klebsiella oxytoca* DSM 3539, AFSCHAR *et alii*² obtiveram os seguintes resultados: 200 g/L de carboidratos foram convertidos em 100 g/L de butanodiol e 1,8 g/L de acetoina, com um rendimento de 0,5 g/g e uma produtividade de 2,4 g/Lh. Neste trabalho, o meio foi preparado com melaço invertido, fosfato dibásico de potássio, extrato de levedura e triptona.

YU & SADDLER⁸⁴ verificaram que a utilização de extrato de levedura, sulfato de amônio e uréia, como fontes suplementares de nitrogênio, levaram a um aumento nos rendimentos em butanodiol, na fermentação de glicose ou xilose (40 g/L) por *K. pneumoniae* (*Aerobacter aerogenes*) NRRL B199 (ATCC 8724), em condições de limitação de oxigênio.

Segundo alguns autores^{34,35}, o elevado custo do extrato de levedura inviabiliza sua utilização em processos industriais. A uréia, de custo inferior, foi utilizada na suplementação de substratos como hidrolisados ácidos de amido^{3,44} e madeira^{20,45}, em fermentações com a bactéria *A. aerogenes* NRRL B199. OLSON & JOHNSON⁴⁴, utilizando um meio simples, com glicose, uréia, sulfato de magnésio e fosfato monobásico de potássio, obtiveram concentrações de butanodiol da ordem de 100 g/L.

WARD *et alii*⁷⁷ obtiveram bons rendimentos em diol na fermentação de hidrolisado ácido de milho e trigo, suplementado com sulfato de magnésio, fosfato de potássio e uréia, por *A. aerogenes* NRRL B199. A adição de íons cobre, na forma de $CuSO_4$, em

concentrações de 0,01, 0,1 e 1,0 ppm, resultou em um aumento no rendimento, enquanto a utilização de íons manganês, cobalto e molibdênio provocou um efeito inverso. A adição de fatores de crescimento (biotina, inositol, piridoxina, riboflavina, tiamina, pantotenato de sódio e ácidos nicotínico e *p*-aminobenzóico) não alteraram, por outro lado, os resultados da fermentação.

II.4.7 Tratamento do caldo de cana-de-açúcar

Entre os artigos consultados nesta revisão, não são encontradas publicações em que caldo de cana-de-açúcar, matéria-prima utilizada neste trabalho, tenha sido para utilizada para estudos da fermentação butileno-glicólica. Na produção de etanol por leveduras, onde é largamente empregado, o caldo de cana é normalmente suplementado com fontes de nitrogênio e fósforo³².

A utilização eficiente de caldo de cana-de-açúcar, em processos fermentativos requer tratamentos prévios para a remoção de impurezas e substâncias dissolvidas, como bagacilhos, argila, colóides, ceras, gomas e outros compostos que poderiam agir como inibidores do crescimento microbiano ou prejudicar alguma etapa do processo como, por exemplo, a recuperação do produto³². Neste caso, buscam-se métodos que promovam a precipitação das substâncias indesejáveis que são, então, removidas do caldo por centrifugação ou outro processo de separação.

A remoção de sólidos na matéria-prima a ser fermentada, é especialmente importante na produção de 2,3-butanodiol por *K. pneumoniae*. Esta bactéria é pouco osmotolerante, o que significa que seu crescimento é afetado por concentrações elevadas de solutos no meio⁶⁰. O aumento da concentração de sólidos dissolvidos, segundo JANSEN *et alii*²³, levam à redução da velocidade específica de crescimento desta bactéria devido à diminuição da atividade de água (A_w) no meio, conforme descrito no item II.4.3.

Adicionalmente, segundo LIMA *et alii*³² e OLIVEIRA *et alii*⁴³, a prévia clarificação do caldo leva a um menor consumo de antiespumante durante a fermentação, o que pode ser explicado pela remoção de compostos nitrogenados responsáveis pela formação de espuma.

Normalmente, o tratamento de caldo de cana inclui o seu aquecimento e a adição de leite de cal (óxido de cálcio), associados a processos de decantação e filtração para separação de substâncias insolúveis^{32,43}. Na presença de CaO, sais de cálcio, cuja solubilidade é muito baixa, são formados, e ao serem removidos carregam sólidos em suspensão e partículas finas⁵⁶.

II.5 Formas de condução do processo fermentativo

Diferentes formas de condução de processo foram utilizadas no estudo da fermentação butileno-glicólica. Entretanto, a batelada ou descontínuo, tem sido a condição operacional escolhida na maior parte dos trabalhos.

Neste caso, para obtenção de altas concentrações de produto, o sistema deve ser operado sob limitação de oxigênio e com elevadas concentrações iniciais de substrato, como foi discutido nos itens II.4.2 e II.4.3. A inibição do crescimento celular, causada pela alta concentração de açúcar, leva, no entanto, a baixas velocidades de conversão, afetando as produtividades. Com concentrações de substrato intermediárias, aproximadamente 100 g/L, é possível melhorar a produtividade, mantendo-se altos os rendimentos da fermentação. Esta alternativa, entretanto, resulta em concentrações finais de produto relativamente baixas, o que se constitui em um inconveniente para a recuperação.

Os trabalhos de SABLAYROLLES & GOMA⁵⁸ e SILVEIRA⁶⁴ ilustram esta afirmação. Concentrações finais de diol da ordem de 80 g/L e rendimentos próximos ao máximo teórico foram obtidos a partir de concentrações de glicose e sacarose,

respectivamente, em torno de 200 g/L. A produtividade alcançada, nos dois casos, ficou em torno de 1 g/Lh. Quando concentrações de açúcar próximas a 100 g/L foram empregadas, os rendimentos se mantiveram altos e as produtividades tiveram um aumento significativo: 100%, no caso do trabalho de SABLAYROLLES & GOMA⁵⁸, e 35% no trabalho de SILVEIRA⁶⁴.

Concentrações finais de produto mais elevadas foram obtidas em fermentações conduzidas em regime de batelada alimentada, enquanto que as melhores produtividades foram alcançadas em processos de fermentação contínua.

Utilizando glicose como substrato, em processo realizado em batelada alimentada com adição lenta de solução concentrada de açúcar, OLSON & JOHNSON⁴⁶ obtiveram 99 g/L de butanodiol. O rendimento, em relação ao máximo teórico, foi de 88% e a produtividade de 1,0 g/Lh. YU & SADDLER⁸⁵, empregando o mesmo açúcar e o mesmo processo, conseguiram concentrações ainda mais altas e melhor rendimento em produto: 113 g/L de butanodiol e 94% de rendimento. A produtividade foi, no entanto, mais baixa (0,74 g/Lh). O reator era, neste caso, alimentado diariamente com solução concentrada de açúcar e nutrientes.

Em sistema contínuo simples, PIRT & CALLOW⁴⁶ verificaram produtividades acima de 3,0 g/Lh, embora a concentração de produto no efluente tenha sido baixa (29,8 g/L). Operando o sistema com dois reatores em série, no entanto, os autores obtiveram concentrações de produto em torno de 70 g/L⁴⁷.

A maior produtividade citada na literatura, 9,8 g/Lh, foi obtida por RAMACHANDRAN & GOMA⁵⁴ em processo contínuo com reciclo total de células por ultrafiltração.

A Tabela II.5.1 apresenta um resumo dos resultados obtidos em trabalhos nos quais foram utilizados diferentes formas de condução de processo para a obtenção de 2,3-butanodiol por *K. pneumoniae*. A cepa NRRL B199 (ATCC 8724) foi utilizada na grande maioria dos casos.

Tabela II.5.1 - Alguns resultados descritos na literatura para a fermentação butileno-glicólica por *Klebsiella pneumoniae*.

Modo de Operação	Substrato ou Matéria-Prima (g/L)	2,3-butanodiol (g/L)	$Y_{P/S}$	Produtividade (g/Lh)	Referências
batelada	glicose	88	0,45	1,10	SABLAYROLLES & GOMA ³⁸
batelada	sacarose	84	0,41	1,05	SILVEIRA ⁶⁴
batelada	xilose	29,6	0,30	1,35	JANSEN <i>et alii</i> ²³
batelada	lactose	32,5	0,21	0,86	RAMACHANDRAN <i>et alii</i> ⁵⁵
batelada	melaço	96	0,5	1,10	AFSCHAR <i>et alii</i> ²
batelada	hidrol. madeira	19,1	0,48	-	FRAZER & McCASKEY ¹⁶
batelada alimentada	glicose	99	0,37	0,92	OLSON & JOHNSON ⁴⁴
batelada alimentada	glicose	226	0,46	0,50	YU & SADDLER ⁸⁵
batelada alimentada	sacarose	230	0,35	2,63	SILVEIRA ⁶⁴
batelada alimentada	xilose	190	0,50	0,50	YU & SADDLER ⁸⁵
contínuo	sacarose	100	0,32	3,28	PIRT & CALLOW ⁴⁶
contínuo (2 estágios)	sacarose	140	0,48	2,58	PIRT & CALLOW ⁴⁷
contínuo c/ reciclo	glicose	100	0,43	9,84	RAMACHANDRAN & GOMA ⁵⁴

II.6 Recuperação do Produto

A separação do 2,3-butanodiol do meio de fermentação e sua subsequente purificação são um dos principais problemas associados à sua produção em escala industrial^{28,3,49}. O elevado ponto de ebulição dos isômeros, aproximadamente 180°C, dificulta a recuperação pelo processo convencional de destilação, conforme descrito no item II.1. O produto se acumula na base da coluna e, desta forma, toda a fração líquida do meio tem que ser evaporada várias vezes, tornando o processo muito dispendioso^{3,28}.

Em sua revisão, LEDINGHAM & NEISH²⁸ citam alguns métodos alternativos à destilação para a separação do 2,3-butanodiol de meios fermentados. Entre estes estão a conversão química do diol e a sua extração com emprego de solventes. No primeiro caso, destacam-se as propostas de SENKUS⁶¹ e TINK⁷⁰, que propõem a conversão do diol em formal e butiral, usando formaldeído e butiraldeído, respectivamente. Estes compostos são, então, retirados do meio por destilação. A extração com solvente, que permite a separação seletiva do diol de soluções diluídas contendo açúcares e proteínas, foi utilizada com sucesso por vários pesquisadores em escala laboratorial. Solventes como éter dietílico, álcool n-butílico, acetona e dioxano foram empregados como agentes de extração^{34,35}.

O método de arraste pelo vapor, proposto por BLOM *et alii*⁶ foi considerado por alguns autores como um dos mais promissores, sob o ponto de vista prático^{28,34,35}, chegando a ser testado em escala piloto. Com este processo, BLOM *et alii*⁶ obtiveram 95 % de recuperação de butanodiol de meios à base de amido de milho e trigo fermentados. Antes de entrar na coluna, o meio foi concentrado a 13,8 % de diol e 30 % de sólidos em um evaporador.

AFSCHAR *et alii*³ propuseram um método para recuperação de 2,3-butanodiol utilizando a técnica de "salting-out". Os autores fizeram uma série de experimentos em que investigaram o efeito de diferentes sais na separação do diol de melaço e hidrolisado amiláceo fermentados por *K. pneumoniae*. Os melhores resultados foram obtidos com carbonato de potássio desidratado (K₂CO₃), um sal altamente solúvel em água e, por outro lado, com baixa solubilidade em dióis. Após a dissolução do sal e aquecimento do meio a 40°C, duas fases distintas se formam: uma contendo o diol (fase superior) e outra

contendo água e o sal (fase inferior). Por este método, a adição de 53% (p/p) de K_2CO_3 ao meio de melaço fermentado, livre de células e previamente clarificado, permitiu a recuperação de 94% do diol presente. A concentração do diol na solução obtida foi de 97% (p/p). Resultados muito semelhantes foram alcançados na separação do diol de meio preparado com hidrolisado de amido e adição de 56% do sal.

Recentemente, QURESHI *et alii*⁵⁰ publicaram um trabalho no qual avaliam o processo de destilação à vácuo com membrana, para separação e concentração de 2,3-butanodiol. O método consiste na utilização de uma membrana hidrofóbica microporosa de PTFE (politetrafluoretileno), sob um gradiente de temperatura, que permite a passagem de vapor d'água enquanto retém o 2,3-butanodiol. Acoplado a um reator operado em regime de batelada alimentada, o sistema permitiu a concentração da solução até 430 g/L de butanodiol. Neste caso, o meio passava, previamente, por membranas de filtração tangencial para a retirada das células.

III OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar o caldo de cana-de-açúcar como matéria-prima para a obtenção de 2,3-butanodiol por via fermentativa, utilizando a bactéria *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199.

Mais especificamente, os seguintes aspectos foram estudados:

- . necessidade de adição de nutrientes ao caldo de cana, para a composição do meio de fermentação, levando-se em conta o crescimento microbiano e a formação do produto;
- . influência da concentração inicial de substrato sobre a cinética e os resultados da fermentação conduzida em regime descontínuo.

IV MATERIAL E MÉTODOS

IV.1 Matéria-Prima

IV.1.1 Obtenção

O caldo de cana-de-açúcar, matéria-prima utilizada neste trabalho para a preparação dos meios de fermentação, foi obtido por moagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*).

Durante a extração, o caldo foi filtrado em peneira comum, para retirada de bagacilhos e impurezas. Todo o volume obtido foi homogeneizado em um tanque previamente higienizado, acondicionado em garrafas plásticas e estocado a -20°C. Uma amostra representativa foi coletada para análise do teor de sacarose e glicose e medida do pH.

A cada ensaio de fermentação, o volume necessário de caldo era descongelado e submetido ao tratamento escolhido nos testes descritos no item IV.1.2 e discutidos em V.1.

IV.1.2 Tratamentos

O caldo de cana-de-açúcar necessitava ser submetido a um tratamento prévio de clarificação visando a remoção de substâncias responsáveis pela sua turbidez e de possíveis inibidores do crescimento microbiano. Os diferentes tratamentos avaliados consistiram, basicamente, na precipitação das substâncias dissolvidas e em suspensão no caldo, pela ação de calor e/ou correção do pH com agentes alcalinizantes. A sequência dos tratamentos testados é descrita a seguir.

Tratamento 1 (T1)

Aquecimento, até fervura, do caldo em seu pH original, seguido de resfriamento à temperatura ambiente e centrifugação.

Tratamento 2 (T2)

Correção do pH do caldo para 6,8 com hidróxido de cálcio, sob agitação suave e constante, seguido de centrifugação. Correção do pH para 6,0 com ácido clorídrico 2N.

Tratamento 3 (T3)

Correção do pH do caldo para 10,5 com hidróxido de cálcio, seguido de aquecimento até fervura, resfriamento à temperatura ambiente e centrifugação. Correção do pH para 6,0 com ácido clorídrico 2N.

Tratamento 4 (T4)

Aquecimento do caldo até fervura, resfriamento à temperatura ambiente e centrifugação. Correção do pH a 6,5 com hidróxido de cálcio e centrifugação. Correção do pH para 6,0 com ácido clorídrico 2N.

Tratamento 5 (T5)

Aquecimento até fervura, resfriamento à temperatura ambiente e centrifugação. Correção do pH para 6,5 com óxido de cálcio e centrifugação. Correção do pH para 6,0 com ácido clorídrico 2N.

Tratamento 6 (T6)

Aquecimento até fervura, resfriamento à temperatura ambiente e centrifugação. Correção do pH para 7,0 com hidróxido de cálcio e centrifugação. Correção do pH para 6,0 com ácido clorídrico 2N.

Tratamento 7 (T7)

Aquecimento até fervura, resfriamento à temperatura ambiente e centrifugação. Correção do pH para 8,0 com hidróxido de cálcio e centrifugação. Correção do pH para 6,0 com ácido clorídrico 2N.

Tratamento 8 (T8)

Aquecimento até fervura, resfriamento à temperatura ambiente e centrifugação. Correção do pH para 9,0 com hidróxido de cálcio e centrifugação. Correção do pH para 6,0 com ácido clorídrico 2N.

Tratamento 9 (T9)

Aquecimento até fervura, resfriamento à temperatura ambiente e centrifugação. Correção do pH para 9,0 com óxido de cálcio e centrifugação. Correção do pH para 6,0 com ácido clorídrico 2N.

Em todos os casos a centrifugação foi feita a 25000 x g por 10 minutos (Centrífuga DUPONT, modelo SORVALL 2C285).

A primeira avaliação dos tratamentos foi feita pela observação da presença ou não de precipitado, após a centrifugação do caldo esterilizado a 121°C por 20 minutos e após a adição de nutrientes do meio de PIRT & CALLOW⁴⁶ (item V.1).

A validade do tratamento escolhido foi também verificada através de um ensaio fermentativo, onde se observou o crescimento microbiano em meio preparado com o caldo tratado. As condições deste ensaio são descritas no item IV.4.1.

IV.2 Microrganismo

Klebsiella pneumoniae NRRL B199, cedida pelo Northern Regional Research Laboratory, EUA, foi o microrganismo utilizado neste trabalho. Esta cepa está também

depositada na American Type Culture Collection, EUA, sob o código ATCC 8724.

Segundo o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*⁸, 8ª edição, este microrganismo foi, anteriormente, classificado como *Aerobacter aerogenes* e *Klebsiella oxytoca*.

IV.2.1 Manutenção da cultura

A viabilidade da cultura era mantida por meio de repicagens mensais, utilizando a técnica de semeadura em superfície de meio sólido (gelose simples).

Células de *K. pneumoniae* eram inoculadas em ágar inclinado em tubos de ensaio e incubados a 37°C por 15-17 horas. Após observação microscópica da morfologia celular, feita pelo exame de esfregaço fixado e corado por coloração diferencial de **Gram**, as culturas eram conservadas a 4°C em refrigerador.

IV.3 Meios de Cultivo

IV.3.1 Gelose simples

O meio de cultivo utilizado para a manutenção da cultura e o preparo do inóculo dos ensaios em frascos agitados, gelose simples, tinha a seguinte composição (g/L):

extrato de carne	3,0
peptona	10,0
Na ₂ HPO ₄	1,0
NaCl	5,0
ágar-ágar	15,0

O meio era esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

IV.3.2 Meios a base de caldo de cana-de-açúcar

Nos ensaios em frascos agitados e em fermentador, incluindo o preparo dos inóculos, foram utilizados meios a base de caldo de cana-de-açúcar pré-tratado (M1 a M14). De acordo com o objetivo de cada ensaio, o caldo era diluído a concentrações convenientes de sacarose (item IV.4) e suplementado com diferentes sais.

O meio de fermentação M1 seguiu a formulação de nutrientes descrita por PIRT & CALLOW⁴⁶ com a seguinte composição (g/L):

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,09
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,023
ZnSO ₄ .4H ₂ O	0,0075
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,0038
EDTA	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,2
(NH ₄) ₂ HPO ₄	6,0

O meio M2 consistia, simplesmente, de caldo de cana tratado e diluído. As demais composições utilizadas (meio M3 a M14) são mostradas na Tabela IV.3.2.1.

Caldo de cana e soluções concentradas de cada sal eram esterilizados separadamente, a 121°C por 15 minutos, e misturados de modo a se obter as composições desejadas.

No caso dos ensaios em frascos agitados e do preparo dos inóculos para fermentador, os meios eram tamponados, em pH 5,5, com ácido 2(N-morfolino)etano-sulfônico (MES)/KOH (0,3M).

Tabela IV.3.2.1 - Concentração de sais nos diferentes meios a base de caldo de cana-de-açúcar.

Meio → ↓ Sal	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,30	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ HPO ₄	6,0	6,0	6,0	1,0	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	5,0	8,0	10,0

IV.4 Ensaios Realizados: condições de cultivo e preparo de inóculos

IV.4.1 Ensaios em frascos agitados

Estes ensaios foram feitos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, vedados com manta de algodão e gaze, contendo 100 mL de meio, em agitador de movimento recíproco (NEW BRUNSWICK INCUBATOR SHAKER modelo 25 D), a 37°C e 120 min⁻¹. Os frascos, em duplicata, eram inoculados por transferência direta (alçada) de células de *K. pneumoniae*, cultivadas em gelose simples por 17 horas a 37°C.

Para compensar a perda de água por evaporação, comum neste tipo de ensaio, adicionava-se ao meio, a cada 24 horas, água deionizada esterilizada. O volume de água a ser adicionado era calculado com base na perda de peso do meio neste período.

Nestas condições, foram realizados três ensaios (S1, S2 e S3), conforme é descrito a seguir.

No Ensaio S1, realizado para a avaliação do tratamento do caldo de cana, foi utilizado o meio M1, com uma concentração inicial de sacarose em torno de 150 g/L. Na interpretação dos resultados foram considerados o consumo de substrato e o crescimento microbiano, ao fim de 48 horas de fermentação.

O Ensaio S2 teve como objetivo verificar, preliminarmente, a influência da adição de nutrientes ao caldo de cana sobre os resultados da fermentação por *K. pneumoniae*. Foram testados um meio rico (M1), caldo de cana não suplementado com nutrientes (M2) e meios contendo fontes de magnésio, fosfato e nitrogênio inorgânico (meios M3, M4 e M5). A concentração inicial de sacarose foi de, aproximadamente, 150 g/L. Neste ensaio foram medidas as concentrações de sacarose, células e produtos (2,3-butanodiol e acetoína) em amostras retiradas com 0, 24 e 48 horas de fermentação.

O efeito de diferentes concentrações iniciais de fosfato de amônio sobre o crescimento celular, o consumo de substrato e a formação de produtos, foi estudado no Ensaio S3. Os meios M5 a M14 foram utilizados. Neste caso, concentrações iniciais de sacarose na faixa de 140 a 150 g/L foram empregadas. As amostras foram retiradas com 0, 10, 24, 34 e 48 horas de fermentação.

IV.4.2 Ensaios em fermentador

Estes ensaios foram realizados em regime descontínuo, utilizando um fermentador B.BRAUN, modelo BIOSTAT MD, composto dos seguintes módulos:

- . unidade básica incluindo as instalações necessárias aos controles de temperatura, pH, nível de espuma, agitação e vazão de gases.
- . vaso de fermentação com cuba de vidro (volume útil de 5 litros) de parede dupla e tampa em aço inoxidável;
- . unidade de controle digital (DCU), incluindo um microprocessador e um programa que permitiam o controle dos parâmetros do processo.

A dispersão de ar, no meio, era feita por um anel perfurado, instalado abaixo da extremidade do eixo central do agitador, a 20 mm do fundo da cuba. Ao longo deste eixo eram instaladas três turbinas de 50 mm de diâmetro, tipo disco com seis lâminas planas, separadas por uma distância de 55 mm.

A cuba do fermentador continha, ainda, um conjunto de 4 chicanas com 10 mm de largura.

Alguns procedimentos de rotina foram adotados na preparação do sistema de fermentação, a cada ensaio. O reator, vazio, com o condensador, filtro de ar e tubulações

de silicone (para retirada de amostras e adições de meio, antiespumante e base) já instalados, era esterilizado a 121°C por 30 minutos.

Antes de ser calibrado, o eletrodo de pH permanecia em água deionizada por algumas horas para sua estabilização.

A sonda para medida de oxigênio dissolvido era ligada à DCU 15-20 horas antes do início do processo, para polarização do eletrodo, e calibrada conforme descrito no item IV.5.4.

Antes de sua instalação no reator, as sondas eram limpas com algodão embebido em álcool etílico a 70% e enxaguadas com água deionizada esterilizada.

O meio era, então, transferido para o vaso de fermentação sob condições assépticas.

Em todos os ensaios em fermentador, utilizou-se 3,5 L de meio, temperatura de 37°C e pH controlado em 5,5 pela adição automática de NaOH 5M. A frequência de agitação e a aeração foram fixadas em 500 min⁻¹ e 0,43 vvm, respectivamente.

O inóculo era preparado com o meio M13, nas mesmas condições utilizadas no ensaio S3 (item IV.4.1), com um tempo de incubação de 24 horas. O volume utilizado para inoculação dos meios era calculado de modo que a concentração celular inicial no reator ficasse em torno de 0,2 g/L.

Sob estas condições foram realizados os Ensaios: P1 a P3 e F1 a F5, nos quais estudou-se o comportamento cinético do processo em meio completo, ou apenas suplementado com fosfato de amônio, com diferentes concentrações iniciais de sacarose.

Nos Ensaios P1 a P3 utilizou-se o meio M13, sendo o caldo de cana diluído a concentrações aproximadas de sacarose de 25 g/L (P2 e P3) e 180 g/L (P1). No segundo grupo, Ensaios F1 a F5, empregou-se o meio M1 e concentrações iniciais de sacarose de, aproximadamente, 25, 60, 100, 150 e 180 g/L. Os experimentos P1 e F1 a F5 foram feitos em duplicata.

IV.5 Métodos Analíticos

IV.5.1 Coleta e preparo de amostras

Nos ensaios em frascos agitados, as amostras eram retiradas assepticamente, em capela de fluxo laminar, com um pipetador automático.

Em fermentador, era utilizado um sistema de amostragem que consistia de um tubo de aço inoxidável, cuja extremidade situava-se próxima do fundo da cuba, conectado a uma mangueira de silicone que, após passagem por uma bomba peristáltica, retornava ao vaso de fermentação. O meio em fermentação era circulado por cerca de três minutos por este sistema a fim de remover resíduos de amostras anteriores. As amostras, em volume de 5 mL, eram retiradas com seringa e agulha descartáveis, através de um septo de silicone adaptado à tubulação.

As amostras eram centrifugadas por 15 minutos a $12.800 \times g$ em centrífuga B.BRAUN modelo SIGMA 3K12, sob refrigeração.

Um dos tubos continha um volume exato de 1,0 mL destinado à determinação da concentração celular. Neste caso, após lavagem e centrifugação das células por duas vezes, as amostras eram convenientemente diluídas em balão volumétrico.

O sobrenadante era conservado sob congelamento para análises posteriores de sacarose e produtos.

IV.5.2 Concentração celular

A concentração celular era quantificada pela medida da absorbância de suspensões diluídas do meio fermentado, convertida em concentração (massa de matéria seca por unidade de volume) por uma equação que descrevia o trecho linear de uma curva de

calibração. As leituras de absorbância eram feitas em espectrofotômetro SHIMADZU modelo UV-160A, a 560 nm.

Para a construção da curva de calibração, utilizou-se uma suspensão de células de *Klebsiella pneumoniae* produzida no meio M1. O procedimento adotado é descrito a seguir:

- 10 mL do meio fermentado, em triplicata, foram centrifugados a 12.800 x g por 15 minutos (Centrífuga B. BRAUN, modelo SIGMA 3K12);
- a massa celular obtida foi ressuspensa em água destilada e centrifugada nas mesmas condições (essa operação foi repetida duas vezes);
- as células foram transferidas para cadinhos de porcelana previamente secos e tarados;
- os cadinhos foram levados à estufa a 90°C por 22 horas, resfriados em dessecador por 30 minutos e pesados em balança analítica;
- os cadinhos foram recolocados na estufa por mais 30 minutos, resfriados e pesados; essa operação foi repetida até peso constante;
- a concentração celular foi, então, calculada dividindo-se a massa seca de células pelo volume de suspensão adicionado aos cadinhos;
- paralelamente, um volume adequado do cultivo foi diluído de modo que a absorbância fosse de, aproximadamente, 0,5 a 560 nm;
- a partir desta suspensão de células, uma série de diluições (1:10 ... 9:10) foi feita;
- a absorbância de cada uma dessas suspensões foi correlacionada com a concentração celular correspondente.

Com os pontos pertencentes ao trecho linear da curva (valores de absorbância entre 0,05 e 0,35, aproximadamente) foi definida, por regressão linear, uma equação a ser utilizada no cálculo da concentração celular. A curva de calibração e a equação obtidas são mostradas no Apêndice A.

Este procedimento foi repetido com outros meios de cultivo, não tendo sido constatadas diferenças significativas entre as equações.

IV.5.3 Concentração de sacarose

A concentração de sacarose era determinada indiretamente, após hidrólise com HCl 2N, pelo método enzimático colorimétrico **Glicose E Enzimática (GOD-POD, CELM)**⁹, específico para dosagem de glicose em líquidos biológicos.

A escolha deste método, em substituição aos métodos colorimétricos normalmente usados para dosagem de açúcares redutores totais (ART), foi feita levando-se em conta a presença de acetoína nas amostras. O caráter redutor deste composto, produzido durante a fermentação, poderia interferir na quantificação da sacarose.

Nesta análise, a glicose é oxidada a ácido glicônico e peróxido de hidrogênio pela enzima glicose-oxidase. O peróxido de hidrogênio reage com 4-aminofenazona e com fenol, em reação catalisada por peroxidase, formando um composto de cor vermelho-cereja (4-(p-benzoquinona-monoimino)fenazona), cuja absorção máxima é medida a 505nm. A intensidade da coloração formada é proporcional à concentração de glicose presente no meio⁹.

Na adaptação deste método, levou-se em conta a estequiometria da reação de hidrólise da sacarose. Para cada mol do dissacarídeo hidrolisado, um mol de glicose é formado. Assim, a coloração resultante da reação enzimática da glicose, na análise de soluções pré-hidrolisadas de sacarose, é proporcional à concentração de sacarose presente na amostra.

A hidrólise da sacarose era feita de acordo com a metodologia descrita por SILVEIRA⁶⁴, com algumas modificações. O procedimento tinha a seguinte sequência:

- a 1,0 mL da amostra, previamente diluída, acrescentava-se 2,0 ml de HCl 2N;
- aquecia-se a 60-70°C por 15 minutos, em banho termostático;

- resfriava-se à temperatura ambiente e adicionava-se 5,0 mL de NaOH 1N, para neutralização;
- transferia-se todo o volume para um balão volumétrico apropriado, segundo a diluição final desejada.

O procedimento analítico seguia as recomendações do fabricante⁹, com adaptações nos volumes da amostra e do reativo. As seguintes etapas eram seguidas:

- a 1,0 mL da amostra previamente hidrolisada adicionava-se 1,0 mL da solução reativa, em tubo de ensaio;
- incubava-se a 37°C por 15 minutos;
- media-se a absorbância da solução, tendo como referência um "branco" preparado da mesma forma e utilizando água no lugar da amostra.

As medidas de absorbância eram feitas a 505nm, em espectrofotômetro SHIMADZU modelo UV 160-A.

A concentração de sacarose era calculada por meio de equações que descreviam curvas de calibração correlacionando a absorbância com a concentração do açúcar na solução. As curvas eram obtidas após a análise de soluções de concentrações de sacarose de, aproximadamente, 10, 20, 30 e 40 mg/L. No preparo das soluções, utilizou-se sacarose p.a. (MERCK), previamente seca em estufa a 60°C por uma hora. Um exemplo de curva de calibração é mostrada no Apêndice A.

IV.5.4 Concentração de produtos da fermentação

As concentrações de 2,3-butanodiol e acetoína foram determinadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), em cromatógrafo MERCK-HITACHI com os seguintes componentes:

- . injetor automático de amostras (AS-2000 AUTOSAMPLER)
- . bomba para fase móvel (L-6200 INTELLIGENT PUMP)
- . interface cromatógrafo-computador (D-6000 INTERFACE)
- . forno para coluna cromatográfica (T-6300 COLUMN THERMOSTAT)
- . degaseificador da fase líquida (por injeção de gás hélio)

Ao sistema eram acoplados, ainda, um detetor de índice de refração (DETECTOR ERC-7515-A, ERMA CR. INC.) e um microcomputador que, através de um programa de análise e quantificação (D-6000 SOFTWARE, MERCK-HITACHI), permitia a apresentação gráfica dos picos e o cálculo das concentrações das substâncias analisadas.

As condições de operação eram as seguintes:

- . coluna - HAMILTON PRP-X300
- . temperatura - 50°C
- . eluente - água ultra-pura degaseificada
- . fluxo do eluente - 0,8 mL/min
- . volume de amostra - 20 μ L

Uma curva de calibração era previamente obtida pela análise de soluções com concentrações de 2,3-butanodiol de, aproximadamente, 0,25, 0,5, 1,5, 3,0, 4,0 e 5,0 g/L e, de acetofina de, aproximadamente, 0,1, 0,3, 0,8, 1,5, 2,0 e 2,5 g/L. Os padrões foram preparados com substâncias p.a. (2,3-butanodiol, FLUKA; acetofina, MERCK). As curvas de calibração são apresentadas no Apêndice A.

Apesar da coluna utilizada separar também etanol, a formação deste composto não foi considerada na discussão deste trabalho.

IV.5.5 Concentração de oxigênio dissolvido

A medida do oxigênio dissolvido no meio de fermentação era feita com um eletrodo polarográfico esterilizável (INGOLD).

Este eletrodo consiste de um anodo de prata/cloreto de prata e um catodo de platina, separados do meio por uma membrana de teflon/silicone permeável ao oxigênio e conectados condutimetricamente por solução eletrolítica de KCl.

Neste caso, sob uma voltagem adequada de polarização, o oxigênio se difunde através da membrana em direção ao catodo, onde será reduzido. Produz-se, então, uma corrente elétrica que é diretamente proporcional à pressão parcial de oxigênio no meio. As seguintes reações estão envolvidas:

A calibração do eletrodo era feita no próprio meio de cultivo, momentos antes da inoculação.

Após a estabilização da temperatura com o meio sob agitação, introduzia-se nitrogênio no vaso de fermentação até um valor constante e muito próximo de 0% de oxigênio. Este valor era, então, fixado através da unidade de controle do fermentador (DCU). Em seguida, nas mesmas condições, aerava-se o meio até sua saturação em oxigênio, indicada por um valor constante e próximo a 100%. Da mesma forma, este valor era fixado pela DCU em 100% da saturação.

Deste modo, durante as fermentações, eram obtidos valores que expressavam uma percentagem da concentração de saturação de oxigênio no meio, nas condições de operação em uso.

A metodologia de cálculo da concentração de saturação de oxigênio nos diferentes meios de cultivo empregados, está descrita no item IV.6.3.

IV.6 Metodologia Utilizada nos Cálculos

IV.6.1 Fatores de conversão, rendimentos e produtividade

No cálculo dos rendimentos, dos fatores de conversão de substrato em produtos e da produtividade, as concentrações de 2,3-butanodiol e acetoína foram somadas, levando-se em conta o equilíbrio bioquímico existente entre estes produtos durante o processo. Em qualquer das condições de operação utilizadas neste trabalho, houve uma ampla predominância de 2,3-butanodiol sobre acetoína. Assim, na discussão dos resultados considerou-se todo o produto formado como sendo 2,3-butanodiol.

Os fatores de conversão foram assim calculados:

. sacarose em células

$$Y_{X/S} = (X_f - X_0)/(S_0 - S_f)$$

. sacarose em produto

$$Y_{P/S} = (P_f - P_0)/(S_0 - S_f)$$

Onde:

X_0 , S_0 e P_0 - concentração inicial de células, sacarose e produto (g/L);

X_f , S_f e P_f - concentração final de células, sacarose e produto (g/L).

Estequiometricamente, na fermentação de sacarose por *K. pneumoniae*, 2 moles de 2,3-butanodiol (2x90 g/mol) são formados por mol de carboidrato (342 g/mol). Assim, a conversão teórica máxima é de 0,526 grama do produto por grama de sacarose. O

rendimento da fermentação (R), expresso em percentagem era, então, calculado, da seguinte maneira:

$$R = (Y_{p/s}/0,526).100$$

O cálculo da produtividade foi feito utilizando-se a fórmula:

$$p = (P_f - P_0)/t$$

onde:

p - produtividade (g/Lh);

t - tempo de fermentação (h).

Conforme observado em experiências anteriores com este tipo de processo⁶⁴, o final da fermentação podia ser estimado com maior precisão por meio da curva de variação da concentração de sacarose com o tempo. Nos instantes finais do processo, os valores, na curva, formavam um segmento de reta com o qual era possível estabelecer uma equação de primeiro grau e determinar o tempo em que ocorreu o esgotamento do substrato. Assim, o valor de X ou P, a ser considerado nos cálculos, era retirado das respectivas curvas de variação da concentração com o tempo, no instante definido como o final da fermentação.

IV.6.2 Velocidades específicas

As velocidades instantâneas de crescimento (dX/dt), consumo de substrato (dS/dt) e de formação de produtos (dP/dt) foram calculadas pelo método proposto por LE DUY & ZAJIC²⁷. Esses valores, divididos pela concentração celular no mesmo instante,

forneciam as velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de formação de produtos (μ_p).

Os valores das concentrações de células, substrato e produto utilizados nos cálculos das velocidades eram retirados das curvas (concentrações em função do tempo) que melhor se ajustavam aos pontos experimentais.

As máximas velocidades específicas de crescimento ($\mu_{x,m}$) foram calculadas a partir do gráfico que correlacionava o logaritmo neperiano das concentrações celulares com os respectivos tempos de fermentação. A existência de um trecho de reta, com a maior inclinação, indicava a ocorrência de uma fase exponencial de crescimento celular. O coeficiente angular desta reta representava o próprio valor de $\mu_{x,m}$.

IV.6.3 Concentração de oxigênio na saturação

O cálculo da concentração de oxigênio na saturação nos meios de cultivo, aplicado aos ensaios em fermentador, foi feito segundo o modelo proposto por SCHUMPE & QUICKER⁵⁹. Neste modelo, é considerado o efeito das diferentes substâncias dissolvidas no líquido. A seguinte fórmula era utilizada:

$$\log (C_{0,s}/C_s) = \Sigma H_i I_i + \Sigma K_j C_j$$

onde:

$C_{0,s}$ = concentração de oxigênio na saturação, em água (mmol/L)

C_s = concentração de oxigênio na saturação, no meio (mmol/L)

H_i = parâmetro que define a influência do íon sobre a solubilidade do oxigênio no meio (mol/L)

I_i = força iônica do íon (mol/L)

K_j = parâmetro que define a influência de substâncias não eletrolíticas sobre a solubilidade do oxigênio (L/g)

C_j = concentração da substância não-eletrolítica (g/L)

H_i e K_j têm valores tabelados enquanto I_i é calculado da seguinte forma:

$$I_i = 0,5.n.C_i.z_i^2$$

onde:

C_i = concentração do íon (mol/L)

z_i = carga do íon

n = número de unidades do íon na substância

O cálculo da concentração de saturação de oxigênio no meio M1 é mostrada, como exemplo, no Apêndice B.

IV.6.4 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) inicial foi estimado pelo método estático, descrito por MOO-YOUNG & BLANCH³⁷, que prevê a utilização do meio de cultivo sem células e de um eletrodo polarográfico para medida de oxigênio dissolvido.

A medida é feita no próprio reator, nas condições de operação previstas para a fermentação, após a calibração do eletrodo.

Primeiramente, injeta-se nitrogênio no meio, sob agitação, até que a concentração de oxigênio dissolvido (C) seja reduzida a zero. Em seguida, o sistema é aerado e C é medida, conforme descrito em IV.5.4. A transferência de oxigênio para o meio pode ser descrita pela equação:

$$dC/dt = K_La.(C_s - C)$$

onde:

dC/dt - variação da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo;

C_s - concentração de oxigênio dissolvido na saturação no meio

Integrando a equação (1), com limites de C entre $\alpha.C_s$ e $\beta.C_s$, e de t entre 0 e t , teremos:

$$\ln [(1-\beta)/(1-\alpha)] = - K_L a \cdot t \quad 2$$

onde, α e β são percentagens da concentração de saturação em oxigênio, registradas pelo aparelho.

A inclinação da reta média, na correlação de $\ln [(1-\beta)/(1-\alpha)]$ com o tempo, é numericamente igual a " $- K_L a$ ".

Neste trabalho, o valor de α foi fixado em 10% da saturação ($0,1.C_s$) e o valor máximo de β em 80% da saturação ($0,8.C_s$).

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas contendo os dados experimentais dos ensaios de fermentação encontram-se no Apêndice C. As figuras respectivas são mostradas no final da discussão do item correspondente.

V.1 Tratamento do Caldo de Cana-de-Açúcar

Neste trabalho foram avaliados diferentes tratamentos de clarificação do caldo, baseados na variação da temperatura e do pH do meio, cujo valor original era de 5,5, conforme descrito no item IV.1.2. A avaliação dos tratamentos foi feita pela observação da presença ou não de precipitado após a centrifugação do caldo esterilizado e seu enriquecimento com os nutrientes do meio completo (M1).

O objetivo dos tratamentos era remover possíveis inibidores do crescimento bacteriano e sólidos em suspensão que poderiam trazer problemas em alguma etapa do processo (item II.4.7). Além disto, a clarificação do caldo permite, principalmente em trabalhos de pesquisa, o acompanhamento do crescimento celular por turbidimetria ou por peso seco, uma vez que apenas células, e não outros sólidos, estarão em suspensão no meio no decorrer do processo. Isto representa uma vantagem, por exemplo, em relação ao método de contagem de células em placas, extremamente trabalhoso e, muitas vezes utilizado como única alternativa na análise da concentração celular em processos fermentativos que empregam resíduos agro-industriais ou matérias-primas naturais.

A escolha dos métodos testados foi baseada em relatos da literatura referentes a tratamentos empregados para clarificação de caldo de cana-de-açúcar destinado à produção de açúcar e etanol^{32,43} e de outras matérias-primas como hidrolisados de madeira¹⁶ e de bagaço de cana^{19,56,74} utilizados em diferentes processos fermentativos.

Os resultados obtidos nos tratamentos são mostrados na Tabela V.1.1.

Os tratamentos T1 a T7 não foram efetivos para clarificação do caldo. O simples tratamento térmico da matéria-prima (T1) possibilitou a precipitação de apenas parte dos sólidos dissolvidos e o meio apresentou alta turbidez após a centrifugação. A correção do pH com hidróxido de cálcio para 6,8 (T2) ou 10,5 (T3), antes da fervura, resultou numa ligeira melhora do tratamento, não sendo, porém, suficiente para que fosse alcançada uma completa clarificação.

Tabela V.1.1 - Resultados obtidos nos diferentes tratamentos para clarificação do caldo de cana-de-açúcar.

Tratamento	Clarificação
T1	- -
T2	-
T3	-
T4	-
T5	-
T6	-
T7	+ +
T8	+ + +
T9	+ + +

- - intensa formação de precipitado

- média formação de precipitado

+ + pequena formação de precipitado

+ + + nenhuma formação de precipitado

A adição de hidróxido ou óxido de cálcio ao caldo previamente fervido e centrifugado, em quantidades suficientes para obtenção de valores de pH próximos à neutralidade (T4 e T5) ou neutro (T6), implicou em resultados semelhantes aos de T2 e T3. Adotando-se o mesmo procedimento, com o emprego, porém, de maiores quantidades

de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou CaO , melhores resultados foram alcançados. A elevação do pH até 8,0 com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (T7) levou a uma sensível redução na formação de precipitados ao final do tratamento. Finalmente, a correção do pH a 9,0 (T8 e T9) implicou numa efetiva clarificação do caldo. Neste caso, não foi observado qualquer depósito de sólidos ao fim da última etapa do tratamento. Da mesma forma, não houve precipitação de materiais após a esterilização do caldo tratado ou após a adição dos nutrientes do meio completo (M1).

Embora não tenha havido diferença entre os resultados obtidos com a utilização de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou CaO , tratamentos T8 e T9, respectivamente, o primeiro deles foi escolhido para a continuação dos testes de clarificação. A escolha se deveu ao menor consumo de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para a elevação do pH, comparado ao CaO , o que implicaria em um menor custo do tratamento e na manipulação de um menor volume de lodo quando se utilizasse este agente alcalinizante.

Para comprovar a validade do tratamento escolhido, foi realizado um ensaio de fermentação em frascos agitados (Ensaio S1), no qual avaliou-se o crescimento microbiano em meio preparado com caldo tratado e suplementado com nutrientes (meio M1). Os resultados são mostrados na Tabela V.1.2 e na Figura V.1.1.

Tabela V.1.2 - Resultados gerais da fermentação de caldo de cana-de-açúcar submetido ao tratamento T8, após 48 horas. Ensaio S1 (meio M1; agitação recíproca a 120 min^{-1}).

ΔS (g/L)	ΔX (g/L)	ΔP (g/L)	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	R (%)
150,7	9,3	60,7	0,062	0,40	76,0

Após 48 horas, a massa celular formada (9,3 g/L) levou à produção de 60,7 g/L de produto, o que representa um rendimento de 76,0% em relação ao máximo teórico ($Y_{P/S} = 0,40$).

A capacidade de *Klebsiella pneumoniae* de se desenvolver com facilidade neste meio, indica que o caldo submetido ao tratamento T8 é uma matéria-prima adequada para a produção de 2,3-butanodiol por este microrganismo. Este tratamento foi, então, adotado no preparo de todos os meios empregados nos demais ensaios deste trabalho.

Figura V.1.1 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol (P) [B], em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M1). Ensaio S1 (agitação recíproca a 120 min^{-1}).

V.2 Definição da Composição do Meio de Fermentação

No preparo do meio de cultivo utilizado nos experimentos de clarificação (Ensaio S1), o caldo foi suplementado com sais e micronutrientes (meio M1), tendo o processo sido conduzido em um meio rico com condições nutricionais favoráveis ao crescimento microbiano.

Para comprovar a necessidade de enriquecimento do caldo e, por outro lado, verificar a possibilidade de emprego de um meio mais simples e de menor custo, visando a obtenção de resultados semelhantes, foram realizados dois ensaios em frascos agitados (S1 e S2), com diferentes formulações de meio.

V.2.1 Avaliação de diferentes formulações de meio a base de caldo de cana-de-açúcar

No Ensaio S2 foi avaliado o desenvolvimento da bactéria, em meios preparados com o caldo tratado e diluído, com uma concentração inicial de açúcar de aproximadamente 150 g/L. Foram empregados o caldo sem qualquer fonte adicional de nutrientes (meio M2) e o meio rico (M1), usados como controle. Além destes, meios contendo fontes de fósforo, enxofre, nitrogênio inorgânico e magnésio (M3, M4 e M5), foram testados. As concentrações dos sais utilizados na suplementação do caldo foram as mesmas do meio sintético proposto por PIRT & CALLOW⁴⁶ (item IV.3.2 e Tabela IV.3.2).

A formulação proposta por PIRT & CALLOW⁴⁶ foi empregada por outros grupos de pesquisa em estudos da fermentação butileno-glicólica por *K. pneumoniae*, revelando ser este um meio apropriado para o cultivo desta bactéria^{58,63}. Trata-se de um meio rico em nitrogênio, fósforo, íons metálicos e vários micronutrientes.

O caldo de cana-de-açúcar, ao contrário, é uma matéria-prima pobre em nitrogênio e fósforo, sendo normalmente necessária a correção da concentração destes elementos no meio a ser empregado na fermentação. Além disto, o fósforo (na forma de fosfato) é

normalmente removido junto com a torta resultante da clarificação da matéria-prima, quando se emprega agentes alcalinizantes como CaO ou Ca(OH)_2 ³². A composição do caldo apresenta, ainda, um teor de magnésio muito inferior àquele previsto no meio M1. Com relação aos micronutrientes preconizados por PIRT & CALLOW⁴⁶ (sais de Fe^{++} , Zn^{++} e Mn^{++}), não fica claro, pela literatura consultada³², se o caldo de cana contém os teores necessários para o desenvolvimento de *K. pneumoniae*.

A escolha das formulações a serem estudadas neste trabalho foi feita levando-se em conta estas informações.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela V.2.1.1 e nas Figuras V.2.1.1 a V.2.1.5.

Observa-se que o caldo de cana não suplementado com nutrientes (meio M2) não é adequado para este processo. Após 48 horas de fermentação, o consumo de açúcar foi de, apenas, 8% do inicial, o que resultou em baixíssimas concentrações de células e produto. Os demais meios, ao contrário, permitiram um bom desenvolvimento da bactéria confirmando a necessidade de suplementação do caldo.

O crescimento celular foi amplamente favorecido com o meio M1, resultando em um fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S} = 0,065$) superior aos alcançados com os outros meios.

Com o meio M3, a falta dos micronutrientes resultou em um decréscimo do crescimento celular e da formação de produtos.

A comparação dos resultados obtidos com os meios M1, M4 e M5 demonstra que $Y_{X/S}$ decresce à medida que se diminui a concentração de nitrogênio no meio, não sendo observados efeitos significativos sobre os fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$).

A adição de uma fonte de íons Mg^{++} não afetou, aparentemente, a eficiência de utilização do açúcar pela bactéria. Os fatores de conversão ($Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$) obtidos na fermentação do meio M4, no qual o caldo foi suplementado com sulfato de magnésio, foram praticamente os mesmos encontrados com o emprego do meio M5, indicando que

o caldo tratado apresentava um conteúdo em Mg^{++} satisfatório para as necessidades nutricionais da bactéria.

Tabela V.2.1.1 - Resultados gerais da fermentação de diferentes meios a base de caldo de cana-de-açúcar, após 48 horas. Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min^{-1}).

	M1	M2	M3	M4	M5
$\Delta S \text{ (g/L)}$	148,0	148,0	149,0	147,5	149,8
$\Delta X \text{ (g/L)}$	9,6	0,52	8,7	7,5	7,7
$\Delta P \text{ (g/L)}$	66,7	0,50	61,3	62,5	64,0
$Y_{x/s}$	0,065	0,0035	0,058	0,051	0,051
$Y_{p/s}$	0,45	0,0034	0,41	0,42	0,43
R (%)	85,6	0,65	77,9	79,8	81,7

M1 - meio completo

M2 - sem adição de nutrientes

M3 - adição de $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$ e $MgSO_4$

M4 - adição de $(NH_4)_2HPO_4$ e $MgSO_4$

M5 - adição de $(NH_4)_2HPO_4$

Embora os rendimentos em diol, com os meios M1, M3, M4 e M5, não tenham apresentado variações importantes, a forma como estes resultados foram construídos, ao longo das fermentações com os meios mais ricos (M1 e M3) e os que continham, apenas, fosfato de amônio, apresentou profundas diferenças. Como é mostrado nas Tabela C5 e C6 do Apêndice C, nas primeiras 24 horas de ensaio, nas fermentações com os meios M4 e M5, mais de 60% do substrato inicial já havia sido consumido. Com os meios M1 e M3 este percentual era inferior a 35%.

Neste intervalo, com os quatro meios, a conversão de substrato em produto não apresentou diferenças consideráveis, tendo sido calculados valores parciais de $Y_{p/s}$ entre 0,35 e 0,43. Entretanto, as produtividades parciais com os meios M4 e M5 (1,5 g/Lh) foram quase duas vezes maiores que com os demais.

Entre o tempo 24 horas e o fim da fermentação, foi observado um comportamento inverso. Neste caso, as velocidades de consumo de substrato e de formação de produtos aumentaram nas culturas com os meios M1 e M3 e, por outro lado, decresceram fortemente com M4 e M5.

Os dados disponíveis neste ensaio não são suficientes para explicar o comportamento do processo com cada meio. Os resultados sugerem, porém, que a formação de 2,3-butanodiol, entre 0 e 24 horas, foi inibida pelo teor mais alto de nutrientes presente nos meios M1 e M3. Estes aspectos serão abordados com maior embasamento na discussão dos ensaios em fermentador.

De um modo geral, a análise do Ensaio S2 permite concluir que a simples adição de fosfato de amônio ao caldo de cana, como é o caso do meio M5, leva a rendimentos em 2,3-butanodiol tão bons quanto aqueles atingidos com um meio rico (M1).

Figura V.2.1.1 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol (P) [B], em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M1). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min^{-1}).

Figura V.2.1.2 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol (P) [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar não suplementado com nutrientes (meio M2). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min^{-1}).

Figura V.2.1.3 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol (P) [B], em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M3). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min^{-1}).

Figura V.2.1.4 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol (P) [B], em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M4). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min^{-1}).

Figura V.2.1.5 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol (P) [B], em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M5). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min^{-1}).

V.2.2 Concentração de fosfato de amônio a ser empregada na formulação do meio de cultivo

Com base nas conclusões do Ensaio S2, optou-se pela realização de um novo experimento (S3) com o objetivo de conhecer o efeito de diferentes concentrações de fosfato de amônio, numa faixa de 1,0 a 10,0 g/L, sobre a fermentação butileno-glicólica. Os resultados gerais deste ensaio são mostrados na Tabela V.2.2.1.

Conforme pode ser visto nas Figuras V.2.2.1 e V.2.2.4 a V.2.2.13, o processo foi prejudicado quando concentrações de fosfato de amônio entre 1 e 4 g/L foram empregadas para suplementação do caldo. Em nenhum destes meios houve o consumo total da sacarose em 48 horas de fermentação, comprometendo os rendimentos em butanodiol. Por outro lado, a utilização de meios contendo 5,0 a 10,0 g/L deste nutriente permitiu o consumo de todo substrato em aproximadamente 38 horas.

Figura V.2.2.1 - Consumo de sacarose na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com diferentes concentrações de fosfato de amônio (meios M5 a M14). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Tabela V.2.2.1 - Resultados gerais da fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com diferentes concentrações de fosfato de amônio (meios M5 a M14). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Meio	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (g/L)	Δt (h)	ΔS (g/L)	ΔX (g/L)	ΔP (g/L)	Y _{X/S}	Y _{P/S}	R (%)	p (g/L.h)
M6*	1,0	-	31,7	2,0	3,3	0,063	0,10	19,0	-
M7*	2,0	-	46,9	2,9	14,0	0,062	0,30	57,0	-
M8*	2,5	-	66,1	3,5	22,5	0,053	0,34	64,6	-
M9*	3,0	-	87,6	4,2	28,0	0,048	0,32	60,8	-
M10*	3,5	-	101,7	4,8	36,0	0,047	0,35	66,5	-
M11*	4,0	-	127,7	5,3	46,0	0,042	0,36	68,4	-
M12	5,0	39	145,3	6,7	55,0	0,046	0,38	72,2	1,4
M5	6,0	37	146,7	6,9	59,4	0,047	0,40	76,0	1,6
M13	8,0	36	140,9	7,9	56,0	0,056	0,40	76,0	1,6
M14	10,0	39	138,5	7,0	55,9	0,050	0,40	76,0	1,4

* Não houve consumo total de substrato em 48 horas.

Estes resultados demonstram, portanto, que para uma concentração inicial de sacarose da ordem de 140 g/L, a adição de, no mínimo, 5 g/L de fosfato de amônio é necessária para a conclusão do processo.

Com os meios M6 a M11, concentrações crescentes de fosfato de amônio levaram a um aumento na concentração final de células e 2,3-butanodiol, diminuindo progressivamente o teor de açúcar residual no meio. Com o meio M11 (4,0 g/L de fosfato), 88% da sacarose havia sido consumida em 48 horas. Nesta condição, fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) decrescentes e, ao contrário, de conversão em produto ($Y_{P/S}$) crescentes foram verificados (Figura V.2.2.2).

Figura V.2.2.2 - Fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e em produto ($Y_{P/S}$) obtidos na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com diferentes concentrações de fosfato de amônio (meios M5 a M14). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min^{-1}).

Este comportamento pode ser explicado. Num primeiro instante do processo, com a presença de nutrientes e de oxigênio em solução, o crescimento celular foi favorecido, não ocorrendo, como é característico na fermentação butileno-glicólica, a formação de 2,3-butanodiol. Com o aumento da biomassa e, conseqüentemente, da demanda de oxigênio pelo cultivo, um rápido decréscimo no teor de oxigênio dissolvido no meio é esperado. Nesta fase, limitada em oxigênio, ocorrem as mais altas velocidades de formação de diol, segundo JANSEN *et alii*²³, SABLAYROLLES & GOMA⁵⁸ e SILVEIRA *et alii*⁶³. Assim, com os meios em que havia insuficiente concentração de nutrientes, a fermentação foi interrompida, ou sofreu uma drástica redução de velocidade, justamente nas fases em que o substrato seria convertido, preferencialmente, em 2,3-butanodiol.

Com o meio M6, por exemplo, suplementado com 1,0 g/L de fosfato, a pequena parcela de substrato consumida (23%) foi dirigida, praticamente, para o crescimento celular, resultando no mais alto valor de $Y_{X/S}$ (0,063). Sob limitação nutricional, a biomassa formada não teve condições de converter sacarose em butanodiol de forma eficiente, e uma concentração muito baixa de produto (3,3 g/L) foi excretada ao final de 48 horas. Neste meio, um $Y_{P/S}$ de 0,10 foi encontrado, o que significa apenas 19% do máximo teórico.

Com os meios M7 a M11, na medida que a síntese de massa celular foi favorecida por maiores concentrações de fosfato, um melhor desempenho do processo foi observado. Nestes casos, uma parcela cada vez maior de substrato foi direcionada para a formação de produto, resultando em valores crescentes de $Y_{P/S}$.

Analisando-se os resultados obtidos com os meios M5 e M12 a M14, observa-se que concentrações de fosfato acima de 5,0 g/L permitiram a obtenção de concentrações celulares mais elevadas. Nestes casos, um maior teor do nutriente permitiu que o crescimento se prolongasse por um maior período de tempo e a biomassa formada fosse capaz de esgotar o substrato em um tempo médio de 38 horas, levando à obtenção de bons rendimentos em butanodiol. Valores de $Y_{P/S}$ de 0,40, com concentrações de produto próximas a 60 g/L, foram encontrados com os meios suplementados com 6,0 a 10,0 g/L de fosfato, o que representa cerca 80% do máximo teórico.

O perfil das curvas que descrevem a variação da concentração de substrato com o tempo (Figuras V.2.2.4 a V.2.2.13) mostra que, com os meios M5 e M12 a M14, a velocidade de consumo da sacarose (dS/dt) é constante nas horas finais das fermentações. Este comportamento, foi verificado por SILVEIRA⁶⁴ na fermentação deste mesmo substrato por *Klebsiella pneumoniae*. O autor utilizou a equação de reta obtida neste intervalo para a previsão do término da fermentação e o cálculo da produtividade. No presente trabalho, como comentado no item IV.6.1, esta metodologia foi, também, adotada. Deste modo, as linhas pontilhadas nas Figuras V.2.2.10 a V.2.2.13. representam o perfil presumido do consumo da sacarose nestas fermentações.

As produtividades alcançadas com os meios em que não houve consumo total de substrato não foram calculadas, visto que as fermentações não foram concluídas em 48 horas, tempo estabelecido como limite do Ensaio S3.

A finalização da fermentação em tempos muito próximos e a pequena variação da concentração final de células atingida com estes meios, levou à obtenção de produtividades muito semelhantes, com valores ligeiramente maiores quando concentrações de 6,0 e 8,0 g/L de fosfato de amônio (meios M5 e M13) foram empregadas (Figura V.2.2.3).

Figura V.2.2.3 - Produtividades alcançadas na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com diferentes concentrações de fosfato de amônio (meios M5 a M14). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min^{-1}).

Os resultados obtidos neste Ensaio demonstram, portanto, que a suplementação do caldo de cana com fosfato de amônio, em concentrações entre 5,0 e 10,0 g/L, é condição suficiente para a composição do meio de fermentação a ser empregado neste processo. Nestas condições, concentrações finais elevadas de butanodiol e rendimentos comparáveis aos melhores valores citados na literatura, para outros meios, foram alcançados.

Considerando que caldo de cana com concentrações de açúcar mais elevadas seria empregado na próxima etapa deste trabalho, optou-se pela utilização de 8,0 g/L de fosfato de amônio para enriquecimento dos meios usados no estudo cinético da fermentação.

Figura V.2.2.4 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol (P) [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 1,0 g/L de fosfato de amônio (meio M6). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min^{-1}).

Figura V.2.2.5 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol (P) [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 2,0 g/L de fosfato de amônio (meio M7). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min^{-1}).

Figura V.2.2.6 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol (P) [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 2,5 g/L de fosfato de amônio (meio M8). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Figura V.2.2.7 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol (P) [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 3,0 g/L de fosfato de amônio (meio M9). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Figura V.2.2.8 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol (P) [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 3,5 g/L de fosfato de amônio (meio M10). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min^{-1}).

Figura V.2.2.9 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol (P) [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 4,0 g/L de fosfato de amônio (meio M11). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min^{-1}).

Figura V.2.2.10 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol (P) [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 5,0 g/L de fosfato de amônio (meio M12). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Figura V.2.2.11 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol (P) [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 6,0 g/L de fosfato de amônio (meio M5). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min^{-1}).

Figura V.2.2.12 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol (P) [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 8,0 g/L de fosfato de amônio (meio M13). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Figura V.2.2.13 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A] e 2,3-butanodiol (P) [B], em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 10,0 g/L de fosfato de amônio (meio M14). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min^{-1}).

V.3 Estudo Cinético da Fermentação de Caldo-de-Cana de Açúcar

Nos Ensaios S2 e S3 foi demonstrado que caldo de cana-de-açúcar suplementado apenas com fosfato de amônio é um meio adequado para a produção de 2,3-butanodiol por *Klebsiella pneumoniae*. Estes ensaios, entretanto, por terem sido realizados em frascos agitados, não permitiram uma observação mais detalhada da cinética do processo. Nestes casos havia a limitação do volume de amostra a ser retirado, bem como a impossibilidade de medir-se a concentração de oxigênio dissolvido, parâmetro fundamental para esta fermentação, como já descrito no item II.4.4.

Assim, dois ensaios em fermentador de bancada, em regime descontínuo, foram realizados. No Ensaio P1 foi utilizado o meio M13 (caldo suplementado com 8,0 g/L de fosfato de amônio), definido no Ensaio S3, enquanto que no Ensaio F5 foi empregado o meio completo M1. Nos dois casos o caldo foi diluído a uma concentração aproximada de 180 g/L de sacarose. As demais condições de operação estão descritas no item IV.4.2.

A Tabela V.3.1 mostra os resultados finais obtidos nestes ensaios e as Figuras V.3.4 a V.3.7 ilustram os perfis cinéticos e as variações das velocidades específicas com o tempo nos dois ensaios.

Em F5, a maior disponibilidade de nutrientes levou à formação de uma maior massa celular, resultando em um valor de $Y_{x/s}$ (0,065) superior àquele alcançado em P1 (0,051). Apesar das concentrações celulares finais nos dois ensaios terem apresentado uma diferença significativa, as fermentações foram concluídas em tempos muito próximos, cerca de 35 horas. Com relação à formação de produto, as concentrações finais alcançadas nos ensaios P1 e F5 (71,7 e 71,1 g/L) levaram a valores muito semelhantes de $Y_{p/s}$ (0,41 e 0,39) e produtividade (p) (2,1 e 2,0 g/Lh).

JANSEN *et alii*²³ e SILVEIRA *et alii*⁶³, na fermentação de xilose e sacarose, respectivamente, por *K. pneumoniae*, dividiram a fermentação butileno-glicólica em fases

que eram dependentes da disponibilidade de oxigênio para o cultivo. Estes artigos foram discutidos no item II.4.4. A ocorrência destas fases foi, também, constatada no presente trabalho, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar, como é descrito a seguir para o Ensaio F5, realizado com o meio completo M1, cuja composição é muito semelhante à dos meios utilizados por aqueles autores.

Tabela V.3.1 - Resultados gerais da fermentação de meios a base de caldo de cana-de-açúcar. Ensaios P1 e F5 (frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Ensaio	P1	F5
Meio	M13	M1
K_La (h ⁻¹)	95	95
t (h)	34,5	35,7
ΔS (g/L)	177,0	181,0
ΔX (g/L)	9,1	11,8
ΔP (g/L)	71,7	71,1
$Y_{X/S}$	0,051	0,065
$Y_{P/S}$	0,41	0,39
R (%)	78,0	74,1
p (g/Lh)	2,1	2,0
$\mu_{X,m}$	0,61	0,45
$\mu_{P,m}$	0,53	0,45

O perfil cinético do processo mostra que nas cinco primeiras horas da fermentação, com a presença de oxigênio dissolvido no meio, o crescimento celular foi exponencial, o

que é confirmado pela relação linear entre o logaritmo da concentração celular e o tempo (Figura V.3.1). Nesta figura o coeficiente angular corresponde à máxima velocidade específica de crescimento ($\mu_{x,m}=0,45 \text{ h}^{-1}$). Por outro lado, neste mesmo período, a formação de 2,3-butanodiol foi praticamente inexistente.

Figura V.3.1 - Logaritmo neperiano das concentrações celulares em função do tempo, nas primeiras 5 horas de fermentação do Ensaio F5 (meio M1; $S_0 = 181,0 \text{ g/L}$; frequência do agitador, 500 min^{-1} ; aeração, $0,43 \text{ vvm}$).

Durante esta fase o metabolismo foi predominantemente oxidativo e o substrato consumido foi direcionado para a obtenção de energia, via ciclo de Krebs, e formação de massa celular. Segundo SILVEIRA *et alii*⁶³, com concentrações de oxigênio dissolvido acima de zero a velocidade específica de respiração (Q_{O_2}) da bactéria é máxima.

Com o aumento da demanda de oxigênio, em virtude do incremento da massa de células no reator, a concentração de oxigênio dissolvido no meio caiu a zero e, a partir deste instante, duas importantes mudanças ocorreram na cinética da fermentação: a curva

de crescimento celular em função do tempo tornou-se linear e a produção de diol foi imediatamente intensificada.

Nesta situação, sob escassez de oxigênio, a via fermentativa passou a ser, também, utilizada pelas células para a recuperação da coenzima NAD^+ , limitando a geração de novas células. De fato, verificou-se a partir da quinta hora da fermentação uma queda constante na velocidade específica de crescimento (μ_x) e, ao contrário, as mais altas velocidades específicas de formação de produto ($\mu_{p,m}=0,45 \text{ h}^{-1}$) (Figura V.3.5).

A variação dos fatores de conversão de substrato em células e em produto com o tempo (Figura V.3.2), demonstra, igualmente, que uma maior parcela do substrato foi direcionada para a formação de diol sob limitação de oxigênio. Verifica-se que $Y_{x/s}$ caiu lentamente, enquanto $Y_{p/s}$ permaneceu constante até o esgotamento do substrato.

Figura V.3.2 - Fatores de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) e em produto ($Y_{p/s}$) em função do tempo. Ensaio F5 (meio M1; $S_0 = 181,0 \text{ g/L}$; frequência do agitador, 500 min^{-1} ; aeração, $0,43 \text{ vvm}$).

Segundo SILVEIRA *et alii*⁶³, μ_p é função de Q_{O_2} e seus maiores valores são observados com Q_{O_2} ligeiramente superiores ao coeficiente de manutenção para o oxigênio (m_o). Os autores observaram, também, que a velocidade específica de respiração (Q_{O_2}) de *K. pneumoniae*, diminui linearmente com a queda de μ_x . Ou seja, a formação de 2,3-butanodiol pelo cultivo se dá de forma mais intensa com velocidades específicas de crescimento baixas mas, ainda, maiores que zero. A Figura V.3.3 mostra que, de fato, os valores de μ_p mais altos ($0,45 \text{ h}^{-1}$) foram alcançados com μ_x entre $0,12$ e $0,38 \text{ h}^{-1}$.

Figura V.3.3 - Velocidade específica de formação de produto (μ_p) em função da velocidade específica de crescimento (μ_x). Ensaio F5 (meio M1; $S_0 = 181,0 \text{ g/L}$; frequência do agitador, 500 min^{-1} ; aeração, $0,43 \text{ vvm}$).

Por volta das 28 horas, o crescimento celular foi interrompido, embora ainda houvesse uma concentração elevada de substrato em solução. A partir de então, uma drástica diminuição em μ_p foi verificada enquanto μ_s permaneceu aproximadamente constante.

Estudando o processo com concentrações iniciais de sacarose em torno de 40 g/L, SILVEIRA *et alii*⁶⁴ atribuíram a interrupção do crescimento celular ao insuficiente suprimento de oxigênio para o cultivo. Neste caso, a queda de μ_p estaria relacionada a valores de Q_{O_2} excessivamente baixos. No presente trabalho, entretanto, observou-se, a partir de 31 horas de fermentação, que a concentração de oxigênio dissolvido voltou a subir, indicando que a demanda de oxigênio pelo cultivo era inferior à transferência proporcionada pelo sistema. Isto permite supor que a carência de algum nutriente do meio tenha sido responsável, pelo menos parcialmente, pela fase estacionária de crescimento observada.

Comparando-se os Ensaios F5 e P1, verificaram-se, de uma forma geral, os mesmos perfis cinéticos.

A concentração de oxigênio dissolvido, no Ensaio P1, se manteve acima de zero por um período de cerca de 3,5 horas, sendo alcançada ao final desta fase uma concentração celular de 1,7 g/L, muito superior àquela verificada em F5 no mesmo tempo (0,8 g/L). Um maior valor de $\mu_{x,m}$ (0,61 h⁻¹) foi encontrado no Ensaio P1. Neste caso, com maiores velocidades específicas de crescimento, o oxigênio foi mais rapidamente consumido, justificando a ocorrência de uma fase de metabolismo oxidativo por um menor período.

A fase de crescimento linear no Ensaio P1, decorrente da ausência de oxigênio em solução a partir das 3,5 horas de fermentação, durou cerca de 11 horas a menos que no Ensaio F5. Nesta fase, a velocidade específica de formação de 2,3-butanodiol atingiu seu valor máximo (0,53 h⁻¹), cerca de 18% maior que em F5 (0,45 h⁻¹).

A interrupção do crescimento celular se deu, no Ensaio P1, por volta das 15 horas de fermentação e uma fase estacionária 12 horas mais longa, foi verificada. Neste momento, a concentração celular em P1 era de 9,0 g/L, 30% inferior àquela alcançada em F5 nesta mesma situação.

As possíveis causas da ocorrência desta fase foram apresentadas na discussão do Ensaio F5. Os resultados do Ensaio P1, no entanto, reforçam a hipótese de que a escassez

de algum nutriente tenha desempenhado, neste caso, um papel mais importante que a limitação de oxigênio. O fato da concentração de oxigênio dissolvido ter voltado a subir 2,5 horas depois do crescimento ter sido paralisado, para um tempo de fase estacionária de quase 20 horas, justifica esta afirmação.

Da mesma forma que em F5, μ_p decresceu significativamente quando μ_x se tornou igual a zero, atingindo um valor de $0,15 \text{ h}^{-1}$, mantido constante até o fim do processo.

Como já foi comentado, os rendimentos e as produtividades nestes dois ensaios foram muito semelhantes, ainda que a duração e os resultados parciais de cada uma das fases características deste processo tenham apresentado profundas diferenças. Uma tentativa de explicação do modo como estes resultados foram alcançados no decorrer das fermentações é proposta a seguir.

A velocidade global do processo, nas primeiras 15 horas do Ensaio P1, foi muito superior àquela do Ensaio F5 no mesmo tempo. Neste intervalo, foram consumidos, em P1, cerca de 60% da sacarose inicialmente presente no caldo, o dobro da quantidade assimilada pelo cultivo em F5, o que levou a uma concentração de butanodiol duas vezes maior. Estas diferenças se devem, provavelmente, às composições dos meios de cultivo empregadas. O meio M1 (Ensaio F5) foi formulado com diferentes sais e apresentava uma concentração de solutos superior à do meio M13 (Ensaio P1), o que teria reduzido a atividade de água (A_w) do meio e, em consequência, inibido o desenvolvimento do processo. Esta interpretação está de acordo com o trabalho de ESENER *et alii*¹², que demonstrou que a velocidade específica de crescimento de *K. pneumoniae* é profundamente afetada por baixos valores de A_w .

Considerando o intervalo entre 15 horas e o final da fermentação, verifica-se um comportamento diverso. Enquanto em P1 a concentração celular permaneceu constante em $9,1 \text{ g/L}$, em F5 o crescimento celular se manteve linearmente crescente e se prolongou até as 28 horas de processo, atingindo uma concentração final de cerca de $12,0 \text{ g/L}$. No caso do Ensaio F5, o emprego de um meio mais rico suportou o crescimento celular por um maior tempo, o que permitiu a manutenção do consumo de substrato e da formação de

produto em níveis elevados. Desta forma, em F5, os resultados parciais inferiores aos do Ensaio P1, observados nas primeiras 15 horas de processo, foram compensados.

Em concordância com as conclusões dos ensaios em frascos agitados (S2 e S3), estes resultados confirmam que fosfato de amônio, em concentrações adequadas, pode ser utilizado como única fonte adicional de nutriente para a fermentação de caldo de cana-de-açúcar por *K. pneumoniae*. Desta forma, considerando uma eventual produção industrial de 2,3-butanodiol, seria possível conduzir o processo com um meio de custo relativamente baixo.

A observação da cinética do processo realizado nesta condição, entretanto, sugere a necessidade de estudos visando determinar, precisamente, que nutriente, ou nutrientes, é responsável pela paralisação precoce do crescimento celular. A partir desta informação, seria possível programar uma adição parcelada de nutrientes ao meio, evitando o retardamento do processo em seu início, devido à alta concentração de solutos, e, num momento posterior, o comprometimento da produtividade provocada por uma fase estacionária excessivamente longa.

Figura V.3.4 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A], 2,3-butanodiol (P) e oxigênio dissolvido (C) [B] em função do tempo. Ensaio F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min^{-1} ; aeração, $0,43 \text{ vvm}$).

Figura V.3.5 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) [A] e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) [B] em função do tempo. Ensaio F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Figura V.3.6 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A], 2,3-butanodiol (P) e oxigênio dissolvido (C) [B] em função do tempo. Ensaio P1 (meio M13; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Figura V.3.7 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) [A] e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) [B] em função do tempo. Ensaio P1 (meio M13; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

V.4 Efeito da Concentração Inicial de Sacarose sobre a Cinética da Fermentação

Para a realização do estudo cinético da fermentação butileno-glicólica com caldo de cana-de-açúcar diluído a diferentes concentrações iniciais de sacarose, optou-se, a princípio, pela utilização do meio M13 (caldo de cana suplementado com 8,0 g/L de fosfato de amônio). Entretanto, já no primeiro ensaio desta série (Ensaio P2), com concentração inicial de substrato (S_0) de 24,3 g/L, ficou patente que, nesta situação, a escolha do meio M13 não foi apropriada. Este ensaio é descrito a seguir.

A Tabela V.4.1 mostra os resultados gerais do Ensaio S2 e na Figura V.4.5 é representada a cinética da fermentação.

Tabela V.4.1 - Resultados gerais da fermentação de caldo de cana-de-açúcar diluído a uma concentração de sacarose de 24,3 g/L. Ensaio P2 (meio M13; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

t (h)	ΔS (g/L)	ΔX (g/L)	$Y_{X/S}$	$\mu_{X,m}$ (h ⁻¹)
23,5	24,3	2,5	0,10	0,71

O crescimento celular atingiu uma concentração máxima de 2,7 g/L em menos de 8 h de cultivo, o que levou a um lento consumo do substrato residual (g/L) e a um tempo de fermentação superior a 23 h.

Um período de crescimento exponencial, com uma velocidade específica máxima ($\mu_{X,m}$) de 0,71 h⁻¹, foi observado nas duas primeiras horas de processo, enquanto havia oxigênio em solução. A partir daí, μ_X decresceu rapidamente até a supressão do

crescimento celular, permanecendo assim até o esgotamento do substrato. As velocidades específicas de consumo de substrato (μ_s) tiveram seus valores máximos também no início da fermentação, apresentando, a seguir, uma forte diminuição, acompanhando a queda de μ_x . Com $\mu_x=0$, μ_s se manteve praticamente constante até o final do processo (Figura V.4.6).

Estes resultados indicaram que ao se diluir o caldo de cana, foram diluídos também todos os demais nutrientes naturalmente presentes na matéria-prima, retardando, deste modo, o processo.

A fim de confirmar esta interpretação, foi realizado o Ensaio P3 no qual foram mantidas, inicialmente, as mesmas condições de P2. Os resultados obtidos neste ensaio são apresentados na Tabela V.4.2. A Figura V.4.7 mostra o comportamento da fermentação.

Tabela V.4.2 - Resultados gerais da fermentação de caldo de cana-de-açúcar diluído a uma concentração de sacarose de 25,6 g/L. Ensaio P3 (meio M13; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

t (h)	ΔS (g/L)	ΔX (g/L)	$Y_{X/S}$	$\mu_{X,m}$
7,5	25,6	5,4	0,21	0,66

Após um tempo de 3,5 horas, aproximadamente, percebeu-se uma redução na velocidade de crescimento, mostrando que o perfil cinético anteriormente observado tendia a se repetir. Assim, entre os tempos 3,5 e 4 horas de processo, foi introduzida na cuba de fermentação uma mistura concentrada de sais de Mg⁺⁺, Fe⁺⁺, Mn⁺⁺, Ca⁺⁺ e Zn⁺⁺, de modo que as concentrações em solução fossem aquelas definidas para o meio M1.

A curva de crescimento apresentou uma inflexão a partir do instante em que o meio foi enriquecido com os sais, indicando uma retomada do crescimento celular que atingiu, então, o dobro da concentração observada em P2. A biomassa de 5,4 g/L formada levou ao consumo de toda a sacarose em menos de 8 h de fermentação.

Os resultados destes ensaios demonstraram, portanto, que a fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com fosfato de amônio somente é viável com o caldo pouco diluído. Isto se deve à característica de cinética semi-associada, segundo a classificação de GADEN¹⁸, deste processo. Em condições favoráveis, durante a etapa de crescimento celular mais intenso, nas primeiras horas de processo, o microrganismo utiliza uma série de nutrientes. Na sequência, com a predominância do metabolismo fermentativo, a massa celular pré-formada, em concentrações maiores, teria condições de concluir o processo em tempo relativamente curto, mesmo sob limitação nutricional. No caso do Ensaio P2, as baixas concentrações de nutrientes do caldo diluído limitaram a formação de biomassa, fazendo com que a fase fermentativa tivesse uma duração excessivamente longa.

Desta forma, para o estudo da cinética do processo, com a diluição do caldo a diferentes concentrações iniciais de sacarose, foi escolhido o meio completo (M1).

Foram avaliadas concentrações iniciais de substrato entre 24 e 181 g/L. Os resultados do Ensaio F5 foram, portanto, incluídos nesta discussão.

Um resumo dos resultados obtidos é apresentado na Tabela V.4.3 enquanto que as Figuras V.4.8 a V.4.15 mostram o aspecto cinético e a variação das velocidades específicas, com o tempo, nos Ensaios F1 a F4. Estas mesmas figuras para o Ensaio F5 (Figuras V.3.4 e V.3.5) foram apresentadas no item anterior.

A primeira condição avaliada ($S_0=24,2$ g/L) confirmou as conclusões dos Ensaios P2 e P3. De fato, com esta concentração de açúcar e com o meio M1, a fermentação durou cerca de 6,5 h, tendo sido encontrado um fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}=0,21$ h⁻¹) idêntico ao de P3.

A concentração celular final aumentou com o incremento da concentração inicial de sacarose (S_0) entre 24,2 e 152,0 g/L, atingindo 11,6 g/L neste último caso. A utilização de um valor de S_0 mais elevado, 181,0 g/L, não implicou em aumento da produção de biomassa.

Com relação à formação de produto, as concentrações finais aumentaram progressivamente com S_0 . Com $S_0=181,0$ g/L, por exemplo, foi obtida a maior concentração de butanodiol, 71,1 g/L, o que corresponde a um rendimento de 74,1% em relação ao máximo teórico.

Tabela V.4.3 - Resultados gerais da fermentação de caldo de cana-de-açúcar diluído a diferentes concentrações iniciais de sacarose. Ensaios F1 a F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min^{-1} , aeração, 0,43 vvm).

Ensaio	F1	F2	F3	F4	F5
$K_La \text{ (h}^{-1}\text{)}$	110	98	96	95	95
$t \text{ (h)}$	6,5	9,3	12,5	18,5	35,4
$\Delta S \text{ (g/L)}$	24,2	60,0	105,0	152,0	181,0
$\Delta X \text{ (g/L)}$	5,1	7,7	9,5	11,6	11,8
$\Delta P \text{ (g/L)}$	7,2	20,9	40,1	59,6	71,1
$Y_{X/S}$	0,21	0,13	0,090	0,076	0,065
$Y_{P/S}$	0,30	0,35	0,38	0,39	0,39
$R \text{ (\%)}$	57,0	66,5	72,2	74,1	74,1
$p \text{ (g/Lh)}$	1,1	2,2	3,2	3,2	2,0
$\mu_{X,m}$	0,91	0,69	0,63	0,53	0,45
$\mu_{P,m}$	0,65	0,64	0,68	0,62	0,45

As Figuras V.3.4, V.4.8, V.4.10, V.4.12 e V.4.14 mostram que perfis cinéticos típicos da fermentação butileno-glicólica foram encontrados em todos os ensaios, independentemente da concentração inicial de substrato: crescimento exponencial e ausência de formação de produto, na presença de concentrações de oxigênio dissolvido acima de zero, e crescimento linear e intensa produção de diol, sob limitação de O_2 .

De fato, as curvas relacionando as velocidades específicas com o tempo para estes ensaios (Figuras V.3.5, V.4.9, V.4.11, V.4.13 e V.4.15), mostram valores maiores de μ_x no início da fermentação e, após a sua queda, um aumento rápido de μ_p . Confirma-se, ainda, que os máximos valores de μ_p são obtidos com μ_x mais baixos, mas acima de zero.

A Figura V.4.1, que mostra a variação dos fatores de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) e em produto ($Y_{p/s}$), demonstra que $Y_{x/s}$ variou inversamente com o aumento de S_0 . Com relação à conversão em produto, verifica-se que os valores de $Y_{p/s}$ cresceram com o incremento de S_0 de 24,2 a 105,0 g/L, mas não foram significativamente afetados quando concentrações de sacarose mais elevadas foram empregadas. Como já discutido anteriormente, a formação de produto se dá de forma mais intensa apenas após o esgotamento do oxigênio dissolvido. Como o oxigênio permaneceu em solução por tempos muito semelhantes (cerca de 3 horas), os rendimentos em produto foram determinados pela disponibilidade de açúcar após o início de sua formação, justificando, assim, os valores de $Y_{p/s}$ encontrados. De forma inversa, os resultados de $Y_{x/s}$ podem ser explicados.

Figura V.4.1 - Fatores de conversão de sacarose em células ($Y_{x/s}$) e em produto ($Y_{p/s}$) em função da concentração inicial de sacarose (S_0). Ensaios F1 a F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

A análise da Figura V.4.2, que relaciona a variação das máximas velocidades específicas de crescimento ($\mu_{x,m}$) e formação de produto ($\mu_{p,m}$) com S_0 , mostra que a influência deste parâmetro sobre o crescimento celular é maior que sobre a produção de 2,3-butanodiol. Observa-se uma queda constante de $\mu_{x,m}$ com o aumento da concentração inicial de açúcar, ao passo que $\mu_{p,m}$ apresenta um comportamento praticamente constante com S_0 entre 24,2 e 152 g/L. Um efeito inibidor de S_0 sobre μ_p foi particularmente verificado com $S_0=181$ g/L. Neste caso, além do baixo valor de $\mu_{x,m}$, verificou-se, também, uma queda de $\mu_{p,m}$. SABLAYROLLES & GOMA⁵⁸ trabalhando com a mesma bactéria e em condições de transferência de oxigênio semelhantes, chegaram à mesma conclusão. De acordo com JANSEN *et alii*²³, concentrações elevadas de açúcar levam à redução da atividade de água (A_w) do meio, inibindo a atividade metabólica de *K. pneumoniae*.

Figura V.4.2 - Máximas velocidades específicas de crescimento ($\mu_{x,m}$) e de formação de produto (μ_p) em função da concentração inicial de sacarose (S_0). Ensaio F1 a F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Na Figura V.4.3 é mostrado o efeito da concentração de sacarose sobre a produtividade (p) do processo. Observa-se que p aumentou com o incremento de S_0 de 24,2 (Ensaio F1) até 105 g/L (Ensaio F3). O emprego de $S_0=152$ g/L resultou numa produtividade idêntica (3,2 g/Lh) àquela alcançada em F3. Quando se utilizou $S_0=181$ g/L, a menor produtividade (2,0 g/Lh) foi obtida.

Figura V.4.3 - Produtividade (p) em função da concentração inicial de sacarose (S_0). Ensaios F1 a F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min^{-1} ; aeração, 0,43 vvm).

Nesta discussão, já foi visto que as concentrações finais de 2,3-butanodiol crescem na medida que maiores S_0 são utilizados. Desta maneira, a produtividade a ser alcançada em um dado ensaio será uma decorrência, principalmente, do tempo de fermentação e, portanto, das condições que interferem na duração do processo. A Figura V.4.4, que relaciona os tempos de fermentação com a concentração inicial de sacarose nestes ensaios, mostra que os tempos de fermentação são proporcionais a S_0 até 105 g/L. Com $S_0=152$ g/L, a influência de S_0 começa a ser sentida. No Ensaio F5 ($S_0=181$ g/L),

entretanto, o tempo final de fermentação foi fortemente afetado por um efeito conjunto da inibição por substrato e pela longa duração da fase estacionária.

Figura V.4.4 - Tempo de fermentação (t) em função da concentração inicial de sacarose (S_0). Ensaios F1 a F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min^{-1} ; aeração, $0,43 \text{ vvm}$).

Em comparação com a maioria dos resultados apresentados na Tabela II.5.1, as produtividades alcançadas nestes ensaios podem ser consideradas altas. Isto se deve ao suprimento de oxigênio alto utilizado neste trabalho. A redução do $K_L a$ resultaria, com toda certeza, na redução da produtividade, mas levaria, ao contrário, a um aumento da concentração final de produto e, conseqüentemente, do rendimento.

Os resultados destes ensaios não permitem que sejam feitas afirmações a respeito da influência da concentração do 2,3-butanodiol formado durante o processo sobre o crescimento e a formação do próprio produto. Embora nas curvas de cinética tenha sido observada uma queda de μ_x e de μ_p com avanço da fermentação, não é possível relacionar

este comportamento diretamente à concentração de produto, já que, como já visto, fatores como a composição do meio e o suprimento de oxigênio afetam substancialmente estas velocidades.

Em concordância com conclusões de outros autores^{23,58,64}, os dados obtidos neste grupo de ensaios demonstram, claramente, a influência da concentração de substrato sobre a produção de 2,3-butanodiol por *Klebsiella pneumoniae*. Deste modo, considerando que as concentrações médias de carboidratos no caldo de cana-de-açúcar são inibidoras para o microrganismo e que para a recuperação é desejável que teores elevados de produto estejam presentes no meio, o regime descontínuo alimentado parece ser o modo de operação mais indicado para este processo.

Figura V.4.5 - Concentrações de sacarose (S) e células (X) em função do tempo. Ensaio P2 (meio M13; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Figura V.4.6 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x) e consumo de sacarose (μ_s) em função do tempo. Ensaio P2 (meio M13; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Figura V.4.7 - Concentrações de sacarose (S) e células (X) em função do tempo. Ensaio P3 (meio M13; frequência do agitador, 500 min^{-1} ; aeração, $0,43 \text{ vvm}$).

Figura V.4.8 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A], 2,3-butanodiol (P) e oxigênio dissolvido (C) [B] em função do tempo. Ensaio F1 (meio M1; frequência do agitador, 500 min^{-1} ; aeração, $0,43 \text{ vvm}$).

Figura V.4.9 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) [A] e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) [B] em função do tempo. Ensaio F1 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Figura V.4.10 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A], 2,3-butanodiol (P) e oxigênio dissolvido (C) [B] em função do tempo. Ensaio F2 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Figura V.4.11 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) [A] e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) [B] em função do tempo. Ensaio F2 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Figura V.4.12 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A], 2,3-butanodiol (P) e oxigênio dissolvido (C) [B] em função do tempo. Ensaio F3 (meio M1; frequência do agitador, 500 min^{-1} ; aeração, $0,43 \text{ vvm}$).

Figura V.4.13 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) [A] e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) [B] em função do tempo. Ensaio F3 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Figura V.4.14 - Concentrações de sacarose (S), células (X) [A], 2,3-butanodiol (P) e oxigênio dissolvido (C) [B] em função do tempo. Ensaio F4 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Figura V.4.15 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) [A] e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) [B] em função do tempo. Ensaio F4 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

VI CONCLUSÕES

Neste capítulo são apresentadas as principais conclusões deste trabalho.

- . O caldo de cana-de-açúcar é uma matéria-prima adequada para a produção de 2,3-butanodiol por fermentação com *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199, desde que suplementado com nutrientes.
- . Na fermentação do caldo de cana clarificado e diluído a uma concentração inicial de sacarose (S_0) entre 140 e 150 g/L, a adição de fosfato de amônio, entre 5,0 e 10,0 g/L, como única fonte suplementar de nutrientes, leva a resultados finais comparáveis aos obtidos com o caldo enriquecido com vários nutrientes. Nesta faixa de concentração de fosfato de amônio, teores de butanodiol de até 64 g/L são alcançados, chegando os rendimentos a 81 % do máximo teórico. O consumo de substrato não é completo quando concentrações de fosfato de amônio de até 4,0 g/L são utilizadas.
- . Com $S_0=177$ g/L e 8,0 g/L de fosfato de amônio, concentrações finais de 2,3-butanodiol superiores a 70 g/L, rendimentos próximos a 80% e produtividades de 2,0 g/Lh são atingidos, com um tempo de fermentação entre 34 e 35 horas. Resultados semelhantes são obtidos com o meio rico e S_0 semelhante.
- . A análise da cinética da fermentação mostra que na presença de oxigênio dissolvido o crescimento celular é exponencial, as velocidades específicas de crescimento (μ_x) são máximas e não ocorre a produção de diol. Sob limitação de oxigênio, o crescimento se torna linear, μ_x cai progressivamente e as velocidades específicas de formação de produto (μ_p) aumentam rapidamente e atingem seus valores mais altos. Quando S_0 elevados são empregados, uma fase estacionária de crescimento, acompanhada de uma queda de μ_p , é verificada após o período de crescimento linear. Esta última fase é decorrente de um insuficiente suprimento de oxigênio e/ou da falta de algum nutriente no meio.

. Com S_0 em torno de 180 g/L, os valores máximos de μ_x ($0,61 \text{ h}^{-1}$) e μ_p ($0,53 \text{ h}^{-1}$) na fermentação do meio com 8,0 g/L de fosfato de amônio são maiores que aqueles obtidos com o meio rico, $0,42$ e $0,45 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Esta diferença pode ser explicada por uma inibição da atividade metabólica provocada pela maior concentração de nutrientes presente no meio rico. No primeiro caso, entretanto, a carência nutricional leva a uma fase estacionária 12 horas mais longa que a observada com o meio rico.

. Com $S_0=20 \text{ g/L}$, a suplementação do caldo com 8,0 g/L de fosfato de amônio leva a uma concentração celular final de 2,7 g/L, a baixas velocidades de consumo de substrato e a um longo tempo de fermentação (23,5 h). Com este mesmo S_0 , em meio rico, a concentração de biomassa é praticamente o dobro (5,1 g/L) e o processo se completa em 6,5 h, indicando que, no primeiro caso, ocorre uma diluição excessiva dos nutrientes originalmente presentes no caldo.

. Estudos realizados com o meio rico em nutrientes, com concentração inicial de sacarose entre 24 e 181 g/L, mostram que este parâmetro exerce uma forte influência sobre o crescimento celular e a produção de 2,3-butanodiol. Os fatores de conversão de sacarose em células ($Y_{x/s}$) decrescem com o incremento de S_0 , enquanto uma tendência oposta é verificada sobre os fatores de conversão de sacarose em produto ($Y_{p/s}$) que aumentam com S_0 até 152 g/L.

. O aumento de S_0 provoca uma redução das máximas velocidades específicas de crescimento ($\mu_{x,m}$), indicando inibição pelo substrato, enquanto as máximas velocidades específicas de formação de produto ($\mu_{p,m}$) se mantêm aproximadamente constantes, entre $0,62$ e $0,68 \text{ h}^{-1}$, com S_0 entre 24 e 152 g/L. O valor de $\mu_{p,m}$ diminui drasticamente ($0,45 \text{ h}^{-1}$) com $S_0=181 \text{ g/L}$.

. Produtividades de 3,2 g/Lh são obtidas com S_0 de 105 e 152 g/L. Com concentrações iniciais de sacarose mais baixas, menores produtividades são obtidas devido à

predominância do crescimento sobre a produção nestes casos. Com S_0 da ordem de 180 g/L a inibição pelo substrato provoca o aumento do tempo de fermentação e, em consequência, a queda da produtividade.

Os resultados deste trabalho deixam em aberto uma série de pontos importantes a serem abordados numa eventual continuação dos estudos sobre este tema, destacando-se:

- . a determinação das substâncias necessárias ao microrganismo nas diferentes fases do processo, a fim de estabelecer perfis de adição de nutrientes que permitam o crescimento celular e a formação de produtos em suas máximas potencialidades;
- . a condução do processo em regime descontínuo alimentado, de modo a evitar os efeitos negativos das altas concentrações de sacarose;
- . a otimização do suprimento de oxigênio que, assim como a fonte de carbono e os demais nutrientes, é extremamente importante para este processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ADAMS, G.A. & STANIER, R.Y. Production and Properties of 2,3-Butanediol. III - Studies on the Biochemistry of Carbohydrate Fermentation by *Aerobacillus polymyxa*. *Can. J. Research*, **23**(1):1-9, 1945.
2. AFSCHAR, A.S.; BELLGARDT, K.H.; VAZ ROSSEL, C.E.; CZOK, A.; SCHALLER, K. The Production of 2,3-Butanediol by Fermentation of High Test Molasses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**: 582-585, 1991.
3. AFSCHAR, A.S.; VAZ ROSSEL, C.E.; JONAS, R.; QUESADA CHANTO, A.; SCHALLER, K. Microbial Production and Downstream Processing of 2,3-Butanediol. *J. Biotechnol.*, **27**: 317-329, 1993.
4. ALAM, S.; CAPIT, F.; WEIGANDS, W.A.; HONG, J. Kinetics of 2,3-Butanediol Fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*: Effect of initial Substrate Concentration and Aeration. In: ref.41, p. 378.
5. BARRET, E.L.; COLLINS, E.B.; HALL, B.J & MATOI, S.H. Production of 2,3-Butylene Glycol from Whey by *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*. *J. Dairy Sci.*, **66**: 2507-2514, 1983.
6. BLOM, R.H.; REED, D.L.; EFRON, A.; MUSTAKAS, G.C. Recovery of 2,3-Butylene Glycol from Fermentation Liquors. In: ref. 34, p.150; 35, p. 137; 49, p.517.
7. BRYN, K.; HETLAND, Ö; STÖRMER, F.C. The Reduction of Diacetyl and Acetoin in *Aerobacter aerogenes* - Evidence for One Enzyme Catalyzing Both Reactions. *Eur. J. Biochem.*, **18**: 116-119, 1971.

*De acordo com a NB 66/78 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1990.

8. BUCHANAN, R.E & GIBSONS, N.E (ed.). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 8th ed., 1975, p.322.
9. CELM - Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos. Instruções para Determinação Enzimática de Glicose pelo método GOD-POD.
10. CHAMPLUVIER, B.; DECALLONNE, J.; ROUXHET, P.G. Influence of Sugar Source (Lactose, Glucose, Galactose) on 2,3-Butanediol Production by *Klebsiella oxytoca* NRRL B199. **Arch. Microbiol.**, **152**: 411-414, 1989.
11. DE MAS, C.; JANSEN, N.B.; TSAO, G.T. Production of Optically Active 2,3-Butanediol *Bacillus polymyxa*. **Biotechnol. Bioeng.**, **31**: 366-377, 1988.
12. ESENER, A.A.; BOL, G.; KOSSEN, N.W.F.; ROELS, J.A. Effect of Water Activity on Microbial Grow. In: MOO-YOUNG, M.; ROBINSON, C.W. & VEZINA, C. **Adv. Biotechnol.**, v.3. Pergamon, Toronto, 1981, p. 339-344.
13. ESENER, A.A.; ROELS, J.A.; KOSSEN, N.W.F. The Influence of Temperature on the Maximum Specific Grow rate of *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnol. Bioeng.**, **23**: 1401-1405, 1981.
14. FIELDS, M.L.; RICHMOND, B. In: ref. 35, p.90.
15. FLICKINGER, M. C. Current Biological Research in Conversion of Cellulosic Carbohydrates into Liquid Fuels: How Far Have We Come? **Biotechnol. Bioeng. Symp.**, **22**: 27-48, 1980.
16. FRAZER, F.R. & McCASKEY, T.A. Wood Hydrolysate Treatments for Improved Fermentation of Wood Sugars to 2,3-Butanediol. **Biom.**, **18**: 31-42, 1989.
17. FULMER, E.I.; CHRISTENSEN, L.M.; KENDALL, A.R. Production of 2,3-Butylene Glycol by Fermentation. Effect of Sucrose Concentration. In: ref. 29, p.28; 49, p. 490.

18. GADEN, E.L. Fermentation Kinetics and Productivity. **Chem. Ind.**, 7: 154, 1955.
19. GONG, C.S.; CHEN, C.S.; CHEN, L.F. Pretreatment of Sugar Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolyzate for Ethanol Production by Yeast. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 39/40: 83-88, 1993.
20. GROVER, B.P.; GARG, S.K.; VERMA, J. Production of 2,3-Butanediol from Wood Hydrolysate by *Klebsiella pneumoniae*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 6: 328-332.
21. HADJIPETROU, L.P.; GERRITS, J.P.; TEULINGS, F.A.G.; STOUTHAMER, A.H. Relation Between Energy Production and Growth of *Aerobacter aerogenes*. **J.Gen. Microbiol.**, 36: 139-150, 1964.
22. JANSEN, N.B. & TSAO, G.T. Bioconversion of Pentoses to 2,3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Adv. Bioch. Eng. Biotechnol.**, 27: 85-99, 1983.
23. JANSEN, N.B.; FLICKINGER, M.C.; TSAO, G.T. Production of 2,3-Butanediol from D-Xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. **Biotechnol. Bioeng.**, 26: 362-369, 1984.
24. JANSEN, N.B.; FLICKINGER, M.C.; TSAO, G.T. Application of Bioenergetics to Modelling the Microbial Conversion of D-Xylose to 2,3-Butanediol. **Biotechnol. Bioeng.**, 26: 573-582, 1984.
25. LAMANA, C. & MALLETE, M.F. **Basic Bacteriology: its Biological and Chemical Background**. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1965, 3rd ed., p.734 e 771.
26. LAUBE, V.M.; GROLEAU, D.; MARTIN, S.M. 2,3-Butanediol Production from Xylose and Other Hemicellulosic Components by *Bacillus polymyxa*. **Biotechnol. Lett.**, 6(4): 257-262, 1984.
27. LE DUY, A. & ZAJIC, J.E. A Geometrical Approach for Diferentiation of an Experimental Function at a point: Applied to Growth and Product Formation. **Biotechnol. Bioeng.**, 25: 805-810, 1973.

28. LEDINGHAM, G.A. & NEISH, A.C. Fermentative Production of 2,3-Butanediol. In: UNDERKOFER, L.A. & HICKEY, R.J., **Industrial Fermentation**. Chemical Publishing Co., New York, 1954, p.27-93.
29. LEDINGHAM, G.A.; ADAMS, G.A.; STANIER, R.Y. Production and Properties of 2,3-Butanediol. I - Fermentation of Wheat Mash by *Aerobacillus polymyxa*. **Can. J. Research**, 23: 48-70.
30. LEE, H.K. & MADDUX, I.S. Continuous Production of 2,3-Butanediol from Whey Permeate using *Klebsiella pneumoniae* Immobilized in Calcium Alginate. **Enz. Microbiol. Technol.**, 8: 409-416, 1986.
31. LEE, H.K. & MADDUX, I.S. Microbial Production of 2,3-Butanediol from Whey Permeate. **Biotechn. Lett.**, 6(12): 815-818, 1984.
32. LIMA, U.A. Produção de Etanol. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das Fermentações**. São Paulo, Edgard Blücher, 1982. p. 285.
33. LÖKEN, J.P. & STÖRMER, F.C. Acetolactate Decarboxylase from *Aerobacter aerogenes* - Purification and Properties. **Eur. J. Biochem.**, 14:133-137, 1970.
34. LONG, S. & PATRICK, R. The Present Status of the 2,3-Butylene-glycol Fermentation. **Adv. Appl. Microbiol.**, 5: 135-155, 1963.
35. MAGEE, R.L. & KOSARIC, N. The Microbial Production of 2,3-Butanediol. **Adv. Appl. Microbiol.**, 32: 89-161, 1987.
36. MICKELSON, M. & WERLMAN, C.H. Influence of pH on the Dissimilation of Glucose by *Aerobacter indologenes*. **J. Bacteriol.**, 36: 67-75, 1938.
37. MOO-YOUNG, M. & BLANCH, H.W. Transport Phenomena and Bioreactor Design. In: BU'LOCK, J. & KRISTIANSEN, B. **Basic Biotechnology**. London, Academic Press, 1987. p. 561.

38. MURPHY, D. & STRANKS, D.W. The production of 2,3-Butanediol from Sulphite Waste Liquor. **Can. J. Technol.**, **29**: 413-420, 1951.
39. NEISH & LEDINGHAM, G.A. Production and Properties of 2,3-Butanediol. XXXII-2,3-Butanediol Fermentations at Poised Hydrogen Ion Concentration. **Can. J. Research**, **27**: 694-704, 1949.
40. NEISH, A.C. Conversion Products of 2,3-Butanediol: Possibilities of Founding a Commercial Chemical Industry Based upon This Fermentation Product from Wheat. **Can. Chem. Ind.**, **28**: 862-866, 1944.
41. NILEGAONGAR, S.; BHOSALE, S.B.; KSHIRSAGAR, D.C.; KAPADI, A.H. Production of 2,3-Butanediol from Glucose by *Bacillus licheniformis*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, **8**: 378-381, 1992.
42. NISHIKAWA, N.K.; SUTCLIFFE, R. & SADDLER, J.N. The Influence of Lignin Degradation Products on Xylose Fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **27**: 549-552, 1988.
43. OLIVEIRA, D.T. & ROSSEL, C.E.V. Opções de Tratamento de Caldo para Fabricação de Açúcar e Álcool. **STAB**. Nov-Dez, 1985.
44. OLSON, B.H. & JOHNSON, M.J. The production of 2,3-Butylene-glycol by *Aerobacter aerogenes* 199. **J. Bacteriol.**, **55**: 209-222, 1948.
45. PERLMAN, D. Production of 2,3-Butylene Glycol from Wood Hydrolysates. In: ref. 49, p.493; 34, p. 144.
46. PIRT, S.J & CALLOW, D.S. Exocellular Product Formation by Microorganism in Continuous Culture. I - Production of 2,3-Butanediol by *Aerobacter aerogenes* in a Single Stage Process. **J. Appl. Bacteriol.**, **21**: 188-205, 1958.
47. PIRT, S.J & CALLOW, D.S. Exocellular Product Formation by Microorganism in Continuous Culture. II - Production of 2,3-Butanediol from Sucrose by *Aerobacter aerogenes* in a Two-Stage Process. In: ref. 75, p. 936; 85, p. 634.

48. PIRT, S.J. The Oxygen Requirement of Growing Cultures of an *Aerobacter* Specie Determined by Means of the Continuous Culture Technique. **J. Gen. Microbiol.**, **16**: 59-75, 1957.
49. PRESCOTT, S.C. & DUNN, C.G. The Production and Properties of 2,3-Butanediol. In: **Industrial Microbiology**. Mc Graw-Hill, New York, 1959, p. 399-427.
50. QURESH, I.N.; MEAGHER, M.M.; HUTKINS, R.W. Recovery of 2,3-Butanediol by Vacuum Membrane Distillation. **Sep. Sci. Technol.**, **29**(13): 1733-1748, 1994.
51. QURESHI, N. & CHERYAN, M. Effects of Aeration on 2,3-Butanediol Production from Glucose by *Klebsiella oxytoca*. **J. Ferm. Bioeng.**, **67**(6): 415-418, 1989.
52. QURESHI, N. & CHERYAN, M. Production of 2,3-Butanediol by *Klebsiella oxytoca*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **30**: 440-443, 1989.
53. RAMACHANDRAN, N.B. & GOMA, G. Effect of Oxygen Supply and Dilution Rate on the Production of 2,3-Butanediol in Continuous Bioreactor by *Klebsiella pneumoniae*. **Enz. Microbiol. Technol.**, **9**: 107-111, 1987.
54. RAMACHANDRAN, N.B. & GOMA, G. 2,3-Butanediol Production from Glucose by *Klebsiella pneumoniae* in a Cell Recycle System. **J. Biotechnol.**, **9**: 39-46, 1988.
55. RAMACHANDRAN, K.B.; HASHIM, M.A.; FERNANDEZ, A.A. Kinetic Study of 2,3-Butanediol Production by *Klebsiella oxytoca*. **J. Ferm. Bioeng.**, **70**(4): 235-240, 1990.
56. ROBERTO, I.C.; LACIS, L.S.; BARBOSA, M.F.S.; MANCILHA, I.M. Utilization of Sugar Cane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate by *Pichia stipitis* for the Production of Ethanol. **Process Biochem.**, **26**: 15-21, 1991.
57. ROSENBERG, S. L. Fermentation of Pentoses Sugars to Ethanol and Neutral Products by Microorganisms. **Enz. Microbiol. Technol.**, **2**: 185-192, 1980.

58. SABLAYROLLES, J.M. & GOMA, G. Butanediol Production by *Aerobacter aerogenes* NRRL B199: Effects of Inicial Substrate Concentration and Aeration Agitation. *Biotechnol. Bioeng.*, **26**: 148-155, 1984.
59. SCHUMPE, A. & QUICKER, G. Gas Solubilities in Microbial Culture Media. *Adv. Biochem. Eng.*, **24**: 1-38, 1982.
60. SCOTT, W.J. In: ref. 22, p.95; 35, p.123.
61. SENKUS, M. Recovery of 2,3-Butanediol Produced by Fermentation. In: ref. 35, p.135; 49, p.517.
62. SILVEIRA, M.M.; SCHMIDELL, W.; BERBERT, M.A.; PRATA, A.M.R. Efeito Conjunto da Concentração de Sacarose e do Suprimento de Ar sobre a Produção de 2,3-Butanodiol por *Klebsiella pneumoniae*. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA, 3, Santiago - Chile, 16 a 19/11/1993.
63. SILVEIRA, M.M.; SCHMIDELL, W.; BERBERT, M.A. Effect of Air Supply on the Production of 2,3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199. *J. Biotechnol.*, **31**: 93-102, 1993.
64. SILVEIRA, M. M. Estudo Cinético da Fermentação Butileno-Glicólica de Sacarose por *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199. São Paulo, EPUSP, 1991. 201 p. (Tese de Doutorado).
65. SPECKMAN, R.A. & COLLINS, E.B. Microbial Production of 2,3-Butylene-Glycol from Cheese Whey. *Appl. Env. Microbiol.*, **43**(5): 1216-1218, 1982.
66. STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, M.L.; PAINTER, P.R. *The Microbial World*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 689p.
67. STÖRMER, F.C. Evidence for Induction of the 2,3-Butanediol-Forming Enzymes in *Aerobacter aerogenes*. *FEBS Lett.*, **2**(1): 36-38, 1968.

68. STÖRMER, F.C. The pH 6 Acetolactate-Forming Enzyme from *Aerobacter aerogenes*. **J: Biol. Chem.**, **243**(13): 3739-3739, 1968.
69. TEGTMEIER, U. Alternative Productions Using Agricultural Crops as Raw Material. **Sonderdruck aus Zuckerindustrie**, Band **114**: 204-209. In: ref. 3, p.318.
70. TINK, R.R. In: ref. 28, p.79; 35, p.135.
71. TOPIWALA, H. & SINCLAIR, C.G. Temperature Relationship in Continuous Culture. **Biotechnol. Bioeng.**, **13**: 795-813, 1971.
72. TRAN, A.V. & CHAMBERS, R.P. The Dehydration on Fermentative 2,3-Butanediol into Methyl Ethyl Ketone. **Biotechnol. Bioeng.**, **29**: 343-351, 1987.
73. UI, S.; MATSUYAMA, N.; MASUDA, H.; MURAKI, H. Mechanism for the Formation of 2,3-Butanediol. **J. Ferment. Technol.**, **62**(6): 551-559, 1984.
74. van ZYL, C.; PRIOR, B.A.; du PREZ, J.C. Production of Ethanol from Sugar Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolyzate by *Pichia stipitis*. **Appl. Biochem.** **75. Biotechnol.**, **17**: 357-369, 1988.
75. VOLOCH, M.; JANSEN, N.B.; LADISCH, M.R.; TSAO, G.T.; NARAYAN, R.; RODWELL, V.W. 2,3-Butanediol. In: MOO-YOUNG, M., **Comprehensive Biotechnology: the Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine**. Pergamon Press, 1985, v.3, 1985, p.933-947.
76. VOLOCH, M.; LADISCH, M.R.; RODWELL, V. W.; TSAO, G.T. Reduction of Acetoin to 2,3-Butanediol in *Klebsiella pneumoniae*: a New Model. **Biotechnol. Bioeng.**, **25**: 173-183, 1983.
77. WARD, G.E.; PETTIJOHN, O.G.; COGHILL, R.D. Production of 2,3-Butanediol from Acid-Hydrolyzed Starch. In: ref. 49, p.490.

78. WILLETTS, A. Diol Production by *Aeromonas hydrophila*: Comparison of Different Immobilization Techniques. **Biotechnol. Lett.**, 8(6): 437-440, 1986.
79. WILLETTS, A. Butane-2,3-Diol Production by *Aeromonas hydrophila* Grow on Starch. **Biotechnol. Lett.**, 6(4): 263-268, 1984.
80. WILLETTS, A. Butane-2,3-Diol Production by Immobilized *Aeromonas hydrophila*. **Biotechnol. Lett.**, 7(4): 261-266, 1985.
81. YU, E.K.C; DECHATELETS, L.; SADDLER, J.N. Combined Enzymatic Hydrolysis and Fermentation Approach to Butanediol Production from Cellulose and Hemicellulose Carbohydrates of Wood and Agricultural Residues. **Biotechnol. Bioeng.**, 14: 341-352, 1984.
82. YU, E.K.C; DECHATELETS, L.; SADDLER, J.N. The Bioconversion of Wood Hydrolisates to Butanol and Butanediol. **Biotechnol. Lett.**, 6(5): 327-332, 1984.
83. YU, E.C.K.; LEVITIN, N. & SADDLER, J.N. Production of 2,3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae* Grow on Acid Hydrolyzed Wood Hemicellulose. **Biotechnol. Lett.**, 4(11): 741-746, 1982.
84. YU, E.K.C & SADDLER, J.N. Enhanced Production of 2,3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae* Grown on High Sugar Concentrations in the Presence of Acetic Acid. **Appl. Env. Microbiol.**, 44(4): 777-784, 1982.
85. YU, E.K.C & SADDLER, J.N. Fed-Batch Approach to Production of 2,3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae* Grow on High Substrate Concentrations. **Appl. Environm. Microbiol.**, 46(3): 630-635, 1983.
86. YU, E.K.C & SADDLER, J.N. Power Solvent Production by *Klebsiella pneumoniae* Grown on Sugars Present in Wood Hemicellulose. **Biotechnol. Lett.**, 4(2): 121-126, 1982.
87. ZENG, A-P.; BIEBL, H. & DECKWER, W-D. Effect of pH and Acetic Acid on Grow and 2,3-Butanediol Production of *Enterobacter aerogenes* in Continuous Culture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 33: 485-489, 1990.

APÊNDICE A

CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Tabela A.1 - Absorbâncias a 560 nm de suspensões de *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199, cultivada em meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M1), em diferentes concentrações. Espectrofotômetro SHIMADZU UV 160A.

Conc. (g/L)	0,018	0,037	0,054	0,073	0,092	0,109	0,128	0,146	0,164	0,182
Abs	0,06	0,113	0,167	0,224	0,274	0,330	0,374	0,425	0,474	0,532

Figura A.1 - Curva de calibração obtida a partir de suspensões de *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199, cultivada em meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M1), em diferentes concentrações. Espectrofotômetro SHIMADZU UV 160A, 560 nm.

Tabela A.2 - Absorbâncias a 505 nm de soluções-padrão de sacarose, previamente hidrolisadas com HCl 2N, pelo método GOD-POD. Espectrofotômetro SHIMADZU UV 160A.

Conc. (g/L)	5,0	10,0	15,0	20,0	25,0	30,0	35,0	40,0	45,0	50
Abs	0,45	0,084	0,123	0,163	0,201	0,250	0,291	0,334	0,372	0,418

Figura A.2 - Curva de calibração obtida a partir da análise de soluções-padrão de sacarose, previamente hidrolisadas com HCl 2N, pelo método GOD-POD. Espectrofotômetro SHIMADZU UV 160A, 505 nm.

Tabela A.3 - Área dos picos do cromatograma da análise de soluções-padrão de 2,3-butanodiol obtidas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Cromatógrafo MERCK-HITACHI acoplado a detector de índice de refração ERC-7515A ERMA CR. INC.

Conc. (g/L)	0,26	0,51	1,58	2,92	4,09	5,12
Área	47477	120704	393523	718484	1052647	1315495

Figura A.3 - Curva de calibração obtida pela análise de soluções-padrão de 2,3-butanodiol por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Cromatógrafo MERCK-HITACHI acoplado a detector de índice de refração ERC-7515A ERMA CR. INC.

Tabela A.4 - Área dos picos do cromatograma da análise de soluções-padrão de acetoína obtidos por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Cromatógrafo MERCK-HITACHI (detector de índice de refração ERC-7515A ERMA CR. INC.).

Conc. (g/L)	0,12	0,25	0,75	1,40	1,96	2,45
Área	29943	57132	177713	321144	452247	564796

Figura A.4 - Curva de calibração obtida pela análise de soluções-padrão de acetoína por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Cromatógrafo MERCK-HITACHI acoplado a detector de índice de refração ERC-7515A ERMA CR. INC.

APÊNDICE B

EXEMPLO DE CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO NA SATURAÇÃO

Equação utilizada no cálculo da concentração de oxigênio na saturação em soluções aquosas, segundo o modelo de SCHUMPE & QUICKER⁵⁹ (item IV.6.3):

$$\log (C_{60,s}/C_s) = 2 \sum H_i I_i + \sum K_j C_j$$

Concentração de saturação dos íons (C_j) das substâncias inorgânicas que compõem o meio M1 (mol/L):

MgSO ₄ .7H ₂ O	-	1,22.10 ³
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	4,11.10 ⁴
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	8,09.10 ⁴
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	3,21.10 ⁴
MnSO ₄ .H ₂ O	-	1,68.10 ⁵
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	5,45.10 ²
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-	4,54.10 ²
KOH	-	8,02.10 ²

Valores de H_i dos cátions e ânions presentes nestas substâncias, a 37°C⁵⁹ (mol/L):

Mg ⁺⁺	-	0,321	K ⁺⁺	-	-0,578
Ca ⁺⁺	-	-0,316	SO ₄ ⁼	-	0,448
Zn ⁺⁺	-	-0,310	Cl ⁻	-	0,861
Mn ⁺⁺	-	-0,325	HPO ₄ ⁼	-	0,477
NH ₄ ⁺	-	0,681	OH ⁻	-	0,917

Cálculo da força iônica (I_i) (mol/L):

$$I_i = 0,5 \cdot n \cdot C_i \cdot z_i^2$$

Mg^{++}	-	$0,5 \cdot 1,1,22 \cdot 10^{-3} \cdot 2^2 = 2,44 \cdot 10^{-3}$
Ca^{++}	-	$0,5 \cdot 1,4,11 \cdot 10^{-4} \cdot 2^2 = 8,22 \cdot 10^{-4}$
Zn^{++}	-	$0,5 \cdot 1,3,21 \cdot 10^{-4} \cdot 2^2 = 6,42 \cdot 10^{-4}$
Mn^{++}	-	$0,5 \cdot 1,1,68 \cdot 10^{-5} \cdot 2^2 = 3,36 \cdot 10^{-5}$
NH_4^+	-	$0,5 \cdot 2 (5,45 \cdot 10^{-2} + 4,54 \cdot 10^{-2}) \cdot 1^2 = 9,99 \cdot 10^{-2}$
K^+	-	$0,5 \cdot 1,8,02 \cdot 10^{-3} \cdot 1^2 = 4,01 \cdot 10^{-3}$
$SO_4^{=}$	-	$0,5 \cdot 1 (1,22 \cdot 10^{-3} + 8,09 \cdot 10^{-4} + 3,21 \cdot 10^{-4} + 1,68 \cdot 10^{-5} + 5,45 \cdot 10^{-2}) \cdot (-2)^2 = 1,12 \cdot 10^{-1}$
Cl^-	-	$0,5 \cdot 2,4,11 \cdot 10^{-4} \cdot (-1)^2 = 4,11 \cdot 10^{-4}$
$HPO_4^{=}$	-	$0,5 \cdot 1,4,54 \cdot 10^{-2} \cdot (-2)^2 = 9,08 \cdot 10^{-2}$
OH^-	-	$0,5 \cdot 1,8,02 \cdot 10^{-3} \cdot (-1)^2 = 4,01 \cdot 10^{-3}$

Portanto,

$$\Sigma H_i I_i = 2,59 \cdot 10^{-2}$$

Para o cálculo do segundo termo da equação, que leva em conta a presença de substâncias orgânicas no meio, foi desconsiderado o efeito do antiespumante e do EDTA, por não apresentarem o valor de K_j tabelado. O valor deste parâmetro para sacarose, em concentrações de até 200 g/L e a 37°C, é igual a 0,00052 L/g. Assim,

$$\Sigma K_j C_j = 0,00052.S$$

Desta forma,

$$\log (C_{0,s}/C_s) = 2,59.10^{-2} + 0,00052.S$$

Para uma concentração de sacarose (S) de 20 g/L, teremos

$$(C_{0,s}/C_s) = 10^{0,0363} = 1,087$$

A concentração de saturação de oxigênio em água, a 37°C e pressão de 760 mmHg, é igual a 0,216 mmol/L.

Portanto, a concentração de oxigênio na saturação (C_s) no meio M1, contendo 20 g/L de sacarose será

$$C_s = 0,199 \text{ mmol/L}$$

APÊNDICE C

TABELAS COM RESULTADOS EXPERIMENTAIS E VELOCIDADES ESPECÍFICAS

Tabela C.1 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M1). Ensaio S1 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	<0,01	150,7	0
24	6,3	83,7	19,5
48	9,2	0	60,7

Tabela C.2 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M1). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	<0,01	148,0	0
24	9,1	97,3	17,5
48	9,6	0	66,7

Tabela C.3 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar não suplementado com nutrientes (meio M2). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	<0,01	148,3	0
24	0,46	144,8	0
48	0,52	135,6	0,50

Tabela C.4 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M3). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	<0,01	149,0	0
24	6,6	101,1	20,5
48	8,7	0	61,3

Tabela C.5 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M4). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	<0,01	147,5	0
24	7,0	55,0	36,5
48	7,5	0	62,5

Tabela C.6 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de meio a base de caldo de cana-de-açúcar (meio M5). Ensaio S2 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	<0,01	149,8	0
24	7,0	59,0	36,5
48	7,7	0	64,0

Tabela C.7 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 1,0 g/L de fosfato de amônio (meio M6). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	< 0,01	136,2	0
10,3	1,6	119,0	2,0
24,0	1,9	115,1	3,3
34,0	2,2	98,0	3,8
48,0	2,0	99,0	3,4

Tabela C.8 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 2,0 g/L de fosfato de amônio (meio M7). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	<0,01	137,0	0
10,3	2,2	122,2	3,6
24,0	3,0	105,8	11,4
34,0	2,9	93,0	15,5
48,0	2,9	90,1	14,0

Tabela C.9 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 2,5 g/L de fosfato de amônio (meio M8). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	<0,01	140,9	0
10,3	2,3	124,0	3,9
24,0	3,6	95,6	16,9
34,0	3,6	72,6	18,5
48,0	3,5	72,8	22,5

Tabela C.10 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 3,0 g/L de fosfato de amônio (meio M9). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	<0,01	139,4	0
10,3	2,3	128,2	3,7
24,0	4,3	86,8	20,7
34,0	4,2	59,9	24,6
48,0	4,2	51,8	28,0

Tabela C.11 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 3,5 g/L de fosfato de amônio (meio M10). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	<0,01	140,9	0
10,3	2,3	122,7	3,8
24,0	4,9	80,2	24,0
34,0	4,8	52,9	32,0
48,0	4,8	39,2	36,0

Tabela C.12 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 4,0 g/L de fosfato de amônio (meio M11). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	<0,01	143,8	0
10,3	2,3	112,6	3,4
24,0	5,4	66,3	29,4
34,0	5,3	32,9	37,0
48,0	5,3	16,1	46,0

Tabela C.13 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 5,0 g/L de fosfato de amônio (M12). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	<0,01	145,3	0
10,3	2,0	113,4	2,7
24,0	6,8	64,4	30,4
34,0	6,5	20,3	44,0
48,0	6,5	0	55,0

Tabela C.14 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 6,0 g/L de fosfato de amônio (meio M5). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	<0,01	146,7	0
10,3	1,9	116,6	2,4
24,0	6,8	63,9	31,1
34,0	7,0	15,2	46,5
48,0	6,9	0	59,4

Tabela C.15 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 8,0 g/L de fosfato de amônio (meio M13). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	<0,01	140,9	0
10,3	2,2	114,2	2,2
24,0	7,8	52,4	33,7
34,0	7,9	9,6	48,6
48,0	7,9	0	56,0

Tabela C.16 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo, na fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementado com 10,0 g/L de fosfato de amônio (meio M14). Ensaio S3 (agitação recíproca a 120 min⁻¹).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	<0,01	138,5	0
10,3	1,9	120,4	2,6
24,0	7,2	80,1	24,0
34,0	7,0	26,8	41,0
48,0	7,0	5,03	55,9

Tabela C17 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P) em função do tempo. Ensaio P1 (meio M13; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	0,19	177,0	0
1,33	0,37	173,0	0,50
2,93	1,14	175,0	0,56
5,0	2,85	158,0	2,03
7,5	4,55	148,5	7,5
10,5	7,32	125,4	17,9
13,5	8,70	94,1	31,1
16,5	9,51	63,8	42,76
19,5	9,24	44,7	50,1
22,5	8,73	29,2	50,9
25,33	8,20	19,8	58,7
28,5	7,62	9,1	62,0
31,5	8,53	5,1	66,8
34,5	9,32	0	71,5

Tabela C18 - Concentração de oxigênio dissolvido (C) em função do tempo. Ensaio P1 (meio M13; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Tempo (h)	C (mmol/L)	t (h)	C (mmol/L)
0	0,163	11,0	0
0,25	0,162	13,0	0
0,42	0,159	15,0	0
0,68	0,156	17,0	0
0,92	0,149	19,0	0
1,33	0,144	21,5	0
1,62	0,138	22,5	0,019
1,83	0,133	23,62	0,039
2,05	0,129	24,68	0,062
2,4	0,12	25,68	0,075
2,68	0,115	27,0	0,091
2,88	0,111	28,38	0,101
3,02	0,102	29,45	0,108
3,22	0,003	30,28	0,114
3,33	0,002	31,42	0,122
3,67	0	32,38	0,128
5,0	0	33,57	0,139
7,0	0	34,5	0,146
9,0	0		

Tabela C.19 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) em função do tempo. Ensaio P1 (meio M13; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Tempo (h)	μ_x (h ⁻¹)	μ_s (h ⁻¹)	μ_p (h ⁻¹)
1,25	0,42	2,77	0,11
2,50	0,65	2,08	0,17
3,75	0,59	1,69	0,32
5,00	0,40	1,94	0,53
6,25	0,28	1,50	0,58
7,50	0,22	1,50	0,57
8,75	0,19	1,37	0,55
10,0	0,15	1,26	0,52
11,25	0,11	1,23	0,50
12,50	0,083	1,17	0,50
13,75	0,056	1,20	0,49
15,0	0,030	1,06	0,43
16,25	0,011	0,85	0,37
17,5	0,002	0,73	0,29
18,75	0,002	0,69	0,20
20,0	0,002	0,58	0,16
21,25	0	0,52	0,15
22,5	0	0,47	0,16
23,75	0	0,43	0,17
25,0	0	0,38	0,15
26,25	0	0,29	0,15
27,5	0	0,26	0,17
28,75	0	0,26	0,17
30,0	0	0,20	0,16
31,25	0	0,17	0,15
32,5	0	0,15	0,17
33,75	0	0,13	0,16
35,0	0	0,13	0,13

Tabela C.20 - Concentrações de células (X) e sacarose (S) em função do tempo.
Ensaio P2 (meio M13; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)
0,08	0,20	24,2
1,5	0,51	24,0
2,5	1,09	22,3
3,5	1,8	20,4
4,5	2,2	18,2
5,5	2,5	16,7
6,5	2,6	16,2
7,5	2,7	15,3
8,5	2,7	14,1
9,5	2,7	12,9
10,5	2,6	11,4
11,5	2,7	10,6
12,5	2,6	9,3
13,5	2,6	8,3
14,5	2,6	7,5
15,5	2,6	6,5
16,5	2,6	5,4
17,5	2,6	5,3
18,5	2,6	4,7
19,5	2,6	3,5
20,5	2,6	2,7
21,5	2,6	1,6
22,5	2,6	0,7
23,5	2,6	0

Tabela C.21 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) em função do tempo. Ensaio P2 (meio M13; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Tempo (h)	μ_x (h ⁻¹)	μ_s (h ⁻¹)
1,0	0,803	0,98
2,0	0,70	1,48
3,0	0,45	1,27
4,0	0,21	0,84
5,0	0,096	0,62
6,0	0,051	0,43
7,0	0,023	0,38
8,0	0,083	0,44
9,0	0,002	0,51
10,0	0	0,48
11,0	0	0,43
12,0	0	0,39
13,0	0	0,36
14,0	0	0,32
15,0	0	0,29
16,0	0	0,28
17,0	0	0,28
18,0	0	0,31
19,0	0	0,33
20,0	0	0,30
21,0	0	0,32
22,0	0	0,34
23,0	0	0,23

Tabela C.22 - Concentrações de células (X) e sacarose (S) em função do tempo.
Ensaio P3 (meio M13*; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)
0	0,20	25,6
0,75	0,31	24,3
1,5	0,49	23,9
2,25	0,95	23,4
3,0	1,5	21,5
3,75	1,9	20,3
4,5	2,5	18,1
5,25	2,9	15,1
6,0	4,0	10,5
6,75	4,8	5,6
7,5	5,6	0
8,0	5,4	0

* nutrientes adicionados ao meio durante a fermentação

Tabela C.23 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P) em função do tempo. Ensaio F1 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0,08	0,15	24,7	0,46
0,75	0,23	23,0	0,40
1,5	0,42	23,7	0,43
2,25	0,67	22,7	0,46
3	1,5	21,4	0,59
3,75	2,4	19,5	0,61
4,5	3,2	15,2	2,0
5,25	4,1	9,5	3,6
6	4,7	3,2	5,6
6,5	5,3	0	7,7
7	5,1	0	7,4

Tabela C.24 - Concentração de oxigênio dissolvido (C) em função do tempo. Ensaio F1 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Tempo (h)	C (mmol/L)	Tempo (h)	C (mmol/L)
0,05	0,197	2,83	0,031
0,25	0,191	2,92	0,023
0,42	0,188	3,0	0,016
0,62	0,182	3,1	0
1,0	0,175	3,5	0
1,33	0,163	4,5	0
1,5	0,148	5,5	0
1,68	0,141	6,0	0
2,25	0,093	6,45	0
2,43	0,067	6,5	0,015
2,5	0,057	6,67	0,079
2,75	0,042	7,0	0,103

Tabela C.25 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) em função do tempo. Ensaio F1 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm)

Tempo (h)	μ_x (h ⁻¹)	μ_s (h ⁻¹)	μ_p (h ⁻¹)
0,5	0,42	1,05	0
0,75	0,48	1,91	0
1,0	0,67	2,36	0
1,25	0,76	2,38	0
1,5	0,95	1,71	0
1,75	1,08	1,66	0
2,0	1,00	2,09	0
2,25	0,94	1,87	0
2,5	0,90	1,25	0
2,75	0,82	1,19	0,050
3,0	0,73	1,24	0,096
3,25	0,66	1,27	0,137
3,5	0,58	1,71	0,21
3,75	0,52	1,84	0,32
4,0	0,47	2,07	0,45
4,25	0,43	2,11	0,61
4,50	0,38	2,05	0,64
4,75	0,35	2,07	0,69
5,0	0,304	1,99	0,64
5,25	0,26	1,88	0,62
5,5	0,28	1,81	0,61
5,75	0,16	1,68	0,59
6,0	0,12	1,57	0,68
6,25	0,11	1,42	0,76
6,5	0,050	0,68	0,36
6,75	0,008	0	0
7,0	0	0	0

Tabela C.26 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P), em função do tempo. Ensaio F2 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0,08	0,21	60,5	0,41
1,0	0,32	58,1	0,40
2,0	0,66	57,1	0,47
3,0	0,98	55,6	0,59
4,0	2,3	51,9	1,3
5,0	3,4	47,0	3,1
6,0	5,0	38,6	5,9
7,0	6,2	27,0	9,7
8,0	7,3	15,1	14,5
9,0	7,7	4,1	18,4
10,0	7,9	0	21,3
10,5	7,8	0	21,2

Tabela C.27 - Concentração de oxigênio dissolvido (C) em função do tempo. Ensaio F2 (meio M1; frequência do agitador, 500 min^{-1} ; aeração, 0,43 vvm).

Tempo (h)	X (g/L)	Tempo (h)	C (mmol/L)
0,01	0,188	3,08	0,012
0,17	0,186	3,17	0,003
0,33	0,183	3,2	0
0,42	0,178	4,0	0
0,5	0,171	5,0	0
0,75	0,162	6,0	0
1,0	0,15	7,0	0
1,2	0,141	8,0	0
1,5	0,126	9,0	0
2,25	0,098	9,5	0
2,5	0,076	10,3	0,007
2,66	0,062	10,47	0,019
2,83	0,045	10,5	0,028

Tabela C.28 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) em função do tempo. Ensaio F2 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm)

Tempo (h)	μ_x (h ⁻¹)	μ_s (h ⁻¹)	μ_p (h ⁻¹)
0,8	0,50	3,13	0
1,2	0,43	3,57	0
1,6	0,67	2,98	0
2,0	0,601	2,49	0,11
2,4	0,59	2,79	0,18
2,8	0,73	2,91	0,20
3,2	0,70	2,14	0,29
3,6	0,64	1,65	0,46
4,0	0,605	0,89	0,59
4,4	0,53	0,90	0,57
4,8	0,46	1,55	0,66
5,2	0,30	1,52	0,64
5,6	0,29	1,69	0,65
6,0	0,32	1,65	0,63
6,4	0,24	1,84	0,70
6,8	0,20	1,89	0,67
7,2	0,17	1,82	0,69
7,6	0,14	1,73	0,65
8,0	0,11	1,58	0,63
8,4	0,066	1,51	0,63
8,8	0,044	1,48	0,64
9,2	0,028	1,38	0,46
9,6	0,008	0,87	0,19
10,0	0	0,36	0
10,4	0	0	0

•

Tabela C.29 - Concentrações de células (X), sacarose (S), 2,3-butanodiol (P) e oxigênio dissolvido (C) em função do tempo. Ensaio F3 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0,08	0,23	104,7	0,38
1,5	0,58	104,1	0,41
2,5	1,04	104,5	0,24
3,5	2,1	103,9	0,71
4,5	3,2	98,7	1,8
5,5	4,4	91,8	3,4
6,5	5,4	75,3	8,4
7,5	7,1	58,6	12,7
8,5	8,2	49,0	18,5
9,5	9,0	34,1	22,9
10,5	9,5	22,3	29,7
11,5	9,7	11,9	36,5
12,5	9,0	0	40,5
13,5	9,5	0	39,5

Tabela C.30 - Concentrações de oxigênio dissolvido (C) em função do tempo. Ensaio F3 (meio M1; frequência do agitador, 500 min^{-1} ; aeração, $0,43 \text{ vvm}$).

Tempo (h)	C (mmol/L)	Tempo (h)	C (mmol/L)
0	0,178	2,75	0,019
0,15	0,17	2,83	0,005
0,25	0,164	2,9	0
0,4	0,156	4,0	0
0,5	0,151	5,0	0
0,58	0,144	6,0	0
0,67	0,138	7,0	0
0,75	0,132	8,0	0
1,08	0,122	9,0	0
1,42	0,094	10,0	0
2,0	0,085	11,0	0
2,25	0,071	12,0	0
2,5	0,048	13,0	0

Tabela C.31 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) em função do tempo. Ensaio F3 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm)

Tempo (h)	μ_x (h ⁻¹)	μ_s (h ⁻¹)	μ_p (h ⁻¹)
0,5	0,57	1,67	0
1,0	0,55	1,25	0
1,5	0,66	0,19	0,096
2,0	0,73	0,27	0,13
2,5	0,67	0,35	0,22
3,0	0,55	0,59	0,33
3,5	0,54	0,99	0,36
4,0	0,51	1,12	0,37
4,5	0,39	1,59	0,42
5,0	0,31	2,02	0,51
5,5	0,29	2,79	0,68
6,0	0,26	3,14	0,69
6,5	0,23	2,67	0,74
7,0	0,20	2,37	0,75
7,5	0,18	2,09	0,72
8,0	0,16	1,76	0,71
8,5	0,12	1,60	0,71
9,0	0,092	1,45	0,68
9,5	0,074	1,30	0,66
10,0	0,046	1,26	0,66
10,5	0,027	1,24	0,63
11,0	0,015	1,20	0,60
11,5	0,004	1,16	0,59
12,0	0	1,11	0,42
12,5	0	0,19	0,18
13,0	0	0,083	0
13,5	0	0	0

Tabela C.32 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P) em função do tempo. Ensaio F4 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0,1	0,17	152,1	0,34
2,0	0,71	151,4	0,66
4,0	1,9	150,4	1,5
6,0	3,6	141,5	3,2
8,0	4,9	120,0	9,3
10,0	6,9	104,5	16,5
12,0	8,7	80,3	25,8
14,0	10,2	55,3	36,1
16,0	11,1	28,8	45,2
18,0	11,5	7,9	58,7
20	11,8	0	58,9

Tabela C.33 - Concentração de oxigênio dissolvido (C) em função do tempo. Ensaio F4 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Tempo (h)	C (mmol/L)	Tempo (h)	C (mmol/L)
0,17	0,169	2,75	0
0,25	0,169	4,0	0
0,5	0,158	6,0	0
0,75	0,149	8,0	0
1,0	0,141	10,0	0
1,25	0,129	12,0	0
1,5	0,112	14,0	0
1,75	0,094	16,0	0
2,0	0,07	18,0	0
2,25	0,042	19,0	0
2,5	0,022	19,5	0,01
2,58	0,009	20,0	0,029
2,6	0,006		

Tabela C.34 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) em função do tempo. Ensaio F4 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm)

Tempo (h)	μ_x (h ⁻¹)	μ_s (h ⁻¹)	μ_p (h ⁻¹)
0,8	0,58	0	0,45
1,6	0,77	0,68	0,68
2,4	0,64	0,72	0,43
3,2	0,48	0,63	0,28
4	0,39	0,85	0,309
4,8	0,31	1,40	0,37
5,6	0,25	1,61	0,38
6,4	0,23	1,93	0,56
7,2	0,19	1,84	0,63
8	0,16	1,78	0,66
8,8	0,15	1,69	0,64
9,6	0,13	1,59	0,62
10,4	0,12	1,56	0,57
11,2	0,105	1,48	0,53
12	0,094	1,46	0,53
12,8	0,084	1,41	0,51
13,6	0,071	1,33	0,49
14,4	0,057	1,19	0,49
15,2	0,044	1,12	0,52
16	0,036	1,02	0,502
16,8	0,023	0,92	0,53
17,6	0,013	0,94	0,49
18,4	0,009	0,52	0,21
19,2	0,003	0,21	0
20	0	0	0

Tabela C.35 - Concentrações de células (X), sacarose (S) e 2,3-butanodiol (P) em função do tempo de fermentação. Ensaio F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0,08	0,21	180,8	0,38
2,0	0,53	180,8	0,59
5,0	1,4	176,8	1,9
8,0	2,8	170,7	4,1
11,0	4,5	165,0	9,3
14,0	6,1	148,1	15,7
17,0	6,9	129,3	22,1
20,0	8,6	107,8	31,0
23,0	10,2	84,0	39,9
26,0	11,5	61,1	51,4
29,0	12,1	39,9	60,0
32,0	11,6	20,6	67,5
35,0	11,9	4,6	71,2
38	11,5	0	70,6

Tabela C.36 - Concentração de oxigênio dissolvido (C) em função do tempo de fermentação. Ensaio F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Tempo (h)	C (mmol/L)	Tempo (h)	C (mmol/L)
0	0,163	5,32	0
0,38	0,162	7,0	0
0,67	0,159	9,0	0
0,83	0,156	11,0	0
1,0	0,149	13,0	0
1,27	0,144	15,0	0
1,33	0,138	17,0	0
1,5	0,133	19,0	0
1,67	0,129	21,0	0
1,8	0,12	23,0	0
1,87	0,115	25,0	0
2,05	0,111	27,0	0
2,18	0,102	29,0	0
2,5	0,083	30,5	0
3,0	0,051	31,6	0,009
3,32	0,041	32,6	0,036
3,68	0,031	33,6	0,062
3,97	0,023	34,6	0,082
4,3	0,017	35,6	0,098
4,7	0,012	36,6	0,123
5,02	0,005		

Tabela C.37 - Velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de sacarose (μ_s) e formação de 2,3-butanodiol (μ_p) em função do tempo. Ensaio F5 (meio M1; frequência do agitador, 500 min⁻¹; aeração, 0,43 vvm).

Tempo (h)	μ_x (h ⁻¹)	μ_s (h ⁻¹)	μ_p (h ⁻¹)
1,27	0,42	1,57	0,32
2,54	0,50	1,57	0,45
3,81	0,39	0,88	0,48
5,08	0,29	0,75	0,46
6,35	0,24	0,83	0,48
7,62	0,21	0,73	0,43
8,89	0,16	0,89	0,44
10,16	0,13	0,077	0,48
11,43	0,11	0,043	0,45
12,7	0,10	0,93	0,41
13,97	0,086	1,02	0,37
15,24	0,080	1,05	0,37
16,51	0,075	1,04	0,36
17,78	0,065	0,97	0,34
19,05	0,059	0,85	0,30
20,32	0,056	0,83	0,31
21,59	0,051	0,82	0,35
22,86	0,044	0,75	0,31
24,13	0,038	0,66	0,29
25,4	0,028	0,64	0,30
26,67	0,015	0,66	0,28
27,94	0,007	0,56	0,27
29,21	0,002	0,52	0,22
30,48	0	0,55	0,21
31,75	0	0,52	0,19
33,02	0	0,48	0,10
34,29	0	0,50	0,058
35,56	0	0,054	0,022
36,83	0	0,054	0,022
38,10	0	0,02	0