



**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO**  
**SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA - FAENQUIL**  
**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

Andréa Dória Garcia

**PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE 2,3-BUTANODIOL A  
PARTIR DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE  
EUCALIPTO**

**Lorena – SP – Brasil**  
**2006**



**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO**  
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA - FAENQUIL**  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

Andréa Dória Garcia

## **PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE EUCALIPTO**

Tese de Doutorado apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Industrial.

Orientador: Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata

**Lorena - SP - Brasil**  
**2006**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

## **Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Biblioteca Universitária – FAENQUIL

GARCIA, Andréa Dória  
G165p Produção Fermentativa de 2,3-butanodiol a partir de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto / Andréa Dória Garcia. Lorena, 2006.  
112f.: il.

Tese (doutorado) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena.  
Departamento de Biotecnologia.

Orientador: Arnaldo Márcio Ramalho Prata.

1. Biotecnologia. 2. Fermentação. 3. Hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. 4. 2,3-Butanodiol. I. Arnaldo Márcio Ramalho Prata, orientador. II. Título.

CDU : 574.6



**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO**  
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA - FAENQUIL**  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

Andréa Dória Garcia

**PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE 2,3-BUTANODIOL A  
PARTIR DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE  
EUCALIPTO**

Lorena, 09 de março de 2006

Banca Examinadora:

Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata (Presidente)  
Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe  
Dra. Inês Conceição Roberto  
Dra. Marília A. Berbert de Molina  
Dr. Alfredo Eduardo Maiorano

**Lorena - SP - Brasil**  
**2006**



**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO**  
**SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA - FAENQUIL**  
**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

## **PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE EUCALIPTO**

Este exemplar corresponde à  
versão final da Tese de  
Doutorado aprovada pela banca  
examinadora

---

**Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata**  
Orientador e Presidente da Banca Examinadora

**Lorena, 09 de março de 2006**

Aos meus filhos Natalia e Renan  
Ao meu marido Redmilson  
À minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, pelas vitórias e conquistas.

Ao grande amigo, Prof. Arnaldo Márcio Ramalho Prata, pela dedicação e pelo incentivo e compreensão.

Aos demais professores e pesquisadores do Grupo de Processos Fermentativos, pelos incentivos e discussões.

A todos os funcionários do DEBIQ que, de um modo ou de outro, foram responsáveis por parte deste trabalho.

A todos os amigos e companheiros de laboratório, pela ajuda de sempre.

À Faculdade de Engenharia Química de Lorena, pela oportunidade de realizar este treinamento.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que aqui não foram citados, mas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

**GARCIA, Andréa Dória. Produção Fermentativa de 2,3-Butanodiol a Partir de Hidrolisado Hemicelulósico de Eucalipto.** Lorena, 2006. 94p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Lorena - 2006.

Os materiais lignocelulósicos, tais como os resíduos agrícolas, são uma abundante e renovável fonte de celulose e hemicelulose que podem servir como fonte de substratos para produção de diversos compostos químicos por processo fermentativo. Entre estes está o 2,3-butanodiol, um produto de interesse econômico devido suas várias aplicações, principalmente como intermediário químico. Em consequência do aumento das plantações de eucalipto, grandes quantidades de resíduo são geradas durante o corte da madeira, o que justifica o desenvolvimento de uma tecnologia para o seu aproveitamento. O objetivo principal deste trabalho foi definir o processo de produção de 2,3-butanodiol por fermentação, em sistema descontínuo alimentado, a partir de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, empregando-se a bactéria *Klebsiella pneumoniae*. O hidrolisado hemicelulósico foi obtido por hidrólise ácida dos resíduos (folhas, cascas e galhos) das plantações de eucalipto destinado às indústrias de papel e celulose, os quais constituem uma grande fonte de carboidratos não utilizada. Com o objetivo de otimizar o processo de produção de 2,3-butanodiol, várias etapas do mesmo foram estudadas, como a hidrólise ácida da matéria-prima, o tratamento do hidrolisado, as condições de fermentação e a recuperação do produto. Quanto ao processo de hidrólise ácida foi realizado um planejamento experimental estatístico, estudando-se os fatores: tempo, temperatura, concentração da solução ácida e relação líquido/matéria seca. A maior extração de açúcares foi obtida quando empregou-se uma temperatura de 160° C, uma concentração de ácido de 0,8% e uma relação líquido/matéria seca de 1:3. O hidrolisado foi submetido a dois diferentes tratamentos: precipitação por variação do pH associada à adsorção por carvão ativo e extração com resinas de troca iônica, sendo possível remover 100 % dos inibidores dosados durante o tratamento com resinas. Foram testadas condições de fermentação quanto a composição do meio em nutrientes, sua concentração em açúcares e a vazão de alimentação para o sistema descontínuo alimentado. Através deste estudo determinou-se que extrato de levedura é suficiente para suplementar o meio de alimentação e que a vazão mássica de adição de substrato mais favorável ao processo é de 20,4 g/h. Foi estudada a técnica de “salting out” para a recuperação do produto, empregando-se K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, variando a proporção do sal e a temperatura. A técnica apresentou-se promissora sendo possível obter uma recuperação de 91% de 2,3-butanodiol.

Palavras-chave: Biotecnologia, fermentação, hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, 2,3-butanodiol.



## ABSTRACT

**GARCIA, Andréa Dória. 2,3-Butanediol Fermentative Production from Eucalyptus Hemicellulosic Hydrolysate.** Lorena, 2006. 94p. Thesis (Doctoral in Industrial Biotechnology) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Lorena. 2006.

The lignocellulosic materials like a residues from agroindustry are renewable natural resources which have been hardly studied as carbohydrates source for fermentative processes. The 2,3-butanediol is a product with great economic interest due to several applications, mainly as a chemical intermediary. The main objective of this work was to define the process to produce 2,3-butanediol from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate by *Klebsiella pneumoniae* in fed-batch system. The hemicellulosic hydrolysate was obtained by acid hydrolysis of residues from the eucalyptus plantations, destined to the paper and cellulose industry, which are a rich source of carbohydrates. Aiming to optimize the production process of 2,3-butanediol several steps of this process were studied, as the raw-material acid hydrolysis, the treatment of hydrolysate, the fermentation and the product recovery. The acid hydrolysis process was evaluated by a factorial design and the following factors were studied: time, temperature, acid solutions concentration and liquid/dry material rate. The major sugar extraction was obtained under the following conditions: acid solution with 0,8 %, 1:3 liquid/dry material rate, 160 °C. The hydrolysate was submitted to two different treatments: precipitation by pH variation associated with adsorption by active charcoal and extraction with ion exchange resins, in order to be possible to select the way with best inhibitors removal. Ion exchange resins were more efficient than active charcoal to remove all major groups of inhibitory compounds. The fermentation conditions were tested for the medium composition nutrients, its sugars concentration and feeding rate for the fed-batch system. It was studied the technique of "salting out" recovery, applying  $K_2CO_3$  varying the proportion of salt and temperature. This methodology showed to be promising considering that the 2,3-butanediol recovery obtained in the present work was 91%.

Key-words: Biotechnology, fermentation, eucalyptus hemicellulosic hydrolysate, 2,3-butanediol.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b>	Reações que ocorrem durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos (PALMQVIST <i>et al.</i> , 2000).....	24
<b>Figura 2.2</b>	Classificação das principais bactérias produtoras de 2,3-butanodiol (MAGEE, KOSARIC, 1987).....	34
<b>Figura 2.3</b>	Vias metabólicas de formação dos produtos da fermentação de carboidratos por <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	35
<b>Figura 4.1</b>	Aparas de eucalipto nas plantações da Cia Suzano de Papel e Celulose.....	40
<b>Figura 4.2</b>	Picador de madeira.....	41
<b>Figura 4.3</b>	Esquema do reator tipo tambor rotativo munido com 4 câmaras com capacidade de 1 L cada empregado para os testes de hidrólise.....	45
<b>Figura 5.1</b>	Aparas de eucalipto cominuídas.....	57
<b>Figura 5.2</b>	Composição das Aparas de Eucalipto.....	58
<b>Figura 5.3</b>	Distribuição dos resíduos do modelo para extração de xilose+arabinose...68	
<b>Figura 5.4</b>	Clarificação do hidrolisado em função das etapas de tratamento com resinas de troca iônica: inicial(HI), concentrado (HC), neutralizado (HCN) e tratado com as resinas A860S, A500, C150 e A103S.....	74
<b>Figura 5.5</b>	Concentrações de células (-■-), de açúcares (-●-) e de butanodiol (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado por variação do pH e adsorção com carvão ativo.....	77
<b>Figura 5.6</b>	Concentrações de células (-■-), de açúcares (-●-) e de butanodiol (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado com resinas de troca iônica.....	78
<b>Figura 5.7</b>	Massa de células formada (-■-), de substrato consumido (-●-) e de butanodiol formado (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado através da variação do pH e adsorção com carvão ativo.....	79
<b>Figura 5.8</b>	Massa de células formada (-■-), de substrato consumido (-●-) e de butanodiol formado (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado com resinas de troca iônica.....	79

- Figura 5.9** Velocidades de formação de células (-■-), de consumo de substrato (-●-) e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado através da variação do pH e adsorção com carvão ativo.....80
- Figura 5.10** Velocidades de formação de células (-■-), de consumo de substrato (-●-) e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado com resinas de troca iônica.....80
- Figura 5.11** Velocidades específicas de formação de células (-■-), de consumo de substrato (-●-) e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado através da variação do pH e adsorção com carvão ativo.....82
- Figura 5.12** Velocidades específicas de formação de células (-■-), de consumo de substrato (-●-) e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratacom resinas de troca iônica.....83
- Figura 5.13** Concentrações de células (-■-), de açúcares (-●-) e de 2,3-butanodiol (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado com resinas e suplementado apenas com extrato de levedura.....85
- Figura 5.14** Massa de células formada (-■-), de substrato consumido (-●-) e de 2,3-butanodiol formado (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado com resinas de troca iônica e suplementado com todos os nutrientes (A) e com apenas extrato de levedura (B).....87
- Figura 5.15** Velocidades de formação de células (-■-), de consumo de substrato (-●-) e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado com resinas de troca iônica e suplementado com todos os nutrientes (A) e com apenas extrato de levedura (B).....87
- Figura 5.16**Concentrações de células (-■-), de açúcares (-●-) e de 2,3-butanodiol (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, utilizando  $\phi=170$  mL/h e  $S_i=120$  g/L .....73
- Figura 5.17** Massa de células formada (-■-), de substrato consumido (-●-) e de 2,3-butanodiol formado (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se  $\phi=170$  mL/h e  $S_i=120$  g/L .....90

- Figura 5.18** Velocidades de formação de células (-■-), de consumo de substrato (-●-) e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se  $\phi=170$  mL/h e  $S_i=120$  g/L .....90
- Figura 5.19** Velocidades específicas de formação de células (-■-), de consumo de substrato (-●-) e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se  $\phi=170$  mL/h e  $S_i=120$  g/L .....91
- Figura 5.20** Concentrações de células (-■-), de açúcares (-●-) e de butanodiol (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, utilizando  $\phi=170$  mL/h e  $S_i=120$  g/L .....93
- Figura 5.21** Massa de células formada (-■-), de substrato consumido (-●-) e de 2,3-butanodiol formado (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se  $\phi=72$  mL/h e  $S_i=221$  g/L .....94
- Figura 5.22** Velocidades de formação de células (-■-), de consumo de substrato (-●-) e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se  $\phi=72$  mL/h e  $S_i=221$  g/L .....94
- Figura 5.23** Velocidades específicas de formação de células (-■-), de consumo de substrato (-●-) e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se  $\phi=72$  mL/h e  $S_i=221$  g/L.....95
- Figura 5.24** Recuperação de 2,3-butanodiol em função da temperatura e da concentração de  $K_2CO_3$ .....99

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> - Classificação das resinas de troca iônica .....	29
<b>Tabela 2.2</b> - Processo de obtenção e aplicações de alguns derivados de 2,3-butanodiol....	33
<b>Tabela 4.1</b> - Fatores e níveis do planejamento fatorial $2^4$ .....	42
<b>Tabela 4.2</b> - Matriz de planejamento experimental fatorial $2^4$ .....	43
<b>Tabela 4.3</b> - Fatores e níveis do planejamento fatorial $2^3$ rotacional completo.....	43
<b>Tabela 4.4</b> - Matriz de planejamento experimental fatorial $2^3$ rotacional completo.....	44
<b>Tabela 4.5</b> - Condições de regeneração e lavagem das resinas de troca iônica .....	48
<b>Tabela 4.6</b> - Composição do meio empregado por Frazer, Mccaskey (1989).....	49
<b>Tabela 4.7</b> - Fatores e níveis do planejamento fatorial $2^2$ para $K_2CO_3$ .....	52
<b>Tabela 4.8</b> - Matriz de planejamento experimental fatorial $2^2$ .....	53
<b>Tabela 5.1</b> – Matriz de planejamento fatorial $2^4$ utilizada.....	60
<b>Tabela 5.2</b> – Concentração de açúcares e inibidores presentes no hidrolisado de cada ensaio do planejamento.....	61
<b>Tabela 5.3</b> – Estimativa dos efeitos, erros padrão e teste t para a extração de xilose+arabinose.....	62
<b>Tabela 5.4</b> – Análise de variância dos fatores temperatura, concentração ácida, relação sólido líquido e suas interações.....	62
<b>Tabela 5.5</b> – Análise de variância com erro puro dos fatores temperatura, concentração ácida, relação sólido líquido e suas interações.....	63
<b>Tabela 5.6</b> – Matriz de planejamento fatorial $2^3$ composto completo rotacional.....	64
<b>Tabela 5.7</b> – Concentração de açúcares e inibidores presentes no hidrolisado de cada ensaio do planejamento $2^3$ composto completo rotacional.....	65
<b>Tabela 5.8</b> - Análise de variância dos fatores temperatura, concentração ácida, relação sólido líquido e suas interações.....	66

<b>Tabela 5.9</b> – Análise de variância para a extração de xilose+arabinose, eliminando os fatores menos significativos.....	66
<b>Tabela 5.10</b> – Análise de variância com erro puro para a extração de xilose+arabinose, eliminando os fatores menos significativos.....	67
<b>Tabela 5.11</b> – Análise de regressão múltipla para o modelo que representa a extração de xilose+arabinose, durante o processo de hidrólise ácida.....	67
<b>Tabela 5.12</b> - Composição do hidrolisado obtido através da hidrólise ácida realizada segundo as condições determinadas pelo modelo.....	69
<b>Tabela 5.13</b> - Composição do hidrolisado obtido através da hidrólise ácida realizada em reator de 1 Le 50 L.....	70
<b>Tabela 5.14</b> - Composição do hidrolisado hemicelulosico sem concentrar e concentrado...71	
<b>Tabela 5.15</b> - Composição do hidrolisado hemicelulosico sem concentrar e concentrado...73	
<b>Tabela 5.16</b> – Concentração dos compostos inibidores presentes no hidrolisado antes e durante o tratamento com resinas de troca iônica.....	75
<b>Tabela 5.17</b> – Ensaio fermentativo de produção de 2,3-butanodiol, em hidrolisado tratado através da variação do ph e adsorsão com carvão ativo.....	76
<b>Tabela 5.18</b> – Ensaio fermentativo de produção de 2,3-butanodiol, em hidrolisado tratado através de resinas de troca iônica.....	77
<b>Tabela 5.19</b> - Velocidades específicas máximas encontradas durante a fermentação dos dois diferentes hidrolisados empregados.....	82
<b>Tabela 5.20</b> – Parâmetros fermentativos do ensaio conduzido em sistema descontínuo alimentado empregando hidrolisado tratado através da variação do ph e adsorsão com carvão ativo (R1) e hidrolisado tratado com resinas de troca iônica (R2).....	84
<b>Tabela 5.21</b> – Ensaio fermentativo de produção de 2,3-butanodiol, em hidrolisado suplementado apenas com extrato de levedura.....	85
<b>Tabela 5.22</b> – Parâmetros fermentativos do ensaio conduzido em sistema descontínuo alimentado empregando hidrolisado tratado com resinas de troca iônica e suplementado com extrato de levedura.....	86
<b>Tabela 5.23</b> – Ensaio fermentativo de produção de 2,3-butanodiol, em hidrolisado suplementado apenas com extrato de levedura.....	88
<b>Tabela 5.24</b> – Parâmetros fermentativos do ensaio conduzido em sistema descontínuo alimentado empregando hidrolisado tratado com resinas de troca iônica e suplementado com extrato de levedura a uma vazão mássica de 20,4 g/h.....	91

<b>Tabela 5.25</b> – Ensaio fermentativo de produção de 2,3-butanodiol, em hidrolisado suplementado apenas com extrato de levedura e utilizando uma vazão mássica de alimentação de 16,6 g/h.....	92
<b>Tabela 5.26</b> – Parâmetros fermentativos do ensaio conduzido em sistema descontínuo alimentado empregando hidrolisado tratado com resinas de troca iônica e suplementado com extrato de levedura.....	95
<b>Tabela 5.27</b> – Matriz de planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> utilizada.....	96
<b>Tabela 5.28</b> – Estimativa dos efeitos, erros padrão e teste t para a concentração de xilose.....	97
<b>Tabela 5.29</b> – Análise de variância dos fatores temperatura, concentração de sal e interações.....	97
<b>Tabela 5.30</b> – Análise de variância com erro puro dos fatores temperatura, concentração ácida, relação sólido líquido e suas interações.....	98

## SUMÁRIO

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE FIGURAS

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS .....</b>	<b>19</b>
2.1.1. APARAS DE EUCALIPTO .....	20
2.1.2. HIDRÓLISE DA MATÉRIA-PRIMA LIGNOCELULÓSICA .....	21
2.1.3. TRATAMENTOS DO HIDROLISADO .....	26
<b>2.2 2,3-BUTANODIOL.....</b>	<b>32</b>
2.2.1. CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES .....	32
2.2.2. MICRORGANISMOS PRODUTORES .....	33
2.2.3. FATORES QUE INFLUENCIAM A FORMAÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL .....	36
2.2.4. RECUPERAÇÃO DO PRODUTO .....	39
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 MATÉRIA-PRIMA.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ÁCIDA.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3 OBTENÇÃO DO HIDROLISADOHEMICELULÓSICO.....</b>	<b>46</b>
4.3.1 CONCENTRAÇÃO.....	46
4.3.2 TRATAMENTO.....	46
<b>4.4 MICRORGANISMO.....</b>	<b>48</b>
<b>4.5 MEIOS DE CULTIVO.....</b>	<b>49</b>
4.5.1 MEIO DE ATIVAÇÃO.....	49
4.5.2 MEIO DE FERMENTAÇÃO.....	49
4.5.3 MEIO DE ALIMENTAÇÃO .....	50
<b>4.6 INÓCULO.....</b>	<b>50</b>
<b>4.7 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO.....</b>	<b>51</b>
4.7.1 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS TRATAMENTOS.....	51
4.7.2 AVALIAÇÃO DA NECESSIDADE DOS NUTRIENTES.....	51
4.7.3 TESTES DA VAZÃO DE ALIMENTAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO.....	51
4.7.4 OBTENÇÃO DE MEIO FERMENTADO.....	51
<b>4.8 RECUPERAÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL.....</b>	<b>52</b>
<b>4.9 MÉTODOS ANALÍTICOS.....</b>	<b>53</b>
4.9.1 CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES E ÁCIDO ACÉTICO.....	53
4.9.2 CONCENTRAÇÃO DE PRODUTOS.....	53
4.9.3 CONCENTRAÇÃO DE FURFURAL E HIDROXIMETILFURFURAL.....	54
4.9.4 CONCENTRAÇÃO CELULAR.....	54
4.9.5 COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO ( $K_LA$ ).....	54
<b>4.10 METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>5.1 CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO DE EUCALIPTO.....</b>	<b>57</b>



<b>5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA INFLUÊNCIA DA CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE NA EXTRAÇÃO DE AÇÚCARES DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA DAS APARAS DE EUCALIPTO.....</b>	<b>59</b>
<b>5.3 COMPROVAÇÃO DO MODELO.....</b>	<b>69</b>
<b>5.4 ENSAIO DE HIDRÓLISE ÁCIDA EM REATOR DE 50L.....</b>	<b>70</b>
<b>5.5 CONCENTRAÇÃO DO HIDROLISADO.....</b>	<b>71</b>
<b>5.6 DEFINIÇÃO DA MELHOR METODOLOGIA PARA O TRATAMENTO DO HIDROLISADO .....</b>	<b>72</b>
<b>5.7 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS TRATAMENTOS.....</b>	<b>76</b>
<b>5.8 AVALIAÇÃO DA NECESSIDADE DE NUTRIENTES.....</b>	<b>84</b>
<b>5.9 TESTES DA VAZÃO DE ALIMENTAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO.....</b>	<b>88</b>
5.9.1 <i>ENSAIO DE FERMENTAÇÃO UTILIZANDO UMA VAZÃO MÁSSICA DE ALIMENTAÇÃO DE 20,4 G/H.....</i>	<i>88</i>
5.9.2 <i>ENSAIO DE FERMENTAÇÃO UTILIZANDO UMA VAZÃO MÁSSICA DE ALIMENTAÇÃO DE 16,6 G/H.....</i>	<i>92</i>
<b>5.10 RECUPERAÇÃO DO PRODUTO.....</b>	<b>96</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>100</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>102</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>103</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos, tais como os resíduos agrícolas, são uma abundante e renovável fonte de celulose e hemicelulose que podem servir como substratos para produção de diversos compostos químicos, empregando-se processos fermentativos.

Os materiais lignocelulósicos contém açúcares polimerizados que podem ser liberados por hidrólise, e subsequentemente, fermentados por diversos microorganismos. O emprego desses materiais para a produção de 2,3-butanodiol tem sido considerado de interesse na área de conversão de biomassa em combustíveis líquidos e substâncias químicas de interesse industrial.

Nas últimas décadas no Brasil, o eucalipto vem sendo o gênero florestal mais utilizado para aumentar a área de plantações utilizadas com fins industriais, contribuindo assim para o desenvolvimento das indústrias madeireira e de polpa e papel. Em consequência do aumento das plantações de eucalipto grandes quantidades de resíduo são geradas durante o corte da madeira, o que justifica o desenvolvimento de uma tecnologia para o seu aproveitamento.

A produção de 2,3-butanodiol por via fermentativa se justifica pela aplicabilidade deste composto, que pode ser utilizado como anticongelante, devido ao baixo ponto de congelamento do isômero leve (- 60 °C), como combustível líquido e também ser transformado em diversas substâncias de interesse para a indústria, sendo caracterizado como um importante intermediário químico. Entre essas substâncias destacam-se o 1,3-butadieno, principal componente da borracha sintética, e a metil-etil-cetona (MEC), um solvente amplamente empregado na indústria química.

A maioria das substâncias nas quais o 2,3-butanodiol pode ser convertido, atualmente são obtidas a partir do petróleo. Porém, a atividade industrial baseada nessa matéria-prima encontra-se permanentemente ameaçada por problemas de esgotamento ou mesmo políticos. Assim, o desenvolvimento de uma tecnologia para produção de 2,3-butanodiol por fermentação, resultando num custo mais baixo para sua obtenção, constitui uma alternativa estratégica para a obtenção dos compostos mencionados.

O desenvolvimento do processo de produção, no que diz respeito ao aumento da concentração final de produto, é fundamental não apenas sob o aspecto comercial, como também sob o ponto de vista de recuperação do produto do meio fermentado. A extração se torna mais viável economicamente à medida que se obtém maiores concentrações de produto no meio.

A capacidade da *Klebsiella pneumoniae* de utilizar diferentes açúcares para a fermentação faz com que essa espécie, principalmente a cepa NRLL B-199, seja a mais utilizada em estudos de fermentação.

Vários trabalhos realizados no Departamento de Biotecnologia da FAENQUIL empregaram hidrolisado de cavacos de eucalipto para a produção de 2,3-butanodiol obtendo resultados considerados satisfatórios comparados aos resultados da literatura. Também foram desenvolvidos trabalhos utilizando hidrolisado de eucalipto para a produção de xilitol e proteína microbiana.

O presente trabalho visa estudar a produção fermentativa de 2,3-butanodiol utilizando como matéria-prima as aparas de eucalipto, consideradas resíduos florestais relacionados à indústria de papel e celulose, que são acumuladas na natureza durante o corte da madeira.

Especificamente, pretende-se obter um hidrolisado hemicelulósico de eucalipto com elevada concentração de açúcares e baixa concentração de inibidores através do processo de hidrólise ácida; definir um tratamento que proporcione maior remoção de inibidores e menor perda de açúcares; produzir um meio fermentado com elevada concentração de 2,3-butanodiol; definir o processo de recuperação do produto de modo a se obter uma recuperação em torno de 97%.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS**

As madeiras e os resíduos da agroindústria constituem reservas naturais renováveis que vem sendo intensivamente estudadas como fonte de carboidratos para processos fermentativos (Vallander, Eriksson, 1990, citados por MISHRA, SINGH, 1993).

Grandes quantidades de resíduos vegetais e agro-industriais são gerados e acumulados na natureza, ocasionando sérios problemas de poluição ambiental e perdas de fontes potenciais de alto valor (BISARIA, GOHE, 1981). Estes resíduos constituem reservas naturais renováveis e representam uma importante fonte de matérias primas de baixo custo que podem ser utilizadas para obtenção de produtos de alto valor agregado como combustíveis líquidos e compostos químicos (KERN et al., 1998).

O emprego da biotecnologia é uma maneira de fazer com que a biomassa agrícola e florestal, rica fonte de carboidratos (MOHANDAS et al., 1995) se torne um substrato importante para os microrganismos na produção de insumos úteis como furfural (RIPOLI et al., 1990), acetona, ácido acético, butanol, 2,3-butanodiol e ácido butírico (SADDLER et al., 1983), dentre outros produtos.

Os três maiores constituintes da biomassa lignocelulósica são a celulose, a hemicelulose e a lignina, em proporções que variam de 40 a 50%, 15 a 30% e 10 a 30%, respectivamente (DEKKER, 1985). Como exemplo tem-se o eucalipto, com cerca de 40 a 62% de celulose, 12 a 22% de hemicelulose e 15 a 22% de lignina (VITAL, DELLA LUCIA, 1986).

A celulose, principal componente da parede celular da fibra vegetal, é um polímero linear, formado por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 com estrutura cristalina altamente ordenada e alta massa molecular (KUHAD, SINGH, 1993).

A lignina é composta de um conjunto de polímeros amorfos reticulares de alta massa molecular, geralmente associados com a celulose e hemicelulose, com estrutura química fortemente aromática, composta por anéis de benzeno que contém grupos fenólicos livres e metilados (ESPINOSA, 1972; KUHAD, SINGH, 1993).

A hemicelulose é um polímero complexo, constituído das pentoses xilose e arabinose, e das hexoses manose, glicose, galactose e ácidos urônicos (FENGEL, WEGENER, 1989; KUHAD, SINGH, 1993). O principal componente da fração hemicelulósica dos resíduos agro-industriais é a xilana, polímero constituído por unidades de xilose que pode ser hidrolisada usando ácidos minerais. A xilana possui uma estrutura linear constituída de xilopiranosil unidos por ligações  $\beta$ -1,4 que são encontradas em todas as plantas terrestres e compreendem 30% do material da parede celular (VIKARI, et al, 1993)

De acordo com Dale (1987), o custo de vários produtos de fermentação dependem do custo da fonte de carboidrato. Segundo este autor, a conversão de materiais lignocelulósicos oferece potencial para a obtenção de açúcares fermentescíveis de baixo custo.

### **2.1.1. APARAS DE EUCALIPTO**

O eucalipto é originário da Austrália, pertence à família *Myrtaceae*, e é a principal matéria-prima da indústria brasileira de papel e celulose. Nas últimas décadas no Brasil, o eucalipto vem sendo o gênero florestal mais utilizado para aumentar a área de plantações utilizadas com fins industriais, contribuindo assim para o desenvolvimento das indústrias madeireira e de polpa e papel. Somente em 2000 foram plantados 2.964.000 hectares, o que representa 59,5% da área total de plantações florestais no país (FAO, 2000).

Em virtude de seu rápido crescimento, do não comprometimento das florestas nativas e da aplicabilidade de sua madeira para diversos fins, o eucalipto tem sido a essência florestal mais procurada para reflorestamento no Brasil (GOMES, COUTO, 1986), o qual teve início em 1967 com o plantio de 13.877 hectares do mesmo em vários estados do país (MAGALHÃES, 1986).

Atualmente o Brasil é um dos países que mais realiza reflorestamento, ocupando o 3º lugar entre os países de clima tropical, com uma área plantada de 7 milhões de hectares, o que representa 16% dos 44 milhões registrados pela FAO (Food and Agriculture Organization) em 1994. O Governo do Estado de São Paulo tem planejado incrementar a área de plantações de eucalipto de 750 mil hectares em 1990 para valores entre 1,5 e 2,8 milhões de hectares no ano 2015 (FEARNSIDE, 1998).

Em consequência do aumento das plantações de eucalipto grandes quantidades de resíduo são geradas durante o corte da madeira, o que justifica o desenvolvimento de uma tecnologia para o seu aproveitamento. Conforme estudos realizados por Brito et al. (1979), somente 51,7% do peso seco total do eucalipto é aproveitado pela indústria brasileira, permanecendo o restante no campo na forma de folhas, galhos, copas e madeiras finas.

### **2.1.2. HIDRÓLISE DA MATÉRIA-PRIMA LIGNOCELULÓSICA**

Vários processos vêm sendo desenvolvidos visando o fracionamento da biomassa vegetal em seus principais constituintes para a posterior utilização da fração hemicelulósica que apresenta como principal componente a xilose (FENGEL, WEGENER, 1989). Os métodos mais usados são a hidrólise enzimática e a hidrólise ácida (KUHAD, SINGH, 1993).

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é um processo que tem sido muito estudado nos últimos anos pela sua especificidade e por originar poucos subprodutos, mas é um processo lento e de pouca viabilidade técnico-econômica, devido à estrutura e configuração espacial do complexo lignina-celulose-hemicelulose (PULS, SCHUSEIL, 1993).

Segundo Parisi (1989), citado por Palmqvist et al. (2000), a hidrólise enzimática leva a um maior rendimento em monossacarídeos que a hidrólise ácida, devido a enzima celulase catalisar somente as reações de hidrólise e não as reações de degradação. De acordo com Tsao (1986) os principais fatores que limitam um maior desenvolvimento da hidrólise enzimática da celulose são: a dificuldade de produção das enzimas celulolíticas; a baixa estabilidade térmica das enzimas nas condições do processo, os baixos rendimentos obtidos em consequência da inibição das reações pelos produtos e a necessidade de pré-tratamentos que permitam o acesso das enzimas ao substrato.

A hidrólise ácida é um dos processos mais utilizados para a separação da hemicelulose da biomassa lignocelulósica (McMillan, 1992 citado por KIM et al., 2000). Baseia-se em uma técnica de operação realizada em temperaturas entre 120 e 200 °C, com a adição de pequenas quantidades de ácido como H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e HCl, e que promove pouca degradação de açúcares e da lignina (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b). Segundo Mcmillan (1994a), a hidrólise completa da hemicelulose ocorre entre 5 e 10 minutos para uma temperatura de 160 °C, ou entre 30 e 60 minutos para uma temperatura de 140 °C. De acordo com Jeffries et al. (1985), devido a estrutura ramificada das xilanas e ao seu grau de cristalinidade ser inferior ao da celulose, as ligações glicosídicas entre os monômeros de D-xilose na hemicelulose são menos estáveis que as ligações glicosídicas entre os monômeros de D-glicose na celulose. Como conseqüência, as pentoses podem ser facilmente extraídas do material lignocelulósico através deste método de hidrólise.

Segundo Hespell et al. (1997), citados por Pessoa Jr et al. (1997), uma das principais vantagens da hidrólise ácida é produzir pentoses solúveis que podem ser fisicamente separadas do resíduo. A mistura de açúcares produzida pela hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos não é desfavorável ao processo fermentativo de produção de 2,3-butanodiol devido a capacidade da bactéria *Klebsiella pneumoniae* em utilizar diferentes açúcares, como já foi observado em diversos trabalhos (GARCIA, 1999; SADDLER et al., 1983; YU et al, 1984; PRATA, 1997).

Segundo Mcmillan (1994a), o tratamento empregado deve ser eficiente do ponto de vista energético e químico, para que o processo seja economicamente vantajoso, e deve promover ou proporcionar a conversão efetiva do carboidrato de interesse, para se obter um produto final com alto rendimento. Logo, a degradação ou a perda de carboidratos deve ser evitada, bem como a formação de compostos inibidores do metabolismo celular ou da ação de enzimas usadas nos processos de conversão da biomassa. Esta condição também é mencionada por Garg, Jain (1995) em sua revisão sobre produção fermentativa de 2,3-butanodiol. Como exemplo pode-se citar o trabalho de Shan, Lee (1994), que desenvolveram um processo de produção de acetona-butanol a partir de madeira, através do sistema de fermentação extrativa e sacarificação associadas. Neste estudo foram empregadas enzimas que hidrolisam as frações celulósica e hemicelulósica da madeira.

Gong et al. (1997) citam um processo de sacarificação e fermentação simultânea para a produção de 2,3-butanodiol a partir de material lignocelulósico. Neste processo as frações de celulose e hemicelulose são hidrolisadas pela celulase

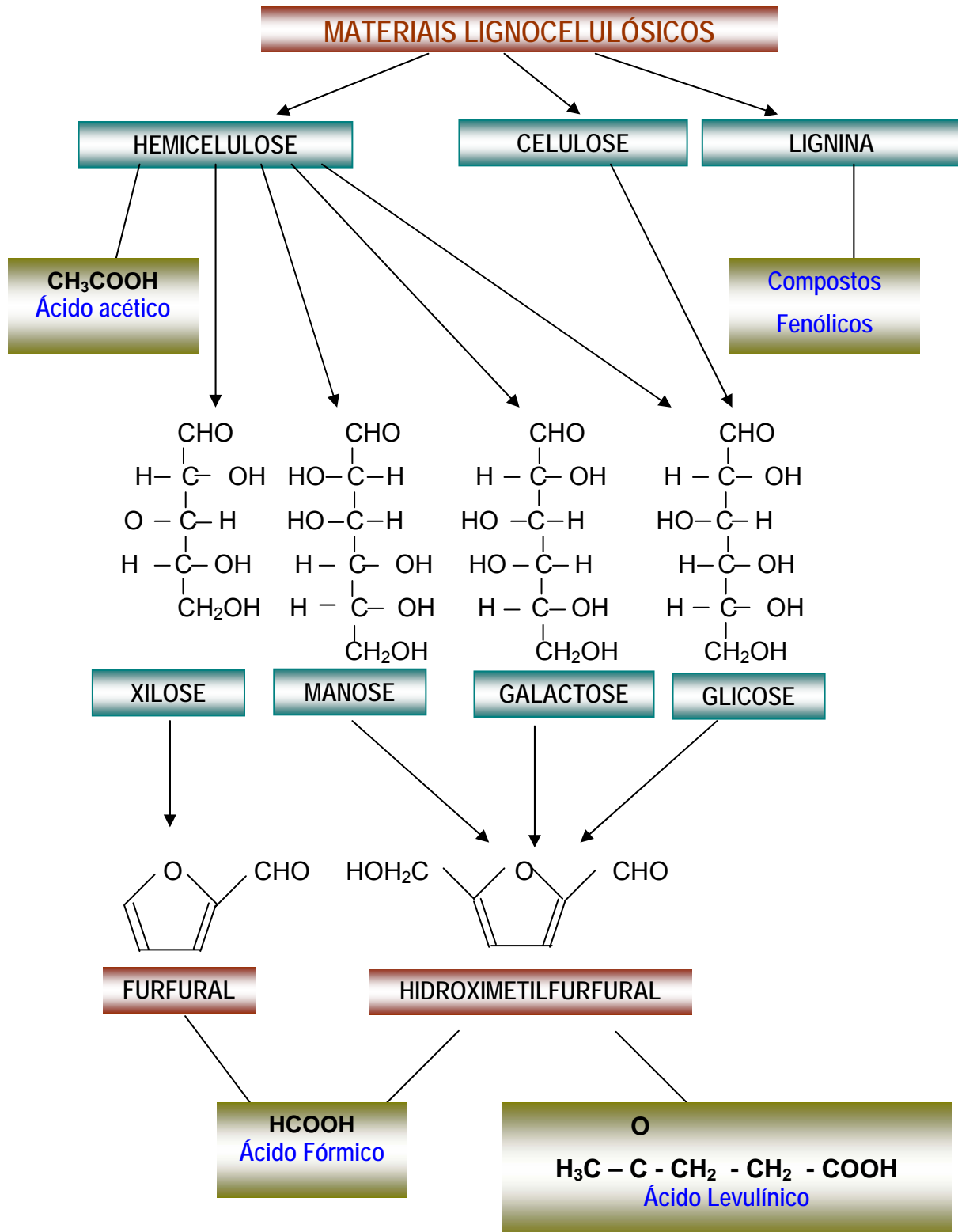
obtendo-se glicose, xilose e uma mistura de outros açúcares em menor quantidade, predominando arabinose. Simultaneamente estes açúcares são convertidos a 2,3-butanodiol pela bactéria *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Neste processo, obtiveram-se maiores velocidades de hidrólise e rendimento em produto quando comparados com aqueles envolvendo hidrólise e fermentação separadas.

Um dos principais problemas relativos a utilização de hidrolisados hemicelulósicos é a presença de substâncias inibidoras do metabolismo dos microrganismos fermentadores (YU et al.,1982). Tais inibidores são liberados ou formados durante o processo de hidrólise ácida dos materiais lignocelulósicos (FRAZER, McCASKEY, 1989).

Segundo Leonard, Hajny (1945), citados por Frazer, Mccaskey (1991), existem quatro grupos de inibidores microbianos encontrados no hidrolisado ácido de madeira. Um grupo consiste dos inibidores derivados dos metais ou minerais presentes na madeira ou nos equipamentos de hidrólise. Outro grupo consiste dos produtos da decomposição de carboidratos, incluindo furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético. Os outros grupos são formados de compostos fenólicos, incluindo os produtos da degradação da lignina e compostos derivados dos extrativos de madeira. As principais vias de degradação dos materiais lignocelulósicos estão esquematizadas na Figura 3.1 (PALMQVIST et al., 2000).

De acordo com Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000b), o efeito inibitório do furfural tem sido relacionado com a redução da velocidade específica de crescimento do microrganismo. Parajó et al. (1997) verificaram que em concentrações de 1,3 a 3,2 g/L, o furfural apresenta efeito inibitório. Porém em concentrações inferiores a 1 g/L, este efeito pouco influencia o processo fermentativo.





**Figura 2.1** - Reações que ocorrem durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos (PALMQVIST *et al.*, 2000)

Segundo Nigam (2001), a adição de 0,27 g/L de furfural no meio de fermentação não foi suficiente para reduzir o rendimento e a produtividade em etanol durante fermentação com *Pichia stipitis*. Entretanto, a adição de 1,5 g/L de furfural foi capaz de reduzir o rendimento e a produtividade em etanol em 90,4 e 85,1%, respectivamente, ou seja, altas concentrações de furfural inibiram diretamente a respiração e o crescimento da levedura, diminuindo a produção de etanol.

Em relação ao hidroximetilfurfural, Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000b) relataram que seu mecanismo de inibição é muito similar ao do furfural, causando um aumento na fase lag de crescimento do microrganismo. Porém, o hidroximetilfurfural é considerado menos tóxico que o furfural. Azhar (1981), citado por Alves et al. (1998), verificou que a concentração de 1,0 g/L deste composto foi suficiente para inibir o crescimento celular e a fermentação por *S. cerevisiae*.

Vários compostos são liberados da estrutura da lignina durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos, dentre estes, os compostos fenólicos têm sido considerado como responsáveis por um grande efeito inibitório na fermentação de hidrolisados lignocelulósicos, sendo considerados mais tóxicos, os compostos fenólicos de baixa massa molecular (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b). Segundo Clark e Macki (1984), citados por Parajó *et al.* (1998c), dentre os inibidores do metabolismo de xilose, os produtos de degradação da lignina são mais tóxicos que o furfural e o hidroximetilfurfural, mesmo quando presentes em baixas concentrações. Os compostos fenólicos provocam uma perda na integridade da membrana celular, e, como consequência, afetam a habilidade desta em atuar como barreira seletiva. Desta forma, ocorre uma redução no crescimento celular e na assimilação de açúcares (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

O ácido acético é o principal derivado dos grupos acetila liberados das xilanas acetiladas nos hidrolisados hemicelulósicos. Quando presente em altas concentrações no meio, tem sido apontado como o principal inibidor da atividade fermentativa (FERRARI et al., 1992). Segundo Lawford et al. (1993), o efeito tóxico do ácido acético deve-se à sua presença no meio sob a forma não dissociada, o que é dependente do pH. Em valores de pH baixo, este ácido apresenta-se na forma não dissociada, a qual se difunde livremente pela membrana citoplasmática. Ao entrar na célula e encontrar um pH interno igual a 7,4, este ácido se dissocia no plasma celular liberando prótons  $H^+$ . A enzima ATPase existente na membrana da célula, tem a função de expulsar os prótons do interior desta, de forma a manter a

integridade da célula. Quando a concentração de ácido acético aumenta, a atividade da enzima ATPase também aumenta, porém, dependendo da concentração de ácido, esta enzima pode não conseguir bombear os prótons para fora da célula. Em consequência disto, cada vez mais o pH intracelular vai se acidificando e inibindo a atividade da célula, que pode chegar à morte (KUSUMEGI et al., 1998).

A presença de íons metálicos nos hidrolisados hemicelulósicos, oriundos da corrosão de equipamentos podem, dependendo de suas concentrações no meio de fermentação, afetar o crescimento microbiano. Watson et al. (1984), estudaram os efeitos em meio sintético dos íons Fe, Cu, Cr e Ni sobre o crescimento de *P. tannophilus* e constataram que tanto o Cu como o Cr, nas concentrações de até 0,004 e 0,010 g/L, respectivamente, não afetaram a velocidade específica máxima de crescimento, mas 0,1 g/L de Ni<sup>+2</sup> reduziu este valor em 60%.

Os tipos e as quantidades dos compostos tóxicos variam de acordo com a matéria-prima utilizada e com as condições de hidrólise empregadas (CRUZ et al., 2000; TAHERZADEH et al., 2000a). No processo de hidrólise ácida dos materiais lignocelulósicos, a temperatura, o tempo e a concentração de ácido utilizada são fatores que influenciam na formação destes compostos (CRUZ et al., 2000; PALMQVIST, HAHN-HÄGERDAL, 2000b). Cruz et al. (2000) verificaram que tempos de reação prolongados (acima de 1 hora) provocam um decréscimo na concentração de xilose, devido ocorrerem reações de degradação deste açúcar.

### **2.1.3. TRATAMENTOS DO HIDROLISADO**

Vários tratamentos que visam a remoção dos inibidores presentes nos hidrolisados são mencionados na literatura, sendo que alguns se baseiam na precipitação através de elevação e abaixamento do pH (SJOLANDER et al., 1938; TRAN, CHAMBERS, 1986; PRATA, 1997), outros na extração com resinas de troca iônica ou de adsorção (MADDOX, MURRAY, 1983; FRAZER, McCASKEY, 1989; VIÑALS, 2001) e com carvão ativo (FRAZER, McCASKEY, 1989), e outros empregam a extração com solventes (FRAZER, McCASKEY, 1989) ou combinações desses tratamentos (TRAN, CHAMBERS, 1986; FRAZER, McCASKEY, 1989; RODRIGUES et al., 1995; GARCIA, 1999).

O processo de precipitação através da alteração do pH causa efeitos benéficos como uma parcial remoção de ácidos (acético e tânico) e compostos fenólicos, precipitação de íons metálicos pesados e conversão de furfural em ácido furfurílico, no entanto os açúcares podem ser parcialmente degradados (SILVA et al., 1991; ROBERTO et al., 1994). Outro problema associado ao tratamento com carvão ativo e precipitação por variação do pH é a perda de açúcar fermentescível (RODRIGUES et al., 1995) e a redução de volume (ZANÃO, 2001).

Em estudos realizados com hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar tratados pelo método de alteração de pH observou-se uma eliminação total do furfural, no entanto, a redução do ácido acético não foi significativa (FELIPE et al., 1993).

O processo de adsorção com carvão ativo é um dos mais usados para a remoção de compostos inibidores. Estudos realizados com hidrolisados de carvalho vermelho relatam diminuição na concentração de compostos inibidores como ácido acético e compostos fenólicos quando os mesmos foram tratados com carvão ativo (TRAN, CHAMBERS, 1986).

Rodrigues et al. (1995) verificaram a influência da elevação do pH e do uso de carvão ativo na redução dos níveis de inibidores e de Carboidratos Redutores Totais (CRT) presentes no hidrolisado hemicelulósico de eucalipto obtido por hidrólise ácida. Os autores constataram que a elevação do pH para 8,0 e a adição de carvão ativo é o procedimento mais adequado, uma vez que proporciona uma menor perda de açúcares associada a maior redução de impurezas.

Prata, Hiss (1998) verificaram que o tratamento por elevação de pH com CaO e abaixamento com  $H_2SO_4$  combinado com adsorção por carvão ativo proporcionaram melhores resultados de crescimento da bactéria *Klebsiella pneumoniae* em meio preparado com hidrolisado hemicelulósico obtido por hidrólise ácida de cavacos de eucalipto.

As resinas de troca iônica são compostos macromoleculares constituídos por um esqueleto tridimensional na qual fixam-se os grupos ativos. Segundo Vogel (1992), as exigências fundamentais para uma resina útil são:

- A resina deve ser suficientemente reticulada para que sua solubilidade seja desprezível.

- A resina deve ser suficientemente hidrofílica para permitir a difusão dos íons através da estrutura, a uma velocidade finita e praticamente utilizável.

- A resina deve conter um número de grupos trocadores de íons acessíveis e deve ser quimicamente estável.

- A resina inchada deve ser mais densa que a água.

As resinas permitem trocar os íons não desejáveis da solução problema por aqueles que encontram-se saturando seus grupos funcionais. Este processo de equilíbrio pode ser representado da seguinte forma:  $RA + B \rightarrow RB + A$ , onde RA e RB representam as resinas na forma A e B, respectivamente, e A e B, os íons trocados. As reações de troca iônica são estequiométricas, reversíveis e possíveis com qualquer composto ionizável. A natureza reversível da reação permite o repetido uso de resinas desde que estas não sofram mudanças substanciais da sua estrutura. A velocidade da reação depende da seletividade da resina (DECHOW, 1989). Como características principais das resinas encontram-se a não-solubilidade em água e em solventes orgânicos e inorgânicos mais comuns. Possuem uma estrutura hidrofílica de forma regular e reproduzível, rápida velocidade de troca e estabilidade física em termos de força mecânica e resistência a atrição (HARLAND, 1994).

As resinas de troca iônica são classificadas, segundo os grupos ativos, em catiônica ácido forte (fortemente ácidas), catiônicas ácido fraco (fracamente ácidas), aniônicas base forte (fortemente básicas) e aniônicas base fraca (fracamente básicas) (Tabela 2.1), e, segundo a estrutura polimérica, as resinas podem se classificar em estirênicas e acrílicas.

A capacidade de troca máxima das resinas é um parâmetro importante no processo de troca iônica e varia segundo às suas características, relacionando o tamanho dos poros e a área superficial com as características das soluções a serem tratadas (densidade e viscosidade). Esta capacidade é influenciada também pelos canais preferenciais que podem formar-se no leito das resinas, pelo fluxo de alimentação empregado, pelas obstruções e pela eficiência da regeneração (VIÑALS, 2001).

**Tabela 2.1 Classificação das resinas de troca iônica**

<i>Classificação</i>	<i>Grupo funcional</i>	<i>Forma iônica</i>
Catiônica ácido forte	-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> H <sup>+</sup> ; -SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>
Catiônica ácido fraco	-COO <sup>-</sup>	-COO <sup>-</sup> H <sup>+</sup>
Aniônica base forte Tipo1	-CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup>	-CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>
Aniônica base forte Tipo2	CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH) <sup>+</sup>	-CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH) <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>
Aniônica base fraca	-CH <sub>2</sub> NH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	-CH <sub>2</sub> NH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>

A seletividade das resinas depende de fatores como a valência e o tamanho do íon trocado, a forma iônica da resina, a força iônica total da solução, entrecruzamento das resinas, o tipo de grupo funcional e a natureza dos íons não trocados. A seguinte seqüência representa a ordem de afinidade de diferentes resinas por íons que se encontram em soluções diluídas segundo HARLAND (1994):

- Resina catiônica ácido forte (estirênica-sulfonato): Ag<sup>+</sup> > Cs<sup>+</sup> > K<sup>+</sup> > NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> > H<sup>+</sup> > Li<sup>+</sup>, Ba<sup>2+</sup> > Pb<sup>2+</sup> > Ag<sup>2+</sup> > Sr<sup>2+</sup> > Ca<sup>2+</sup> > Ni<sup>2+</sup> > Cd<sup>2+</sup> > Cu<sup>2+</sup> > Co<sup>2+</sup> > Zn<sup>2+</sup> > Mg<sup>2+</sup>
- Resina catiônica ácido fraco (acrílicas-carboxilato): H<sup>+</sup> >> Cu<sup>2+</sup> > Pb<sup>2+</sup> > Ni<sup>2+</sup> > Co<sup>2+</sup> > Fe<sup>2+</sup> > Ca<sup>2+</sup> > Mg<sup>2+</sup> > Na<sup>+</sup> > K<sup>+</sup> > Cs<sup>+</sup>
- Resinas aniônicas base forte tipo 1 (estirênica-amônio quaternário): SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > HSO<sub>4</sub><sup>-</sup> > I<sup>-</sup> > NO<sub>3</sub><sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> > HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> > HSiO<sub>3</sub><sup>-</sup> > F<sup>-</sup> > HO<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> > ClO<sub>3</sub><sup>-</sup> > NO<sub>3</sub><sup>-</sup>
- Resinas aniônicas base forte tipo 2 (estirênica-amônio quaternário): SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > HSO<sub>4</sub><sup>-</sup> > I<sup>-</sup> > NO<sub>3</sub><sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> > HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> > HO<sup>-</sup> > HSiO<sub>3</sub><sup>-</sup> > F<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> > ClO<sub>3</sub><sup>-</sup> > NO<sub>3</sub><sup>-</sup>
- Resinas aniônicas base fraca (estirênicas-amina): OH<sup>-</sup> >> SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > HSO<sub>4</sub><sup>-</sup> > I<sup>-</sup> > NO<sub>3</sub><sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> > F<sup>-</sup>

As resinas de troca iônica removem impurezas ácidas presentes nos hidrolisados hemicelulósicos, principalmente o ácido mineral usado no processo de hidrólise, além de outros íons orgânicos de compostos como corantes, taninos, furanos, ácidos orgânicos, compostos nitrogenados complexos, e inorgânicos como silicatos, cinzas e nitrogenados. Em razão disso vêm sendo empregadas para

purificação dos diferentes hidrolisados hemicelulósicos (PARAJÓ et al.,1996 e 1998).

Dominguez et al. (1996) avaliaram a combinação de resina catiônica (*DOWEX* 50WX4) e neutralização com  $\text{CaCO}_3$  para tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana com vistas à obtenção de xilitol. Os resultados demonstraram que o tratamento reduziu a atuação dos agentes tóxicos e favoreceu a formação de xilitol, que aumentou de 10 g/L para 28 g/L em 96 h de fermentação com a levedura mutante *Candida* sp 11-2, comparado ao tratamento que empregou somente neutralização com  $\text{CaCO}_3$ .

Kulkarni et al. (1998) utilizaram as resinas *DUOLITE* catiônica C-20 ( $\text{H}^+$ ) e a aniônica A-368 ( $\text{OH}^-$ ) para purificação de xarope de D-xilose obtido de casca de algodão em rama. Empregando-se colunas de vidro encamisadas de 140 cm de comprimento por 1,05 cm de diâmetro interno, sob diferentes temperaturas (30, 40 e 50 °C) e fluxos de alimentação (5, 10 e 15  $\text{V}_L/\text{h}$ ,  $\text{V}_L/\text{h}$ : volume de leito por hora). Observou-se que a temperatura de 30 °C e o fluxo de alimentação de 10  $\text{V}_L/\text{h}$  com a resina C-20 combinada com a resina A-368 a 40 °C e fluxo de alimentação de 15  $\text{V}_L/\text{h}$ , resultou a remoção de 93,6% de fenóis e 100% da coloração. Segundo os autores o fluxo de alimentação influencia na difusão das moléculas, porém a remoção dos fenóis permaneceu com valores de 89,93, 90,97 e 92,97% para os respectivos fluxos de 5, 10 e 15  $\text{V}_L/\text{h}$ .

Nivelbrant et al. (2001), pesquisando a utilização de resina aniônica forte ( $\text{OH}^-$ ) para o tratamento do hidrolisado de madeira, constataram em pH 5,5 a redução de 91% dos ácidos alifáticos (ácidos fórmico, acético, láctico, oxálico e levulínico). Segundo estes autores esta remoção foi muito eficiente devido à maioria dos ácidos encontrarem-se na forma ionizada neste valor de pH. Ao aumentar o pH do hidrolisado a remoção diminuiu para 38%, devido aos grupos fenólicos encontrarem-se ionizados, e contribuírem aumentando a competição com os ácidos alifáticos pelos sítios catiônicos e, conseqüentemente, a retenção destes ácidos é menor pelo trocador aniônico forte.

Viñals (2001) utilizou diferentes resinas de troca iônica no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para obtenção biotecnológica de xilitol, e a máxima produtividade volumétrica obtida foi de 0,679 g/L.h, quando utilizou uma seqüência formada pelas resinas aniônicas A-860S e A-500, seguida da

catiônica C-150 e finalizada com a resina aniônica fraca A-103S, todas da PUROLITE. Para esta condição de melhor produtividade, obteve-se 100% na remoção de ácido acético, 100% na remoção de furfural, 100% na remoção de hidroximetilfurfural, 86,44% na remoção de fenóis e 97,48% na remoção de cor.

Segundo Frazer, Mccaskey (1989), o emprego de resina de troca iônica é o processo que leva aos melhores resultados (96% do rendimento teórico). Além das resinas, estes autores obtiveram valores de  $Y_{p/s}$  em torno de 0,3 g/g, empregando carvão ativo, etil-acetato, clorofórmio, tricloroetileno, benzeno e hexano, após neutralização do hidrolisado com hidróxido de cálcio, indicando serem esses tratamentos promissores para a remoção dos inibidores do metabolismo microbiano.

O hidrolisado obtido por hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos necessita ser concentrado, para aumentar o teor de açúcares, antes de ser utilizado como substrato num processo fermentativo como a produção de 2,3-butanodiol. Isto porque a concentração de açúcar do meio deve estar próxima de 100 g/L (SILVEIRA, 1991) e o hidrolisado é obtido com cerca de 25 g/L, (ALMEIDA E SILVA, 1996). Zanão (2001) verificou que o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto antes de ser concentrado proporciona menores perdas de açúcar comparado com o tratamento do hidrolisado já concentrado. Fato semelhante foi observado por Rodrigues *et al.* (2001), no tratamento de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.

Converti *et al.* (2000) estudaram os processos de explosão com vapor e pré-hidrólise com ácido sulfúrico diluído para a hidrólise de *Eucalyptus globulus* para a produção de xilitol. Os autores concluíram que o primeiro é capaz de hidrolisar mais rapidamente a madeira, mas o hidrolisado produzido desta maneira requer fortes tratamentos de destoxificação. A precipitação através da elevação e abaixamento do pH e a adsorção com carvão ativo foram mais adequados para a remoção dos compostos derivados da lignina.

Visando contornar os problemas causados pelos inibidores foram realizados experimentos de adaptação do microrganismo ao hidrolisado (FRAZER, McCASKEY, 1989), o que possibilitou a obtenção de inóculo capaz de se desenvolver e produzir maior quantidade de 2,3-butanodiol quando comparado com o inóculo obtido em meio sintético. Além desses, estudos realizados com diversos inibidores oriundos do processo de hidrólise ácida demonstraram que pelo menos alguns desses compostos podem ser metabolizados por *Klebsiella pneumoniae* ou ter seu efeito inibidor atenuado com o prolongamento do tempo de incubação



(NISHIKAWA et al., 1988). Frazer, Mccaskey (1991) verificaram que os compostos fenólicos (seringaldeído e vanilina) são os maiores inibidores do crescimento e da produção de 2,3-butanodiol por *Klebsiella pneumoniae*.

## 2.2 2,3-BUTANODIOL

### 2.2.1 CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES

O 2,3-butanodiol, um líquido incolor e inodoro, também conhecido como 2,3-butilenoglicol, 2,3-dihidroxitbutano e dimetileno glicol, principal produto da fermentação butileno-glicólica, é um composto de grande interesse econômico.

O fato de possuir um elevado ponto de ebulição (aproximadamente 180 °C) faz com que o processo de recuperação por destilação seja inviável. Por outro lado, o baixo ponto de congelamento do isômero leve (- 60 °C) é a base do interesse comercial para uso como anticongelante (Clendening, 1946; Clendening, Wright, 1946; citados por MAGEE, KOSARIC 1987). Pode também ser utilizado como combustível líquido, uma vez que possui um calor de combustão (27.200 kJ/kg) maior que o do metanol (22.100 kJ/kg) e próximo ao do etanol (29.100 kJ/kg). SOLTYS et al. (1998) empregaram 2,3-butanodiol para o congelamento de fígado de rato, e Evans, Azeman (1998) estudaram as propriedades do dimetil sulfóxido e do 2,3-butanodiol como crioprotetores. Além dessas, várias outras aplicações para o 2,3-butanodiol são citadas na revisão elaborada por Magee, Kosaric, (1987). Uma característica importante desse solvente é a sua grande potencialidade como intermediário químico, principalmente em substituição a derivados do petróleo.

O 2,3-butanodiol é um composto biodegradável, sendo que *Klebsiella pneumoniae*, que é capaz de produzi-lo, é também capaz de consumi-lo. Essa biodegradabilidade significa que o 2,3-butanodiol pode ser empregado como um solvente ou agente de ligação para a produção de tintas e polímeros, os quais não agredem o meio ambiente (AFSCHAR et al., 1993).

O 2,3-butanodiol pode ser obtido tanto por via fermentativa como por via sintética. A produção por via fermentativa se deu em razão da necessidade de obtenção do 1,3-butadieno para fabricação da borracha sintética na época da segunda guerra mundial (PRESCOTT, DUNN, 1959). Segundo Voloch et al. (1985)

com o desenvolvimento da rota química de obtenção do 1,3-butadieno a partir do petróleo, o processo fermentativo de produção de 2,3-butanodiol tornou-se inviável. Os principais produtos do processo fermentativo são: 2,3-butanodiol, acetil-metil-carbinol (acetoina) e etanol. A partir do primeiro, uma série de compostos importantes podem ser obtidos, conforme mostrado na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2 Processo de obtenção e aplicações de alguns derivados de 2,3-butanodiol**

COMPOSTO	PROCESSO	FINALIDADE	REFERÊNCIA
<b>Metil-etil-cetona</b>	Desidratação catalisada por ácido	Solvente industrial e aditivo para combustível	NEISH, LEDINGHAM (1949)
<b>Éter tetra-metílico</b>	Reação com acetona	Mistura à gasolina	VOLOCH <i>et al.</i> (1985)
<b>Diacetil</b>	Desidrogenação Catalítica	Aditivo para alimentos	MAGEE, KOSARIC (1987)
<b>1,3-butadieno</b>	a – Desidrogenação catalítica de 2-butenol b – Esterificação com ácido acético e pirólise do diacetato formado	Borracha Sintética	MAGEE, KOSARIC (1987)
<b>Diésteres do butanodiol</b>	Esterificação	Plastificantes de polímeros termoplásticos	VOLOCH <i>et al.</i> (1985)

### 2.2.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES

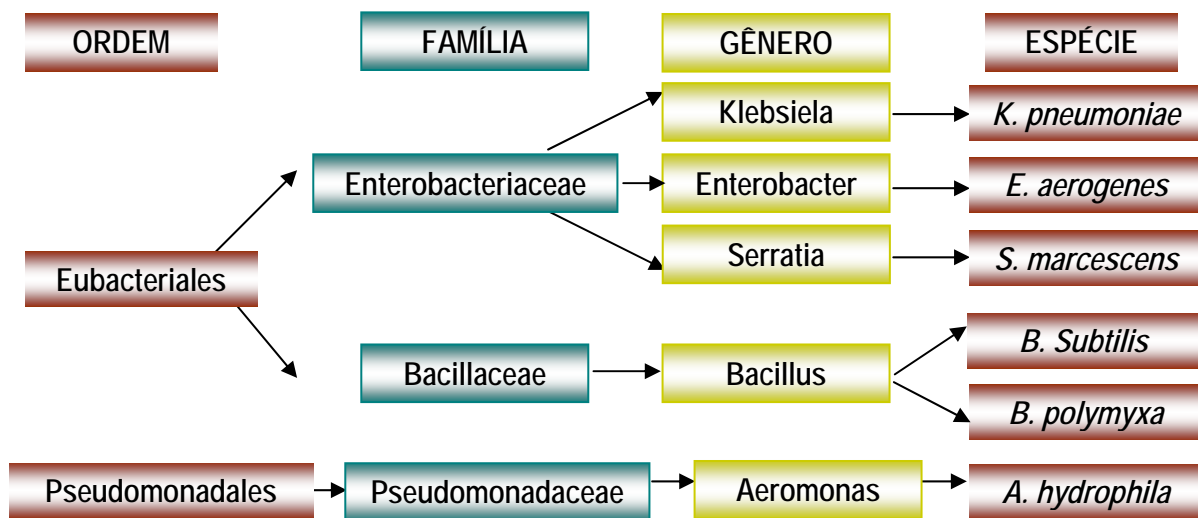
Várias espécies microbianas são capazes de sintetizar o 2,3-butanodiol como produto final da fermentação. A Figura 2.2 apresenta as principais espécies que são encontradas no gênero *Klebsiella*, *Bacillus*, *Serratia* e *Pseudomonas* (MAGEE, KOSARIC, 1987). Conventi *et al.* (2001) utilizaram *Enterobacter aerogenes* e *Bacillus licheniformis* para a produção de 2,3-butanodiol.

A maioria das pesquisas sobre a fermentação butileno-glicólica utiliza *Klebsiella pneumoniae* como agente fermentador (JANSEN *et al.*, 1984; PRATA, 1997; FRAZER, McCASKEY, 1989; GARCIA, 1999). As principais características dessa bactéria são a estabilidade genética (LONG, PATRICK, 1963), evitando problemas de degeneração por sucessivas repicagens; a flexibilidade quanto a utilização de substratos para a fermentação, sendo capaz de metabolizar todos os principais açúcares presentes nos hidrolisados hemicelulósicos (YU, SADDLER, 1982) e celulósicos (YU *et al.*, 1984); a ausência de problemas de inibição pelo

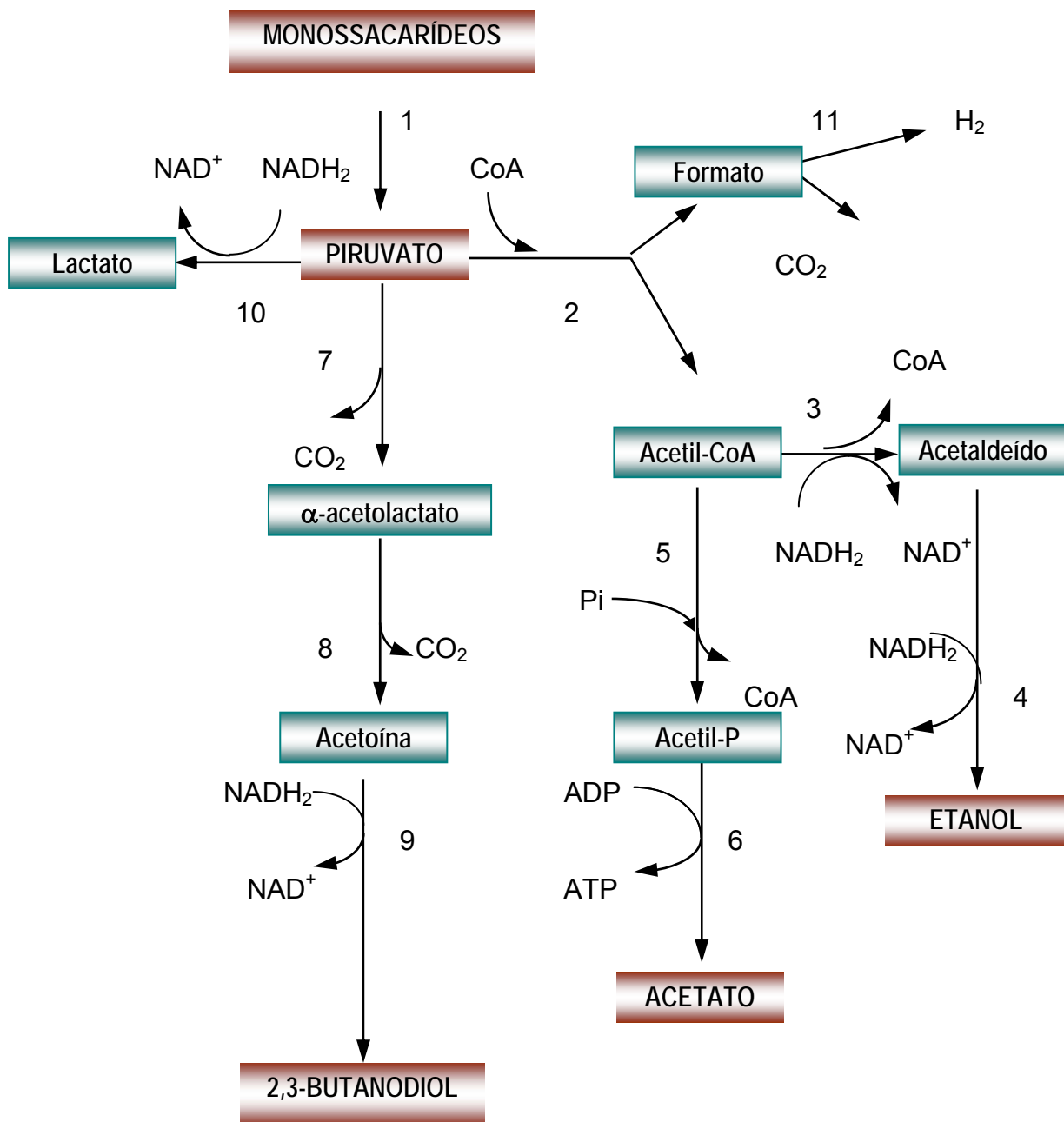
produto formado, podendo chegar a concentrações de 2,3-butanodiol de 80 g/L (SABLAYROLLES, GOMA, 1982) ou 90 g/L (TSAO, 1986) no meio de fermentação.

A capacidade da *Klebsiella pneumoniae* de utilizar diferentes açúcares para a fermentação faz com que essa espécie, principalmente a cepa NRLL B-199, seja a mais utilizada em estudos de fermentação de melaço (LONG, PATRICK, 1963), soro de leite (BARRET et al., 1983), hidrolisados celulósicos (YU et al., 1984), hemicelulósicos (SADDLER et al., 1983; GARCIA, 1999) e amiláceos (WARD et al., 1945), caldo de cana (BERBERT, 1995) e outros. Eiteman, Miller (1995) observaram que a bactéria *Klebsiella pneumoniae* é também capaz de metabolizar o ácido succínico e produzir 2,3-butanodiol a partir do mesmo.

O mecanismo bioquímico de formação dos compostos resultantes da fermentação butileno-glicólica é apresentado na Figura 2.3.



**Figura 2.2** – Classificação das principais bactérias produtoras de 2,3-butanodiol (MAGEE, KOSARIC, 1987)



- |   |                                |
|---|--------------------------------|
| 1. Enzimas do ciclo das pentoses e/ou via glicolítica | 7. Acetolactato sintase        |
| 2. Piruvato-formiato liase                            | 8. Acetolactato descarboxilase |
| 3. Acetaldeído desidrogenase                          | 9. Acetoína redutase           |
| 4. Etanol desidrogenase                               | 10. Lactato desidrogenase      |
| 5. Fosfo-transacetilase                               | 11. Formiato-hidrogênio liase  |
| 6. Acetato quinase                                    |                                |

**Figura 2.3** – Vias metabólicas de formação dos produtos da fermentação de carboidratos por *Klebsiella pneumoniae*.

### 2.2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A FORMAÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL

Vários fatores influenciam a formação de 2,3-butanodiol. Um destes é a concentração inicial de substrato no meio de fermentação. De acordo com dados de literatura (JANSEN et al., 1984; SABLAYROLLES, GOMA, 1982) a concentração de glicose ou xilose que resulta nos maiores valores de produtividade é 100 g/L, quando se trabalha com processos aerados em sistema descontínuo. O mesmo valor foi encontrado por Silveira (1991), na fermentação de sacarose em sistema descontínuo. Isto se deve ao fato de o microrganismo ser inibido em concentrações acima desse valor (SABLAYROLLES, GOMA, 1982). Embora se tenha observado um aumento de velocidade específica de formação de produto com o aumento da concentração inicial de substrato, observou-se nítido decréscimo da velocidade específica de crescimento, comprometendo a produtividade (JANSEN et al., 1984; SABLAYROLLES, GOMA, 1982). Segundo Esener (1981), a velocidade específica de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* diminui aproximadamente dez vezes com o decréscimo da atividade de água de 0,995 para 0,975. Esta baixa resistência osmótica pode explicar a inibição que altas concentrações de substrato provocam sobre esta bactéria. Uma das formas de se evitar o problema é a condução do processo em regime de batelada alimentada, o que permite ainda atingir altas concentrações de produto no meio (OLSON, JOHNSON, 1948).

Para minimizar a inibição do crescimento celular em altas concentrações de substrato, durante a produção de 2,3-butanodiol a partir do melaço, Afschar *et al.* (1991) empregaram o sistema de batelada com pulso de substrato, e obtiveram uma concentração de 98,6 g/L de 2,3-butanodiol.

A ótima concentração de açúcar depende do tipo de matéria-prima utilizada como fonte de carbono, pois um aumento na concentração de açúcares proporciona também um aumento da concentração de possíveis inibidores existentes no meio, como por exemplo, o meio proveniente de materiais lignocelulósicos (MADDOX, 1988).

O suprimento de oxigênio é um dos principais parâmetros que afetam a fermentação butileno-glicólica. Jansen et al. (1984) e Sablayrolles, Goma (1982) mostraram que a velocidade específica de formação de produto por *Klebsiella pneumoniae* é mais alta quando a concentração de oxigênio dissolvido se aproxima de zero. Entretanto, devido à baixa concentração celular, os rendimentos

não são satisfatórios. A aeração é necessária para a formação de massa celular, enquanto que a queda do oxigênio dissolvido é fundamental para a síntese do 2,3-butanodiol, devido ser um processo que se dá pelo metabolismo anaeróbio ou parcialmente aeróbio do microrganismo (PIRT, 1957). Tal fato foi comprovado por Jansen et al. (1984) pela cinética da fermentação de xilose por *Klebsiella pneumoniae*. Neste caso verificou-se que após um intenso crescimento celular, em sistema aerado, a concentração de oxigênio dissolvido atingia valor nulo, iniciando-se neste ponto a produção de 2,3-butanodiol. O mesmo comportamento foi observado por Garcia (1999) no estudo das condições iniciais para a produção de 2,3-butanodiol em sistema descontínuo alimentado utilizando o valor de  $k_{La}$  inicial da fase de batelada igual a  $100 \text{ h}^{-1}$ . Nestas condições foi possível obter valores de produtividades em 2,3-butanodiol em torno de  $2,9 \text{ g/h}$  ( $2,15 \text{ g/L.h}$ ).

A temperatura ótima de formação de produto difere da temperatura ótima de crescimento de *Klebsiella pneumoniae*. Pirt, Callow (1958), trabalhando com processo contínuo, em meio contendo sacarose como substrato, mostraram que o intervalo de  $35$  a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  é o mais adequado para a formação do 2,3-butanodiol, e que a melhor temperatura para crescimento é de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Segundo Esener et al. (1981), que utilizaram glicerol como substrato para *Klebsiella pneumoniae*, a velocidade específica máxima de formação de produto ocorre a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Jansen, Tsao (1983) concluíram que a temperatura ótima para o crescimento da bactéria e para a formação de produto é aproximadamente  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . A maioria dos trabalhos que envolvem a produção de 2,3-butanodiol por *Klebsiella pneumoniae* são realizados a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  (SILVEIRA et al., 1998; PRATA, 1997; GARCIA, 1999; MENZEL et al., 1996).

Jansen et al. (1984) examinaram o efeito do pH sobre a velocidade específica de crescimento e sobre o rendimento em produto na produção de 2,3-butanodiol e verificaram que a máxima velocidade específica de crescimento em aerobiose ocorre a pH 5,2. O rendimento máximo em 2,3-butanodiol a partir de xilose ocorre numa faixa de pH entre 5,2 e 5,6. Este rendimento não é afetado quando utiliza-se valores de pH entre 4,4 e 5,8. Em valores de pH iguais ou superiores a 6, o rendimento de 2,3-butanodiol decresce devido ao decréscimo da atividade das enzimas necessárias para produção de 2,3-butanodiol.

Störmer (1968) verificou que o pH ótimo para a ação da enzima acetolactato sintase, necessária para a produção de 2,3-butanodiol, se situa em torno de 5,8;

que o acetato tem o poder de ativar esta enzima, e que a atividade enzimática é inibida por fosfato e sulfato. Coincidentemente, o pH ideal para a atividade da acetolactato sintase, 5,8, se encontra na faixa de pH na qual a maioria das moléculas de ácido acético se encontra em sua forma dissociada, ou seja acetato (MAGEE, KOSARIC, 1987). Baseado nos resultados de Störmer (1968), Prata (1997), empregou o pH 5,8 para a produção de 2,3-butanodiol em sistema descontínuo alimentado, com a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, em meio preparado com o hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. O autor concluiu que este valor de pH é adequado para esta fermentação. Grover *et al.* (1990) examinaram o efeito do pH sobre a produção de 2,3-butanodiol a partir de hidrolisado de madeira, por *Klebsiella pneumoniae*, e verificaram que o pH inicial ótimo varia entre 5,5 e 6,0.

Encontram-se na literatura estudos sobre a produção de 2,3-butanodiol em diferentes sistemas de fermentação. Silveira (1991) estudou a cinética desta fermentação, utilizando sacarose como substrato, em sistema descontínuo, obtendo uma concentração máxima de 74,0 g/L. O autor realizou, também, alguns ensaios em sistema descontínuo alimentado, e sugere que este tipo de fermentação seja preferencialmente empregado para a produção de 2,3-butanodiol. Neste caso foi verificado que em nenhum momento a cultura ficou exposta a concentrações de substrato inibitórias. De acordo com Olson, Johnson (1948) o emprego do sistema descontínuo alimentado permite evitar a inibição causada por altas concentrações de substrato. O sistema descontínuo alimentado é indicado, ainda, quando se tem problemas de inibidores microbianos no meio de fermentação (MOSER, 1985). No caso do emprego de matérias-primas lignocelulósicas, em que o processo de hidrólise resulta a formação de diversos compostos inibidores (SJOLANDER *et al.*, 1938; FRAZER, McCASKEY, 1989), este sistema é de grande interesse. Prata (1997) obteve rendimentos de até 80% do valor teórico da conversão de substrato em 2,3-butanodiol, durante a fermentação em sistema descontínuo alimentado, a partir de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. Considerando que para o processo de recuperação a concentração de 2,3-butanodiol deve ser a maior possível, o sistema descontínuo alimentado é o mais adequado para a obtenção deste produto, uma vez que através do mesmo obtém-se as maiores concentrações: Olson, Johnson (1948) obtiveram 99,0 g/L, a partir de glicose; Yu, Saddler (1982) obtiveram

113,0 g/L (somando butanodiol com acetoina) e Silveira (1991) obteve 92,9 g/L, a partir de sacarose.

#### **2.2.4 RECUPERAÇÃO DO PRODUTO**

Poucas pesquisas foram direcionadas para um dos grandes problemas da fermentação butileno-glicólica, que é a recuperação do produto a partir do meio fermentado. As maiores dificuldades na recuperação deste glicol são devido ao seu elevado ponto de ebulição (180-184 °C), sua grande afinidade com a água e a presença de constituintes sólidos e dissolvidos no meio de fermentação (LONG, PATRICK, 1963).

Alguns métodos de recuperação do 2,3-butanodiol de meios fermentados são citados na literatura. Entre estes estão a conversão química, a extração com emprego de solventes e o arraste por vapor (LEDINGHAM, NEISH, 1954; LONG, PATRICK, 1963; MAGEE, KOSARIC, 1987).

Afschar *et. al* (1993) propuseram um método para recuperação de 2,3-butanodiol utilizando a técnica de "salting-out". Vários experimentos foram realizados para avaliar o efeito de diferentes sais na separação do diol de melado e hidrolisado amiláceo fermentados por *Klebsiella pneumoniae*. Os melhores resultados foram obtidos com carbonato de potássio anidro ( $K_2CO_3$ ), 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). Com a adição de 53% (p/p) de  $K_2CO_3$  ao meio de melado fermentado, livre de células e previamente clarificado, foi possível recuperar 94% do diol presente. A concentração do diol na solução obtida foi de 97% (p/p).

No trabalho publicado por Qureshi *et al.* (1994) foi estudado um processo de destilação à vácuo com membrana, para a recuperação 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 butanodiol. O sistema permitiu obter uma solução com até 430 g/L de butanodiol.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Fermentação do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena, em Lorena - SP.

### 4.1 MATÉRIA-PRIMA

O hidrolisado hemicelulósico de eucalipto foi obtido a partir de aparas de eucalipto, provenientes das plantações da Cia Suzano de Papel e Celulose - São Luis do Paraitinga – SP (Figura 4.1).



**Figura 4.1** – Aparas de eucalipto nas plantações da Cia Suzano de Papel e Celulose.

As aparas de eucalipto foram processadas em um picador de madeira no Departamento de Engenharia de Materiais da FAENQUIL (Figura 4.2).



**Figura 4.2** – Picador de madeira.

Para a caracterização deste resíduo de eucalipto os teores dos seus componentes foram determinados de acordo com a metodologia sugerida por Dunning, Dallas (1946), que se fundamenta na sacarificação quantitativa dos polissacarídeos de diferentes matérias-primas vegetais. A matéria-prima fracionada foi moída e passada por peneira de 20 “mesh”. Todo o material peneirado foi seco em estufa a 60 °C, por 24 horas. Dois gramas da amostra moída (com umidade no máximo de 10%) recebeu 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (p/p). A mistura foi agitada continuamente por sete minutos em banho termostático a 50 °C. Nessa etapa, denominada hidrólise principal, ocorreu o rompimento das fibras de celulose em oligômeros.

Ao completar o tempo de hidrólise, a reação foi interrompida com a adição de 275 mL de água destilada e o conteúdo foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 500 mL, obtendo-se uma solução ácida a 4%. A suspensão foi autoclavada a 121 °C por 45 minutos. Ocorreu então o que se denomina pós-hidrólise, sendo os

oligômeros transformados em monômeros. Após resfriamento, a suspensão foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL, o qual foi avolumado com água. A suspensão obtida foi analisada em HPLC e as concentrações de glicose, xilose e arabinose foram utilizadas para determinar a porcentagem de celulose e de hemicelulose existente na matéria-prima (IRICK et al. 1988).

## 4.2 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ÁCIDA

Este estudo foi realizado em duas etapas através de um planejamento fatorial  $2^4$  completo e de um planejamento fatorial  $2^3$  composto completo rotacional, com o objetivo de determinar as condições de hidrólise que proporcionem a maior extração de açúcares da fração hemicelulósica.

A Tabela 4.1 mostra os fatores e os níveis das variáveis que foram analisadas na primeira etapa. A Tabela 4.2 apresenta a matriz de planejamento experimental fatorial  $2^4$ , contendo os fatores e níveis codificados.

**Tabela 4.1 Fatores e níveis do planejamento fatorial  $2^4$ .**

FATORES	NÍVEIS		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	120	140	160
Tempo (min)	20	35	50
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	0,2	0,5	0,8
Proporção Sólido:Líquido	1:3	1:4,5	1:6

Nível superior: +1; Nível inferior: -1; Nível central: 0

**Tabela 4.2 Matriz de planejamento experimental fatorial 2<sup>4</sup>.**

ENSAIOS	TEMPERATURA	TEMPO	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	RELAÇÃO S/L
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

A Tabela 4.3 mostra os fatores e os níveis das variáveis que foram analisadas na segunda etapa. A Tabela 4.4 apresenta a matriz de planejamento experimental fatorial 2<sup>3</sup> rotacional completo, contendo os fatores e níveis codificados. Nesta etapa para todos os ensaios o tempo de hidrólise foi de 20 minutos.

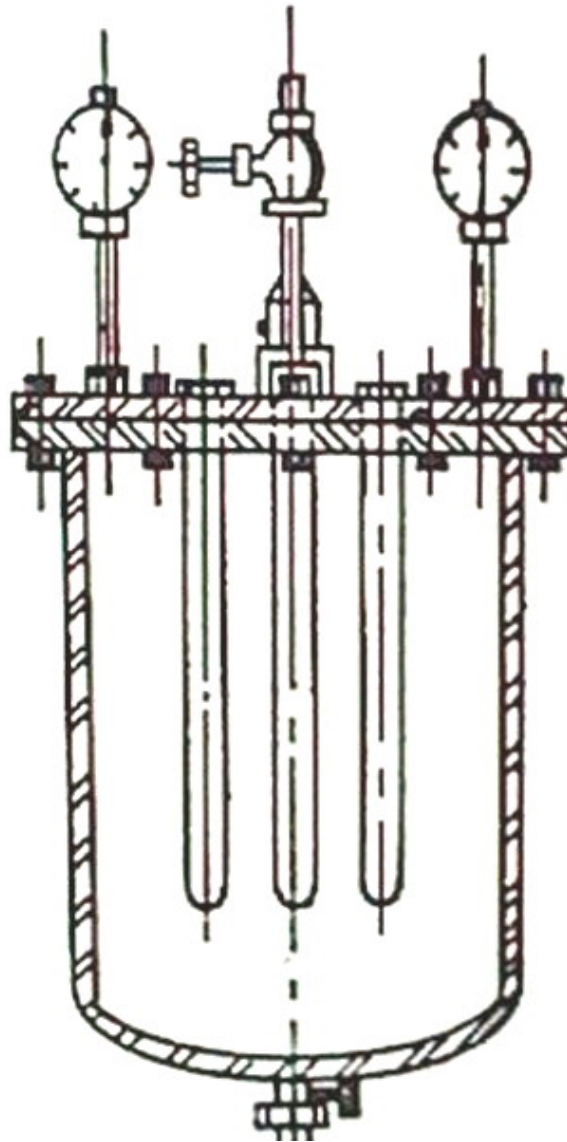
**Tabela 4.3 Fatores e níveis do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> rotacional completo.**

FATORES	NÍVEIS		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	120	140	160
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	0,2	0,5	0,8
Proporção Sólido:Líquido	1:3	1:4,5	1:6

**Tabela 4.4 Matriz de planejamento experimental fatorial 2<sup>3</sup> rotacional completo.**

ENSAIOS	TEMPERATURA	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	RELAÇÃO S/L
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	-1	-1
4	+1	-1	-1
5	-1	+1	-1
6	+1	+1	-1
7	-1	+1	-1
8	+1	+1	-1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	-1,682	0	0
13	+1,682	0	0
14	0	-1,682	0
15	0	+1,682	0
16	0	0	-1,682
17	0	0	+1,682

Todos os ensaios de hidrólise foram conduzidos em reator tipo tambor rotativo vertical (capacidade útil de 50 L), munido de 4 câmaras com capacidade de 1,0 L cada (Figura 4.3), o que permitiu realizar quatro ensaios simultaneamente. Os resultados foram analisados empregando-se como variável resposta a extração de xilose e arabinose.



**Figura 4.3** – Esquema do reator tipo tambor rotativo munido com 4 câmaras com capacidade de 1 L cada empregado para os testes de hidrólise.

### 4.3 Obtenção do hidrolisado hemicelulósico

A partir das melhores condições determinadas pelo planejamento estatístico, foram obtidos cerca de 1000 litros de hidrolisado hemicelulósico, em reator tipo tambor rotativo vertical com capacidade útil de 50 L, que foram posteriormente concentrados e tratados, conforme protocolo a ser definido com base nos ensaios do item 4.3.1 e 4.3.2.

#### **4.3.1 CONCENTRAÇÃO**

O hidrolisado hemicelulósico foi concentrado à vácuo, a uma temperatura de  $70 \pm 5$  °C, a fim de se obter um teor de açúcares em torno de 110 g/L. A evaporação foi conduzida em equipamento de aço inox, com capacidade útil de 30 L. Após submetido à concentração o hidrolisado foi homogeneizado num único recipiente para uso em todos os experimentos.

#### **4.3.2 TRATAMENTO**

Com o objetivo de remover os compostos inibidores do crescimento microbiano presentes no hidrolisado, foram testados dois diferentes tratamentos, os quais foram aplicados após o processo de concentração:

##### **- PRECIPITAÇÃO E ADSORÇÃO POR CARVÃO ATIVO**

O tratamento constou da remoção dos inibidores por precipitação através da variação do pH (elevação a 8,0 com óxido de cálcio, filtração após 10 horas de repouso, redução a 5,4 com ácido sulfúrico concentrado e filtração após 5 horas de repouso) seguida da adsorção por carvão ativo (RODRIGUES *et al.*, 1995). O hidrolisado ficou em contato com o carvão, na proporção de 15% (p/v), durante 1 hora, sob agitação e temperatura de 30 °C. Em seguida o mesmo foi separado por filtração à vácuo. Todas as filtrações foram realizadas em papel de filtro qualitativo.

##### **- EXTRAÇÃO COM RESINAS DE TROCA IÔNICA**

Neste tratamento, cujo objetivo é a redução da concentração dos compostos tóxicos ácido acético, fenóis, furfural e 5-hidroximetilfurfural, foram empregadas as

resinas *PUROLITE* A-860S, A-500 na forma  $\text{Cl}^-$ , C150 na forma  $\text{H}^+$  e A-103S na forma  $\text{OH}^-$  na seqüência definida no estudo de VIÑALS (2001).

O sistema foi constituído de colunas de vidro encamisadas medindo 80 cm de altura por 4 cm de diâmetro interno (volume total de  $1004,8 \text{ cm}^3$ ) com 2 cm de camisa, em sentido vertical, empregando um volume de resina de 650 mL, alimentadas por gravidade, e em temperatura ambiente. O hidrolisado passou por uma etapa de neutralização que constituiu em elevar o pH inicial do hidrolisado concentrado para 7,0 com hidróxido de sódio. Após a neutralização o hidrolisado permaneceu em repouso durante 24 horas e foi submetido a uma filtração para a remoção de possíveis impurezas sólidas antes de ser introduzido na primeira coluna.

Antes da operação do sistema, as resinas foram submetidas a um processo de inchamento com água destilada, sendo mantidas nesta condição por 24 horas antes de serem usadas. A capacidade de troca máxima das resinas iônicas foi determinada com o objetivo de estabelecer o volume de hidrolisado que poderia ser utilizado pelo sistema. As colunas foram alimentadas com hidrolisado neutralizado a uma vazão constante, sendo o efluente coletado em porções de 100 mL que foram submetidas à determinação do pH. A medida que o pH de saída apresentou-se próximo ao de entrada, o fluxo foi interrompido e o volume de hidrolisado coletado foi mensurado.

O ciclo de operação para o trabalho com resinas compreendeu os seguintes passos:

- **Regeneração:** vazão constante da solução regenerante através do leito de resinas conforme recomendado pelo fabricante para cada resina (Tabela 4.5).

- **Lavagem:** eliminação do regenerante com água deionizada para não deixar carga adicional, realizada a vazão constante e volume fixo. O volume foi aquele para o qual o pH ou a condutividade da água efluente apresentou um valor próximo ao da água de alimentação.

- **Purificação:** o hidrolisado passou através das colunas empacotadas com resinas de troca iônica conforme a seguinte seqüência definida por VIÑALS (2001):

- (a) descoloração do hidrolisado com resina aniônica forte A-860S
- (b) desmineralização com a resina aniônica forte A-500
- (c) desmineralização com a resina catiônica forte C-150
  
- (d) descoloração do hidrolisado com resina aniônica fraca A-103S



- **Lavagem:** este procedimento foi realizado com água destilada para remover resíduos de hidrolisado acumulado na resina durante o tratamento a uma vazão constante e volume fixo (Tabela 4.5).

**Tabela 4.5 Condições de regeneração e lavagem das resinas de troca iônica (VIÑALS, 2001).**

Resinas	Regenerante	Regeneração		Lavagem: H <sub>2</sub> O destilada	
		Volume (V <sub>L</sub> ou mL)	Vazão (V <sub>L</sub> /h)*	Volume (V <sub>L</sub> ou mL)	Vazão (V <sub>L</sub> /h)*
<b>A-860-S</b>	NaCl 10%	3,0 V <sub>L</sub> (1950 mL)	0,70 V <sub>L</sub> /h	2,5V <sub>L</sub> (2500 mL)	2,5 V <sub>L</sub> /h
<b>A-500</b>	NaCl 10%	3,8 V <sub>L</sub> (2470 mL)	0,85 V <sub>L</sub> /h	2,5V <sub>L</sub> (2500 mL)	2,5 V <sub>L</sub> /h
<b>C-150</b>	HCl 6%	4,3 V <sub>L</sub> (2795 mL)	1,70 V <sub>L</sub> /h	2,5V <sub>L</sub> (2500 mL)	2,5 V <sub>L</sub> /h
<b>A-103S</b>	NH <sub>4</sub> OH 2,5%	2,4 V <sub>L</sub> (1560 mL)	0,60 V <sub>L</sub> /h	2,5V <sub>L</sub> (2500 mL)	2,5 V <sub>L</sub> /h

\*volume de leite por hora (V<sub>L</sub>/h)

O hidrolisado obtido após cada tratamento foi analisado em termos de concentração de açúcares e inibidores e teve sua capacidade de ser fermentado avaliada através de ensaios em fermentador de bancada.

Após a análise dos resultados, o hidrolisado foi submetido ao tratamento mais favorável ao processo.

#### 4.4 MICRORGANISMO

Foi empregada, para todos os ensaios de fermentação, a bactéria *Klebsiella pneumoniae* NRRL B-199, fornecida pelo Northern Regional Research Laboratory, EUA e catalogada na American Type Culture Collection (ATCC), EUA, sob o código ATCC 8724. As culturas de *Klebsiella pneumoniae* foram mantidas em ágar nutriente (Tabela 4.6), sob refrigeração (4 °C).

## 4.5 MEIOS DE CULTIVO

Todos os meios foram preparados a partir de soluções concentradas dos nutrientes do meio sintético empregado por Frazer, McCaskey (1989) (Tabela 4.6), com concentrações iniciais 40 vezes superiores às do meio original. A solução de xilose foi preparada na concentração de 400 g/L. Todas as soluções foram esterilizadas a 121 °C durante 20 minutos, antes da mistura.

### 4.5.1 MEIO DE ATIVAÇÃO

Para todos os ensaios de fermentação o meio de ativação foi composto de xilose e dos nutrientes citados na Tabela 4.6. Após a mistura das soluções, o pH foi ajustado para 6,2, com ácido clorídrico 6N ou hidróxido de sódio 6N, quando necessário. A concentração inicial de xilose no meio foi de 20 g/L.

**Tabela 4.6 Composição do meio empregado por Frazer, McCaskey (1989).**

NUTRIENTE	CONCENTRAÇÃO FINAL (g/L)
Fosfato dibásico de amônio (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,0
Fosfato monobásico de potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,0
Cloreto de sódio (NaCl)	1,0
Fosfato dibásico de sódio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1,0
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> )	0,2
Extrato de levedura	1,5

**pH 6,2**

### 4.5.2 MEIO DE FERMENTAÇÃO (FASE DESCONTÍNUA)

Para os ensaios de avaliação da eficiência dos tratamentos (item 4.7.1) o meio foi constituído de xilose (30 g/L) e nutrientes (Tabela 4.6).

Para os ensaios de avaliação da necessidade de nutrientes (item 4.7.2) foram testados dois meios de fermentação: um constituído de xilose (30 g/L) e nutrientes e outro constituído de xilose (30 g/L) e extrato de levedura (5 g/L).

Para o teste da vazão de alimentação e concentração de substrato no meio de alimentação (item 4.7.3) assim como para a produção de meio fermentado (item 4.7.4) o meio foi constituído de xilose (30 g/L) e extrato de levedura (5 g/L).

Após a mistura das soluções, o pH foi ajustado para 6,9, quando necessário.

### **4.5.3 MEIO DE ALIMENTAÇÃO**

Para os ensaios de avaliação da eficiência dos tratamentos (item 4.7.1) o meio de alimentação correspondeu ao hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado e concentrado, conforme descrito nos itens 4.3.1 e 4.3.2, suplementado com nutrientes (Tabela 4.6).

Para os ensaios de avaliação da necessidade de nutrientes (item 4.7.2) foram testados dois meios de alimentação: um constituído de hidrolisado tratado com resinas de troca iônica e nutrientes (Tabela 4.6) e outro constituído de hidrolisado tratado com resinas de troca iônica e suplementado apenas com extrato de levedura (5 g/L).

Para o teste da vazão de alimentação e concentração de substrato no meio de alimentação (item 4.7.3) assim como para a produção de meio fermentado (item 4.7.4) o meio de alimentação foi constituído de hidrolisado tratado com resinas de troca iônica e suplementado apenas com extrato de levedura (5 g/L).

Após a mistura das soluções, o pH foi ajustado para 5,8, quando necessário.

A concentração de açúcares do meio foi de 100 g/L para os ensaios de fermentação que foram realizados após cada tratamento (item 4.7.1) e para os ensaios de avaliação da necessidade dos nutrientes (item 4.7.2). Para os demais ensaios a concentração de açúcares do meio foi de 117,0 g/L.

## **4.6 INÓCULO**

Para todos os ensaios de fermentação a bactéria foi ativada em meio sintético, preparado conforme descrito no item 4.5.1. O cultivo foi conduzido em frasco Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio, sob agitação de 180 rpm, a 37 °C, em incubadora de movimento circular (New Brunswick Scientific Co.) por cerca de 9 horas. Após o cultivo as células foram centrifugadas a 4000 x g por 30 minutos e ressuspensas a fim de se obter a suspensão utilizada como inóculo. Em todos os ensaios a concentração inicial de células na fase descontínua foi de 0,6 g/L.

## **4.7 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO**

As fermentações foram conduzidas em fermentador tipo BIOFLO III (Brunswick Sc. Co.), com capacidade útil de 1,25 L, equipado com controle de temperatura, pH, agitação e aeração, e medidor de oxigênio dissolvido. Esses ensaios foram conduzidos a 37 °C, pH igual a 5,8 (ajustado com NaOH 6N) e  $k_La$  igual a 100 h<sup>-1</sup>.

### **4.7.1 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS TRATAMENTOS**

Após cada tratamento foi realizada uma fermentação em sistema descontínuo alimentado com o objetivo de avaliar a eficiência dos mesmos. A vazão de alimentação foi de 72 mL/h. O início da alimentação ocorreu quando a velocidade de consumo de substrato da fase batelada atingiu seu valor máximo ( $t = 4$  horas).

### **4.7.2 AVALIAÇÃO DA NECESSIDADE DOS NUTRIENTES**

Com o objetivo de avaliar o desempenho da bactéria *Klebsiella pneumoniae* na ausência de alguns nutrientes, foram realizados dois ensaios de fermentação: um com o meio de alimentação suplementado com nutrientes conforme descrito nos itens 4.5.2 e 4.5.3 e outro com o meio suplementado apenas com extrato de levedura. A vazão de alimentação empregada foi de 72 mL/h.

### **4.7.3 TESTES DA VAZÃO DE ALIMENTAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO**

Foram realizados dois ensaios com hidrolisado tratado com resinas e suplementado apenas com extrato de levedura, condição que demonstrou ser mais favorável a produção de 2,3-butanodiol no item 4.7.2. No primeiro ensaio utilizou-se uma vazão de alimentação de 170 mL/h e uma concentração de substrato no meio de alimentação de 120 g/L, no segundo a vazão de alimentação foi de 75 mL/h e a concentração de substrato no meio de alimentação foi de 221 g/L.

### **4.7.4 OBTENÇÃO DE MEIO FERMENTADO**

A partir dos melhores resultados obtidos em termos de produtividade em 2,3-butanodiol nos itens, 4.7.2 e 4.7.3 foram realizadas fermentações em sistema

descontínuo alimentado para a obtenção do meio fermentado para os estudos de recuperação do produto.

#### 4.8 RECUPERAÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL

Para os estudos de recuperação de 2,3-butanodiol através da técnica de “salting out”, o meio fermentado foi inicialmente submetido a uma centrifugação para remoção de células.

Em tubos de ensaio foram adicionados 15 mL de meio e  $K_2CO_3$  nas proporções determinadas pelo planejamento estatístico. Após a dissolução do sal e aquecimento, os tubos permaneceram em repouso até se observar a formação de duas fases, permitindo a separação do diol.

Fatores importantes na técnica de “salting out” como porcentagem de  $K_2CO_3$  e temperatura foram estudados através de um planejamento fatorial  $2^2$ , com o objetivo de determinar a condição que proporcione a maior recuperação de produto do meio fermentado.

A Tabela 4.7 mostra os fatores e os níveis das variáveis analisadas. Os ensaios foram realizados conforme a matriz de planejamento experimental fatorial  $2^2$  apresentada na Tabela 4.8.

Os resultados foram analisados empregando-se como variável resposta a porcentagem de recuperação de 2,3-butanodiol.

**Tabela 4.7 - Fatores e níveis do planejamento fatorial  $2^2$  para  $K_2CO_3$**

FATORES	NÍVEIS		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	20	40	60
Sal (%)	30	50	70

**Tabela 4.8 - Matriz de planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup>**

ENSAIOS	TEMPERATURA	%SAL
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

## 4.9 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.9.1 CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES E ÁCIDO ACÉTICO

Os açúcares (glicose, xilose e arabinose) e o ácido acético foram dosados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), em cromatógrafo WATERS, equipado com coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), acoplada a um detector de índice de refração RID-6A. O eluente utilizado foi ácido sulfúrico 0,01 N desgaseificado a um fluxo de 0,6 mL/min. A temperatura da coluna foi de 45 °C e o volume de amostra injetado de 20 µL. As concentrações foram calculadas através de curvas de calibração que correlacionam a concentração de cada um dos padrões com a área do respectivo pico.

### 4.9.2 CONCENTRAÇÃO DE PRODUTOS

Os produtos da fermentação (2,3-butanodiol e acetoína) foram quantificados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), em cromatógrafo WATERS equipado com coluna HAMILTON PRP-X300, acoplado a um detector de índice de refração, operando nas seguintes condições: temperatura de 50 °C; eluente: água

ultra-pura desgaseificada; fluxo do eluente: 0,8 mL/min; volume de amostra: 20  $\mu$ L. As concentrações foram calculadas através de curvas de calibração que correlacionam a concentração de cada um dos padrões com a área do respectivo pico.

#### **4.9.3 CONCENTRAÇÃO DE FURFURAL E HIDROXIMETILFURFURAL**

Furfural e hidroximetilfurfural foram dosados por cromatografia líquida de alto desempenho em cromatógrafo WATERS equipado com detector UV, coluna RP18, nas seguintes condições: temperatura de 25 °C; eluente: acetonitrila e água na proporção de 1:8 com 1% de ácido acético; fluxo de 0,8 mL/min; volume de amostra de 20  $\mu$ L. As concentrações foram calculadas através de curvas de calibração que correlacionam a concentração de cada um dos padrões com a área do respectivo pico.

#### **4.9.4 CONCENTRAÇÃO CELULAR**

O crescimento celular foi medido por densidade ótica, através da leitura da absorbância, a 600 nm, da suspensão de células devidamente diluída, em espectrofotômetro BECKMAN DU 640B. A concentração foi calculada através de uma curva de calibração que correlaciona absorbância com concentração celular (massa seca de células por unidade de volume).

#### **4.9.5 COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO (K<sub>LA</sub>)**

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio foi determinado pelo método de “gassing-out” descrito por Wise (1951) citado por Stanbury, Whitaker (1986).

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

Primeiramente a concentração de oxigênio dissolvido no meio foi reduzida a zero por injeção de nitrogênio. Em seguida o líquido foi agitado e aerado de acordo com as condições desejadas, e o aumento da concentração de oxigênio foi monitorado por um eletrodo de oxigênio dissolvido, tipo polarográfico. A variação da concentração de oxigênio com o tempo pode ser expressa pela seguinte equação:

$$dC_L/dt = k_L a (C^* - C_L), \text{ que integrada resulta:}$$

$$\ln (C^* - C_L) = k_L a \cdot t$$

Onde:

$C^*$  = Concentração de oxigênio dissolvido na saturação

$C_L$  = Concentração de oxigênio dissolvido no meio no tempo  $t$



Portanto, medindo-se vários valores de  $C_L$ , compreendidos entre 0 e 100% da saturação do meio com oxigênio, e calculando-se, para cada medida, a diferença entre  $C^*$  e  $C_L$ , obtém-se a curva  $\ln(C^* - C_L)$  em função do tempo, sendo a sua inclinação correspondente a  $-k_L a$ .

#### 4.10 METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para avaliação do processo de hidrólise ácida foi determinada a porcentagem de extração de pentosanas de acordo com a seguinte equação.

$$\text{MRP} = \frac{\text{QMS.PHE}}{\text{Fc.100.VSA}}$$

→

$$\text{EPO} = \frac{(\text{Xil} + \text{Ara})}{\text{MRP}} \cdot 100$$

Onde:

MRP = Máxima Recuperação de Pentosanas (g/L) (valor teórico)

QMS = Quantidade de Matéria Seca (g)

PHE = Porcentagem de Hemicelulose das Aparas de Eucalipto (%)

Fc = Fator de Conversão de Xilana em Xilose (0,88)

VSA = Volume da Solução Ácida (L)

EPO = Extração de Pentosanas Obtida (%)

Xil = Concentração de Xilose (g/L)

Ara = Concentração de Arabinose (g/L)

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando-se o programa STATGRAPHICS v.6.0.

Quanto ao tratamento do hidrolisado foram avaliadas as concentrações de inibidores e de açúcares.

O processo fermentativo foi avaliado em termos de produtividade, fator de conversão de substrato em produto e concentração de produto no meio. Sendo a Produtividade e o Fator de conversão de substrato em produto, respectivamente, definidos por:

$$Q_p = \Delta \text{MP} / t \text{ (g/h)}$$

$$Y_{p/s} = \text{Mpf} / \text{Msc} \text{ (g/g)}$$

Onde:

$\Delta \text{MP}$  corresponde à variação da massa de produto em função do tempo

Mpf corresponde a massa de produto formada até o instante t

Msc corresponde a massa de substrato consumida até o instante t

$M_p$  corresponde a massa de produto no instante  $t$

A recuperação do produto foi avaliada em termos de porcentagem de produto recuperada e de pureza do produto, sendo a porcentagem recuperada e a pureza (Título em volume), definidas, respectivamente, por:

$$\%R = (M_{pe}/M_{pi}) \times 100 (\%)$$

$$\sigma = (M_p/100\text{mL}) \times 100 (\%)$$

Onde:

$M_{pe}$  corresponde à massa de 2,3-butanodiol extraída

$M_{pi}$  corresponde à massa de 2,3-butanodiol inicial

$M_p$  corresponde à massa de 2,3-butanodiol no produto final

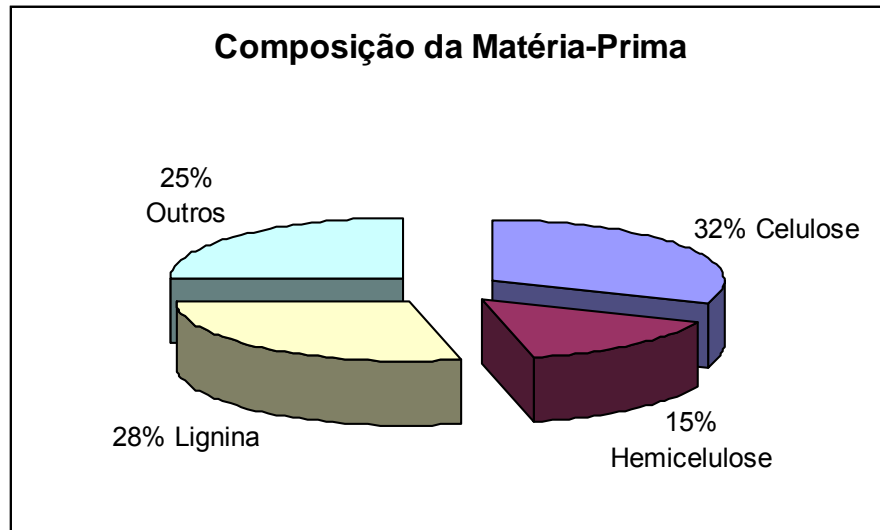
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO DE EUCALIPTO

Neste trabalho utilizou-se como matéria-prima as aparas de eucalipto, provenientes das plantações da Cia Suzano de Papel e Celulose, que foram processadas conforme descrito no item 4.1. A Figura 5.1 apresenta o material já picado na forma que foi utilizado no estudo do processo de hidrólise ácida . Este material foi caracterizado, e sua composição está apresentada na Figura 5.2.



**Figura 5.1** – Aparas de eucalipto cominuídas.



**Figura 5.2** - Composição das Aparas de Eucalipto

Segundo Vital, Della Lucia (1986), o eucalipto é um material constituído por cerca de 40 a 62 % de celulose, 12 a 22% de hemicelulose e 15 a 22% de lignina. As aparas de eucalipto utilizadas neste trabalho apresentaram uma percentagem muito próxima dos valores encontrados na literatura com relação a fração hemicelulósica, porém as proporções de celulose e lignina não foram semelhantes. Essas diferenças na composição do material provavelmente ocorrem devido às aparas de eucalipto não serem um material totalmente homogêneo, pois contem folhas, cascas e caule. Segundo Fengel, Weneger (1989), a proporção dos principais componentes orgânicos dos materiais lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina), pode variar de acordo com a espécie vegetal e com variações biológicas como: diferenças genéticas dentro da própria espécie, tecidos especiais e condições de crescimento..

## 5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA INFLUÊNCIA DA CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE NA EXTRAÇÃO DE AÇÚCARES DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA DAS APARAS DE EUCALIPTO

Com o objetivo de determinar os parâmetros de hidrólise que proporcionem uma maior extração de açúcares da fração hemicelulósica, foi realizado um planejamento fatorial 2<sup>4</sup> completo.

Na Tabela 5.1 está apresentada a matriz de planejamento utilizada, contendo os fatores temperatura, tempo, concentração de ácido e relação sólido-líquido, assim como os resultados obtidos em termos de extração de pentosanas.

Observa-se que com o aumento da temperatura de 120 °C para 160 °C obtém-se valores nitidamente maiores de extração nas mesmas condições de tempo, concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e relação sólido-líquido (ensaios de 1 a 16).

O tempo de hidrólise teve pouca influência no processo. Como pode-se observar, com o aumento do tempo de hidrólise de 20 para 50 minutos não ocorreram diferenças significativas nos valores de extração. Em alguns casos, como por exemplo nos ensaios 6 e 8, o valor de extração decresce, provavelmente devido à degradação da xilose. Nesse caso, certamente a decomposição da xilose foi mais acentuada e provavelmente maior quantidade de furfural foi formada.

Além dos açúcares, o hidrolisado apresenta também um grupo de compostos que tem sido apontados como inibidores do metabolismo microbiano (RODRIGUES *et al.*, 2001; MARTON 2002). Os compostos tóxicos identificados durante o estudo do processo de hidrólise ácida foram o ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural. Dentre estes o ácido acético foi o que apresentou maiores concentrações (12,6 g/L). Segundo Silva *et al.* (1998) a concentração dos compostos tóxicos nos hidrolisados hemicelulósicos varia em função do tipo de material lignocelulósico e das condições hidrolíticas empregadas para a obtenção do hidrolisado.

Os valores da concentração de açúcares utilizados para o cálculo da porcentagem de extração estão apresentados na Tabela 5.2, onde encontram-se também os valores da concentração de ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural.

**Tabela 5.1 – Matriz de planejamento fatorial 2<sup>4</sup> utilizada.**

ENSAIOS	VARIÁVEIS				RESPOSTA
	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (MIN)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	PROPORÇÃO S:L	EXTRAÇÃO DE XILOSE+ARABINOSE (%)
1	120	20	0,2	1:3	0,58
2	160	20	0,2	1:3	10,7
3	120	50	0,2	1:3	1,14
4	160	50	0,2	1:3	12,96
5	120	20	0,8	1:3	8,41
6	160	20	0,8	1:3	79,20
7	120	50	0,8	1:3	10
8	160	50	0,8	1:3	77,10
9	120	20	0,2	1:6	3,50
10	160	20	0,2	1:6	31,20
11	120	50	0,2	1:6	4,91
12	160	50	0,2	1:6	44,15
13	120	20	0,8	1:6	19,62
14	160	20	0,8	1:6	84,44
15	120	50	0,8	1:6	26,63
16	160	50	0,8	1:6	79,20
17	140	35	0,5	1:4,5	43,62
18	140	35	0,5	1:4,5	41,52
19	140	35	0,5	1:4,5	48,90

Tabela 5.2 – Concentração de açúcares e inibidores presentes no hidrolisado de cada ensaio do planejamento.

ENSAIOS	GLICOSE (g/L)	XILOSE (g/L)	ARABINOSE (g/L)	ÁCIDO ACÉTICO (g/L)	FURFURAL (g/L)	HIDROXIMETIL FURFURAL (g/L)
1	0	0,3	0,03	0,2	0,0015	0,01
2	0	3,8	2,3	3,3	0,3	0,104
3	0	0,6	0,05	0,5	0,005	0,01
4	0	5,2	2,2	4	0,45	0,135
5	0	1,7	3,1	1,8	0,023	0,02
6	2,7	40,1	5,1	11,9	1,8	0,284
7	0,2	3,3	2,4	2,9	0,03	0,02
8	3,3	40,6	3,4	12,6	2,0	0,371
9	0	0,5	0,5	0,4	0,004	0,01
10	0	7,5	1,4	3,4	0,3	0,074
11	0	0,7	0,7	0,6	0	0,007
12	0,12	11,4	1,2	4,3	0,44	0,105
13	0	4	1,6	2,5	0,03	0,016
14	1,7	22,1	2	6,8	1,65	0,215
15	0	6,3	1,3	3,6	0,034	0,02
16	2,3	21,2	1,4	6,9	1,85	0,276
17	0,6	15,1	1,5	6	0,2	0,06
18	0,6	14,1	1,7	5	0,2	0,06
19	0,8	16,6	2	6	0,2	0,06

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada utilizando-se os programas STATGRAPHICS versão 2.1 e STATÍSTICA versão 5.0. As estimativas dos efeitos, erros padrão e teste t para o modelo que representa a extração de xilose e arabinose no hidrolisado hemicelulósico de eucalipto em função dos parâmetros de hidrólise, são mostrados na Tabela 5.3, onde **A**, **B**, **C** e **D** correspondem às variáveis codificadas: temperatura (°C), tempo (min), concentração da solução ácida (%) e proporção sólido-líquido, respectivamente. A partir desta análise verificou-se que os efeitos **A**, **C** e **D** e a interação **A.C** foram significativos ao nível de 95% de confiança ( $t_{cal.} > t_{tab.}$ ).

Os efeitos **B**, **A.B**, **B.C** e **B.D** foram eliminados e uma análise de variância foi realizada, estando os resultados apresentados na Tabela 5.4. Nesta análise observa-se que todos os fatores tiveram sua significância aumentada, com um coeficiente de determinação de 94,1%.

**Tabela 5.3 – Estimativa dos efeitos, erros padrão e teste t para a extração de xilose+arabinose.**

EFEITOS	ESTIMATIVA	ERRO-PADRÃO	t
MÉDIA	33,04	± 2,37802	13,894
A	43,018	± 5,18278	8,3*
B	2,308	± 5,18278	0,445
C	34,435	± 5,18278	6,644*
D	11,693	± 5,18278	2,256*
A.B	-0,335	± 5,18278	0,065
A.C	20,803	± 5,18278	4,014*
A.D	3,06	± 5,18278	0,590
B.C	-1,993	± 5,18278	0,384
B.D	1,73	± 5,18278	0,334
C.D	-2,898	± 5,18278	0,559

Erro estimado a partir do erro total com 8 graus de liberdade ( t = 2,30665)

**Tabela 5.4 – Análise de variância dos fatores temperatura, concentração ácida, relação sólido líquido e suas interações.**

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GL	QUADRADO MÉDIO	F	P
A	7402,02	1	7402,02	97,70	0,0000
C	4743,08	1	4743,08	62,60	0,0000
D	546,858	1	546,858	7,22	0,0198
A.C	1730,98	1	1730,98	22,85	0,0004
A.D	37,4544	1	37,4544	0,49	0,4954
C.D	33,582	1	33,582	0,44	0,5182
Erro Total	909,159	12	75,7633		
Total	15403,1	18			

**R<sup>2</sup> = 94,1%**



Avaliando a variância do modelo com erro puro (Tabela 5.5), verifica-se que a falta de ajuste é altamente significativa ( $p = 0,0002$ ), ou seja, a diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pela equação do modelo não pode ser explicada somente pelo erro experimental.

**Tabela 5.5 – Análise de variância com erro puro dos fatores temperatura, concentração ácida, relação sólido líquido e suas interações.**

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GL	QUADRADO MÉDIO	F	P
A	7402,45	1	7402,45	467,08	0,0000
C	4742,73	1	4742,73	299,25	0,0000
D	546,975	1	546,975	34,51	0,0002
A.C	1731,18	1	1731,18	109,23	0,0000
A.D	37,4238	1	37,4238	2,36	0,1554
C.D	33,5531	1	33,5531	2,12	0,1763
Falta de ajuste	750,784	2	375,392	23,69	0,0002
Erro puro	158,485	10	15,8485		
Total	15403,6	18			

$R^2=94,1\%$

Desta forma considera-se que provavelmente um modelo quadrático é mais adequado para representar o processo. Foram então realizados novos ensaios para se determinar os coeficientes do modelo quadrático. Nesta etapa utilizou-se um planejamento fatorial  $2^3$  composto completo rotacional. A variável tempo foi eliminada, pois como observado na primeira etapa este fator não foi significativo. Desta forma optou-se por trabalhar com um menor tempo, proporcionando mais economia para o processo.

Na Tabela 5.6 está apresentada a matriz de planejamento utilizada, contendo os fatores temperatura, concentração de ácido e relação sólido-líquido, assim como os resultados obtidos em termos de extração de xilose e arabinose.

Tabela 5.6 – Matriz de planejamento fatorial 2<sup>3</sup> composto completo rotacional.

ENSAIOS	VARIÁVEIS			RESPOSTA
	TEMPERATURA (°C)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	PROPORÇÃO S:L	EXTRAÇÃO DE XILOSE+ARABINOSE (%)
1	120	0,2	1:3	0,86
2	160	0,2	1:3	11,83
3	120	0,8	1:3	9,20
4	160	0,8	1:3	78,15
5	120	0,2	1:6	4,21
6	160	0,2	1:6	37,67
7	120	0,8	1:6	23,13
8	160	0,8	1:6	81,82
9	140	0,5	1:4,5	43,62
10	140	0,5	1:4,5	41,52
11	140	0,5	1:4,5	48,90
12	106	0,5	1:4,5	5,00
13	174	0,5	1:4,5	50,30
14	140	0,0	1:4,5	1,60
15	140	1,0	1:4,5	65,70
16	140	0,5	1:2	2,70
17	140	0,5	1:7	50,70

Os valores da concentração de açúcares utilizados para o cálculo da porcentagem de extração estão apresentados na Tabela 5.7, onde encontram-se também os valores da concentração de ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural.

Tabela 5.7 – Concentração de açúcares e inibidores presentes no hidrolisado de cada ensaio do planejamento 2<sup>3</sup> composto completo rotacional.

ENSAIOS	GLICOSE (g/L)	XILOSE (g/L)	ARABINOSE (g/L)	ÁCIDO ACÉTICO (g/L)	FURFURAL (g/L)	HIDROXIMETIL FURFURAL (g/L)
1	0	0,45	0,04	0,35	0,0033	0,01
2	0	4,50	2,30	3,65	0,3750	0,12
3	0	2,50	2,75	2,35	0,0265	0,02
4	3,00	40,35	4,25	12,25	1,9	0,33
5	0	0,60	0,60	0,50	0,002	0,01
6	0	9,45	1,30	3,85	0,37	0,09
7	0	5,15	1,45	3,05	0,032	0,02
8	2,00	21,65	1,70	6,85	1,75	0,25
9	0,60	15,10	1,50	6,00	0,2	0,058
10	0,60	14,10	1,70	5,00	0,2	0,058
11	0,80	16,60	2,00	6,00	0,2	0,056
12	0,20	0,64	1,27	0,70	0,003	0,004
13	2,72	18,00	1,15	9,10	0,06	0,04
14	0,35	0,40	0,22	0,50	0,006	0,009
15	0,76	25,00	1,70	6,70	0,72	0,09
16	0,24	2,34	2,84	2,40	0,07	0,04
17	0,40	12,40	1,17	3,20	0,2	0,06

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada e a análise de variância obtida para a resposta extração (Tabela 5.8) mostra que os fatores temperatura, concentração de ácido, relação sólido líquido e a interação entre temperatura e concentração de ácido são significativos a nível de 95% de confiança e que as interações **A.A** e **C.C** são significativas a nível de 90%, com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para o modelo de 94,74%.

**Tabela 5.8 - Análise de variância dos fatores temperatura, concentração ácida, relação sólido líquido e suas interações.**

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GL	QUADRADO MÉDIO	F	P
A: Temperatura	4512,8	1	4512,8	49,15	0,0002
B: [ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	4414,37	1	4414,37	48,08	0,0002
C: Proporção S/L	1190,64	1	1190,64	12,97	0,0087
A.A	338,012	1	338,012	3,68	0,0965
A.B	865,488	1	865,488	9,43	0,0181
A.C	18,6966	1	18,6966	0,20	0,6655
B.B	126,846	1	126,846	1,38	0,2783
B.C	16,791	1	16,791	0,18	0,6818
C.C	380,751	1	380,751	4,15	0,0811
Erro Total	642,732	7	91,8188		
Total	12224,7	16			

**R<sup>2</sup> = 94,74%**

Eliminando-se os efeitos que foram menos significativos estatisticamente (**A.C** e **B.C**) e fazendo-se uma nova análise de variância (Tabela 5.9 ), observa-se que todos os outros efeitos tiveram sua significância estatística aumentada (menores valores de p).

**Tabela 5.9 – Análise de variância para a extração de xilose+arabinose, eliminando os fatores menos significativos.**

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GL	QUADRADO MÉDIO	F	P
A: Temperatura	4512,8	1	4512,8	59,89	0,0000
B: [ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	4414,37	1	4414,37	58,58	0,0000
C: Proporção S:L	1190,64	1	1190,64	15,80	0,0032
A.A	338,012	1	338,012	4,49	0,0633
A.B	865,488	1	865,488	11,49	0,0080
B.B	126,846	1	126,846	1,68	0,2268
C.C	380,751	1	380,751	5,05	0,0512
Erro Total	678,219	9	75,3577		
Total	12224,7	16			

**R<sup>2</sup> = 94,45%**

Avaliando a variância do modelo com erro puro (Tabela 5.10), verifica-se que não houve falta de ajuste significativa ao nível de 95% de confiança, ou seja, a diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pela equação do modelo, pode ser explicada somente pelo erro experimental.

Desta forma o modelo quadrático pode ser considerado adequado para explicar as variações da extração de xilose+arabinose do material lignocelulósico, na região em estudo.

**Tabela 5.10 – Análise de variância com erro puro para a extração de xilose+arabinose, eliminando os fatores menos significativos**

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GL	QUADRADO MÉDIO	F	P
A: Temperatura	4512,8	1	4512,8	312,11	0,0032
B: [ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	4414,37	1	4414,37	305,31	0,0033
C: Proporção S:L	1190,64	1	1190,64	82,35	0,0119
A.A	338,012	1	338,012	23,38	0,0402
A.B	865,488	1	865,488	59,86	0,0163
B.B	126,846	1	126,846	8,77	0,0976
C.C	380,751	1	380,751	26,33	0,0359
Falta de ajuste	649,302	7	92,7574	6,42	0,1414
Erro Total	28,9176	2	14,4588		
Total	12224,7	16			

**R<sup>2</sup> = 94,45%**

A validade do modelo foi verificada pela análise de regressão múltipla (Tabela 5.11). Observa-se que o modelo é significativo (p=0,0001), pois consegue prever 94,45% das variâncias dos resultados experimentais.

**Tabela 5.11 – Análise de regressão múltipla para o modelo que representa a extração de xilose+arabinose, durante o processo de hidrólise ácida.**

FONTE DE VARIAÇÃO	SOMA DOS QUADRADOS	GL	QUADRADO MÉDIO	F	P
Modelo	11546,5	7	1649,5	21,89	0,0001
Resíduo	678,219	9	75,3577		
Total	12224,7	16			

**R<sup>2</sup> = 94,45%**

Com base nos dados obtidos, a equação do modelo quadrático proposta para descrever a extração de xilose+arabinose do material lignocelulósico, na região em estudo, foi a seguinte:

$$Y = 44,5217 + 18,1781.A + 17,9787.B + 9,33715.C - 5,4757.A^2 + 10,4013.A.B - 3,35437.B^2 - 5,81157.C^2 \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde:

**Y:** extração de xilose+arabinose estimada pelo modelo

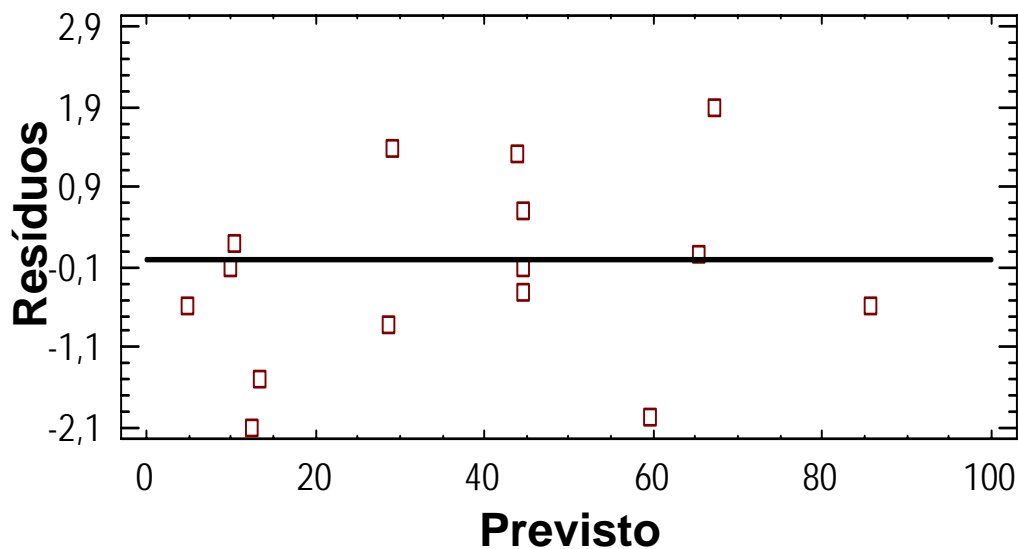
**A:** temperatura

**B:** concentração de ácido

**C:** relação sólido líquido

Na Figura 5.3 tem-se a distribuição dos resíduos em torno de zero para o modelo proposto. Nota-se que esta distribuição é aleatória, não existindo nenhuma tendência do modelo.

A partir da equação determinou-se que o máximo valor para a resposta extração (95,8%) pode ser obtido quando utiliza-se a temperatura de 168 °C, a concentração de ácido de 0,9% e uma relação sólido líquido de 1:7.



**Figura 5.3** – Distribuição dos resíduos do modelo para extração de xilose+arabinose

### 5.3 COMPROVAÇÃO DO MODELO

Foi realizado um ensaio de hidrólise nas condições propostas pelo modelo (temperatura = 168 °C, concentração de ácido = 0,9% e proporção sólido líquido = 1:7). Os resultados em termos de açúcares e inibidores estão apresentados na Tabela 5.12.

**Tabela 5.12 - Composição do hidrolisado obtido através da hidrólise ácida realizada segundo as condições determinadas pelo modelo.**

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO (g/L)
Glicose	3,7
Xilose	9,1
Arabinose	0,4
Ácido acético	7,9
Furfural	4,7
Hidroximetilfurfural	0,6

A partir dos resultados obtidos foi possível determinar a porcentagem de xilose e arabinose extraída, que foi de 38,3%. Como se pode observar, este valor é muito menor que o valor de extração previsto pelo modelo (95,8%).

As melhores condições de hidrólise indicadas pelo modelo estatístico são provavelmente, drásticas demais para o processo. De acordo com Palmqvist, Hahn-Hägerdal (2000), dependendo das condições utilizadas durante a hidrólise ácida, as hexoses e as pentoses podem ser degradadas em hidroximetilfurfural e furfural, respectivamente. Este comportamento pode ser observado pelas baixas concentrações obtidas de xilose e arabinose e pela elevada concentração de furfural, a qual é muito elevada comparada aos resultados obtidos em outros ensaios (Tabela 5.7). Provavelmente, nestas condições, ocorreu a extração prevista, porém seguida da degradação dos açúcares, o que, conseqüentemente, fez com que o valor da porcentagem de pentosana extraída fosse baixo.

Como não foi possível obter o ponto máximo de extração previsto pelo modelo, optou-se por escolher, a partir dos ensaios realizados no planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, a condição que proporcionou um valor elevado de extração e

concentração de xilose+arabinose. A melhor condição foi encontrada no ensaio 4, em que se utilizou uma temperatura de 160 °C, uma concentração de ácido de 0,8% e uma proporção sólido líquido de 1:3.

Esta condição foi testada novamente, confirmando os resultados obtidos anteriormente, ou seja, uma concentração de xilose de 40,35 g/L e de arabinose de 4,25 g/L, que resultou em uma extração de 78,15%. Então determinou-se que toda a produção de hidrolisado hemicelulósico seria realizada nesta condição.

#### 5.4 ENSAIO DE HIDRÓLISE ÁCIDA EM REATOR DE 50 L

Com o objetivo de produzir maiores quantidades de hidrolisado e verificar se a ampliação de escala de um reator de 1 L para um reator de 50 L reproduziria os mesmos resultados, foi realizado um ensaio de hidrólise em reator tipo tambor rotativo com capacidade de 50 L, nas condições determinadas no item 5.3. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.13.

**Tabela 5.13 - Composição do hidrolisado obtido através da hidrólise ácida realizada em reatores de 1 L e de 50L.**

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO (g/L)	
	REATOR DE 1 L	REATOR DE 50 L
Glicose	3	8,7
Xilose	40,3	40,8
Arabinose	4,2	2,3
Ácido acético	12,2	14
Furfural	1,9	1,3
Hidroximetilfurfural	0,3	0,39
Extração Obtida	78 %	76 %

Nota-se que existem algumas diferenças nos valores encontrados, pois sabe-se que quando trabalha-se em reatores maiores, algumas variáveis do processo podem ser alteradas, como por exemplo o tempo de aquecimento do reator. Embora isso tenha ocorrido, as diferenças não foram consideradas prejudiciais ao processo, e os resultados foram considerados satisfatórios.



Desta forma todo o hidrolisado a ser utilizado nos ensaios seguintes foi produzido empregando-se, no reator de 50 L, as condições do ensaio 4.

## 5.5 CONCENTRAÇÃO DO HIDROLISADO

O processo de concentração à vácuo foi empregado para aumentar o teor inicial de açúcares do hidrolisado utilizado no processo fermentativo.

A evaporação foi realizada até que se obtivesse um hidrolisado com um teor de açúcares em torno de 100 g/L, aproximadamente 2,5 vezes a concentração inicial. O hidrolisado concentrado foi caracterizado com relação aos teores de glicose, xilose, arabinose, furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético e quanto ao pH. Os dados referentes a estas análises estão apresentados na Tabela 5.14.

**Tabela 5.14 - Composição do hidrolisado hemicelulósico sem concentrar e concentrado.**

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (g/L)	
	HIDROLISADO SEM CONCENTRAR	HIDROLISADO CONCINTRADO
Glicose	8,7	17
Xilose	40,8	94,9
Arabinose	2,3	4,7
Ácido acético	14	16
Furfural	1,3	0,23
Hidroximetilfurfural	0,39	0,40

Após a etapa de evaporação, observou-se que os açúcares glicose, xilose e arabinose tiveram suas concentrações aumentadas proporcionalmente ao fator de

concentração utilizado, portanto pode-se dizer que não houve degradação dos açúcares durante o processo.

O hidroximetilfurfural, produto da degradação dos açúcares, teve sua concentração aumentada, porém, em proporção menor que o fator de concentração utilizado. O furfural teve sua concentração reduzida cerca de 80%, o que pode ser atribuído ao fato de que sob pressão reduzida o ponto de ebulição desse composto está em torno de 54 °C (PERRY, 1997), menor que a temperatura utilizada no processo de concentração à vácuo (70 °C).

Observa-se também que a concentração de ácido acético não aumentou proporcionalmente ao fator de concentração utilizado. Isto ocorreu devido ao fato do ácido acético ser um composto volátil que é parcialmente removido durante o processo de evaporação (PARAJÓ *et al.*, 1996, RODRIGUES, 2001).

De acordo com a literatura os níveis de furfural e hidroximetilfurfural obtidos no hidrolisado concentrado não são considerados inibitórios ao metabolismo microbiano, embora não haja dados a respeito da concentração mínima de furfural e hidroximetilfurfural inibitória ao metabolismo da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, utilizada no presente trabalho.

Embora o processo de concentração à vácuo favoreça a eliminação parcial de alguns compostos inibidores do metabolismo microbiano, é ainda necessário que este hidrolisado passe por um tratamento, antes que seja utilizado em processos fermentativos.

## **5.6 DEFINIÇÃO DA MELHOR METODOLOGIA PARA O TRATAMENTO DO HIDROLISADO**

Com o objetivo de obter um hidrolisado com menor teor possível de inibidores do crescimento microbiano, foram testados dois tratamentos, um baseado na remoção através da precipitação por variação do pH e adsorção com carvão ativo e outro na remoção através de resinas de troca iônica.

Os resultados em termos de concentração de açúcares e inibidores, assim como os parâmetros fermentativos da fermentação butileno glicólica, foram comparados após cada tratamento. A Tabela 5.15 apresenta as concentrações de

glicose, xilose, arabinose, furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético, presentes no hidrolisado antes e após cada tratamento.

**Tabela 5.15 - Composição do hidrolisado hemicelulósico antes e após concentração e tratamento.**

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (g/L)			
	HIDROLISADO ORIGINAL	HIDROLISADO CONCENTRADO SEM TRATAMENTO	HIDROLISADO CONCENTRADO TRATADO COM CARVÃO ATIVO	HIDROLISADO CONCENTRADO TRATADO COM RESINAS
Glicose	8,7	17,0	4,6	16,0
Xilose	40,8	94,9	89,2	96,0
Arabinose	2,3	4,7	5,4	5,2
Ácido acético	14,0	16,0	11,0	0
Furfural	1,3	0,23	0,002	0
Hidroximetilfurfural	0,39	0,4	0,01	0

De acordo com os dados desta na tabela, observa-se que os compostos resultantes da degradação dos açúcares (furfural e hidroximetilfurfural) foram praticamente removidos do hidrolisado após cada tratamento. Os açúcares glicose e xilose tiveram suas concentrações reduzidas no primeiro tratamento devido ao uso de carvão ativo. Esta perda de açúcares também foi observada por Silva *et al.* (1998), que utilizaram 30% de carvão no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, resultando uma remoção de 31,3% dos açúcares presentes.

No tratamento com resinas não ocorreu perdas dos açúcares presentes no hidrolisado concentrado. De acordo com Nilverbrant *et al.* (2001), em experimentos que testaram a capacidade de retenção de glicose por uma resina aniônica, não observou-se perdas de glicose ou manose durante o tratamento de hidrolisados hemicelulósicos. Segundo os autores isto é devido à presença de ácidos alifáticos ionizados, fenóis e íons inorgânicos em quantidades suficientes para competir com os açúcares pelos sítios na resina.

Dentre os compostos inibidores, o ácido acético foi o único que não sofreu alterações significativas com o processo de tratamento com carvão ativo, resultando uma redução da concentração de 16 para 11 g/L. Segundo McMillan (1994) o ácido acético é considerado o principal inibidor do metabolismo da xilose, o que prejudica a utilização desse hidrolisado em um processo fermentativo.

A Tabela 5.16 apresenta a concentração dos compostos inibidores presentes no hidrolisado submetido ao tratamento com resinas.

Após o tratamento com resinas de troca iônica observa-se 100% de remoção dos compostos inibidores dosados, que incluem ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e alguns compostos fenólicos. Além disso obteve-se uma excelente clarificação, conforme pode ser observado pelo aspecto do hidrolisado, antes e após cada resina, apresentado na Figura 5.4.



**Figura 5.4** – Clarificação do hidrolisado em função das etapas de tratamento com resinas de troca iônica: inicial (HI), concentrado (HC), neutralizado (HCN) e tratado com as resinas A860S, A500, C150 e A103S.

**Tabela 5.16 – Concentração dos compostos inibidores presentes no hidrolisado antes e durante o tratamento com resinas de troca iônica.**

HIDROLISADO	COMPOSTOS INIBIDORES (g/L)					
	Ac. acético	Furfural	HMF	Ac. Siríngico	Vanilina	Seringaldeído
Natural	13,8	1,3	0,39	0,0111	0,0832	nd
Conc. 2,5 X	16	0,23	0,4	0,0409	0,0254	0,0975
Neutralizado	17	0,55	0,4	0,0608	0,0274	nd
Tratado c/ A860	13	0,59	0,46	0,0366	nd	nd
Tratado c/ A500	13,2	0,44	0,47	nd	nd	nd
Tratado c/ C150	13	0,19	0,49	nd	nd	nd
Tratado A103S	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: não detectado

Observa-se que a cor foi intensificada com a concentração do hidrolisado, conforme demonstrado visualmente (hidrolisado HI e HC). Segundo VIÑALS (2001), isto ocorre devido ao aumento do teor de compostos que conferem cor ao hidrolisado como os fenólicos, furfural e hidroximetilfurfural além de outras macromoléculas derivadas da lignina.

Observando a Tabela 5.16, verifica-se que a etapa de neutralização favorece a remoção de compostos fenólicos, conforme observado por MARTON (2005), mas não interfere nos níveis dos demais compostos.

Quanto à descoloração dos hidrolisados, são extremamente promissores os resultados obtidos, já que é possível alcançar 100% de remoção da cor após tratamento com a resina A103S (Figura 5.4).

Analisando a remoção de compostos tóxicos, observa-se pela Tabela 5.16 que a total remoção de ácido acético ocorreu com a resina A103S, enquanto que a maior remoção dos compostos fenólicos ocorreu após o tratamento com a resina A500.

A maior redução da cor ocorreu com a resina C-150 seguida da resina A103S

## 5.7 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS TRATAMENTOS

Foram realizados dois ensaios de fermentação com o objetivo de comparar os dois tratamentos realizados: com carvão ativo e com resinas de troca iônica.

Os ensaios foram conduzidos em sistema descontínuo alimentado, conforme descrito no item (4.7.1). Nas tabelas 5.17 e 5.18 encontram-se os valores das concentrações de células, substrato, produto e ácido acético durante a fase de alimentação dos ensaios realizados. Todos os parâmetros utilizados na discussão foram calculados durante a fase de alimentação, com o objetivo de avaliar o comportamento do microrganismo nesta fase do processo, em que a adição de inibidores é constante. Por outro lado é ideal que se obtenha um tempo de fermentação próximo ao tempo de alimentação e com elevados valores de produtividade. A concentração de açúcares e ácido acético do meio de alimentação composto por hidrolisado tratado com carvão ativo, foi de 89,4 g/L e 10,5 g/L, respectivamente. Para o ensaio utilizando hidrolisado tratado com resinas o meio de alimentação tinha uma concentração de açúcares de 102 g/L e ausência de ácido acético.

**Tabela 5.17 – Ensaio fermentativo de produção de 2,3-butanodiol, em hidrolisado tratado por variação do pH e adsorção com carvão ativo.**

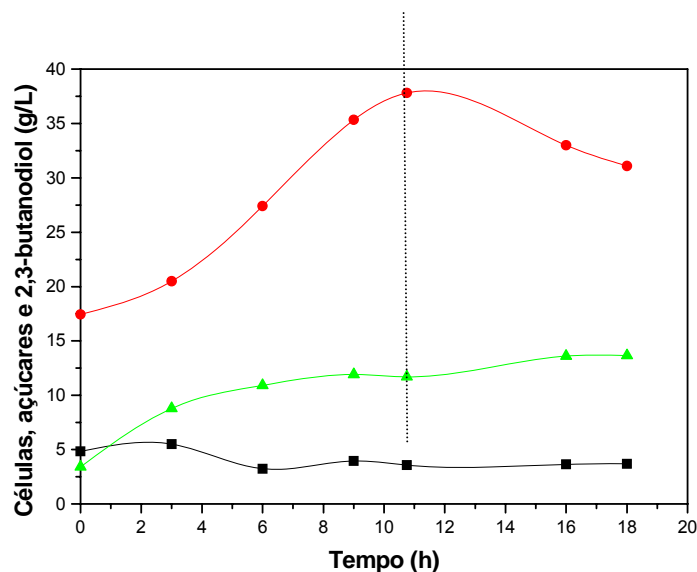
TEMPO (h)	CÉLULAS (g/L)	SUBSTRATO (g/L)	PRODUTO (g/L)	ÁC. ACÉTICO (g/L)
0	4,83	17,45	3,4	0,8
3	5,50	20,50	8,8	2,6
6	3,24	27,40	10,9	3,8
9	3,95	35,34	11,9	5,0
10,75	3,58	37,80	11,7	5,3

**Tabela 5.18 – Ensaio fermentativo de produção de 2,3-butanodiol, em hidrolisado tratado por adsorção com resinas de troca iônica.**

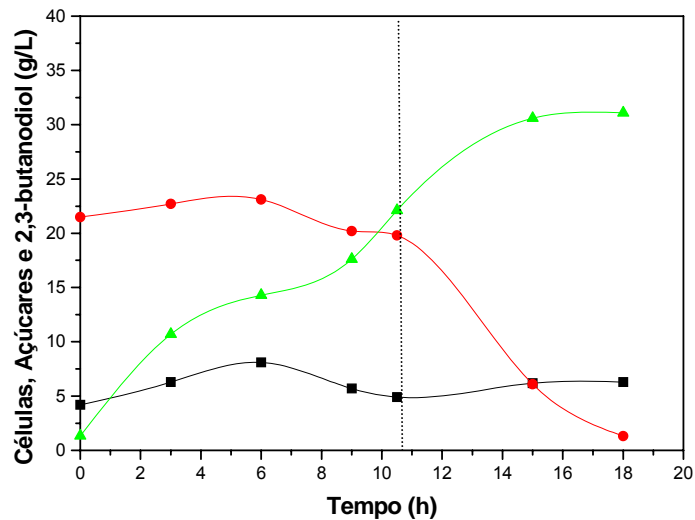
TEMPO (h)	CÉLULAS (g/L)	SUBSTRATO (g/L)	PRODUTO (g/L)	ÁC. ACÉTICO (g/L)
0	42	21,5	1,3	1,2
3	6,3	22,7	10,7	0,8
6	8,1	23,1	14,3	0,72
9	5,7	20,2	17,6	0,61
10,5	4,9	19,8	22,1	0,64

Nota-se que no ensaio onde empregou-se hidrolisado tratado com resinas pouca concentração de ácido acético foi encontrada, este provavelmente foi formado pela bactéria durante a fermentação, pois o meio de alimentação não continha ácido acético. Observa-se que durante a fermentação com hidrolisado tratado com carvão ativo, maiores níveis de ácido acético foram detectados, o que justifica-se devido a quantidade de ácido acético presente no meio de alimentação (10,5 g/L).

Os perfis das fermentações em sistema descontínuo alimentado realizadas com hidrolisado tratado com carvão ativo e com resinas de troca iônica são apresentados nas Figuras 5.5 e 5.6, respectivamente, onde a linha pontilhada indica o final da alimentação.



**Figura 5.5 –** Concentrações de células (■-), de açúcares (-●-) e de butanodiol (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado por variação do pH e adsorção com carvão ativo.



**Figura 5.6** – Concentrações de células (-■-), de açúcares (-●-) e de butanodiol (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado com resinas de troca iônica.

Os valores de concentração de células, açúcares e butanodiol observados no tempo zero de ambas as fermentações (final da fase descontínua e início da alimentação) correspondem a valores próximos dos encontrados por GARCIA (1999), quando avaliou o melhor tempo para iniciar-se a alimentação para a fermentação butileno glicólica. Segundo o autor, iniciando-se a alimentação do reator quando a velocidade de consumo de substrato da fase descontínua é máxima obtêm-se maiores valores de produtividade em butanodiol. Nessas condições a velocidade máxima de consumo de substrato (5 g/h) ocorreu 4 horas após o início da fase descontínua.

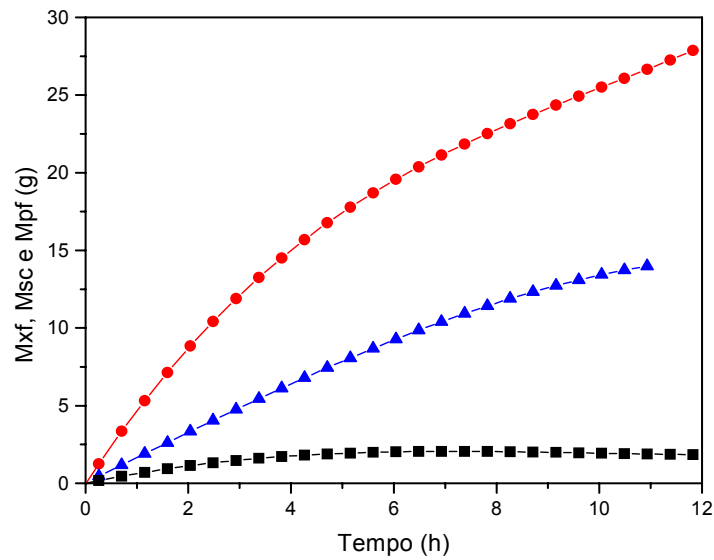
Nas Figuras 5.7 e 5.8 estão apresentados os valores calculados das massas de células, de açúcares e de butanodiol, durante a alimentação, em função do tempo, para os dois ensaios realizados.

Os dados experimentais foram ajustados através de polinômios utilizando o programa Micronal Oringim 5.0. Através do mesmo programa foi possível calcular as velocidades instantâneas e velocidades específicas de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto em função do tempo, as quais estão apresentadas na Figura 5.9 e 5.10.

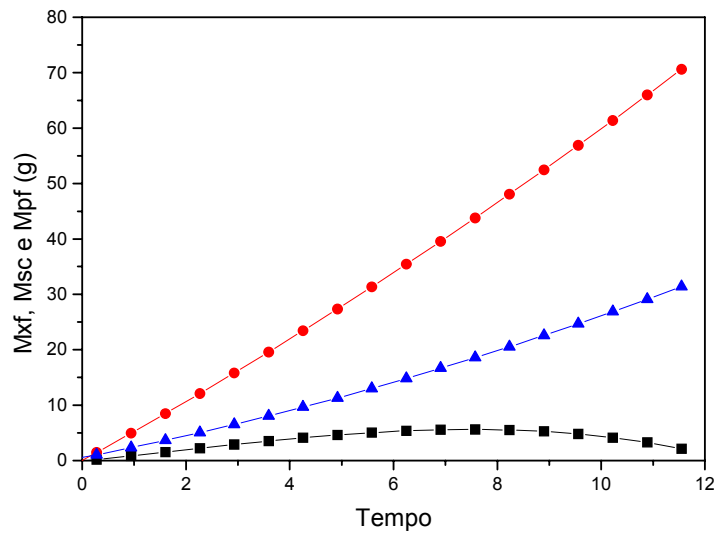
Observa-se no ensaio realizado com hidrolisado tratado com carvão ativo (Figura 5.5) que durante a alimentação ocorre um acúmulo de substrato, o que indica que nestas condições a cultura não foi capaz de consumi-lo a uma velocidade maior ou igual a de fornecimento. Fato que pode ser comprovado, visto que é sabido



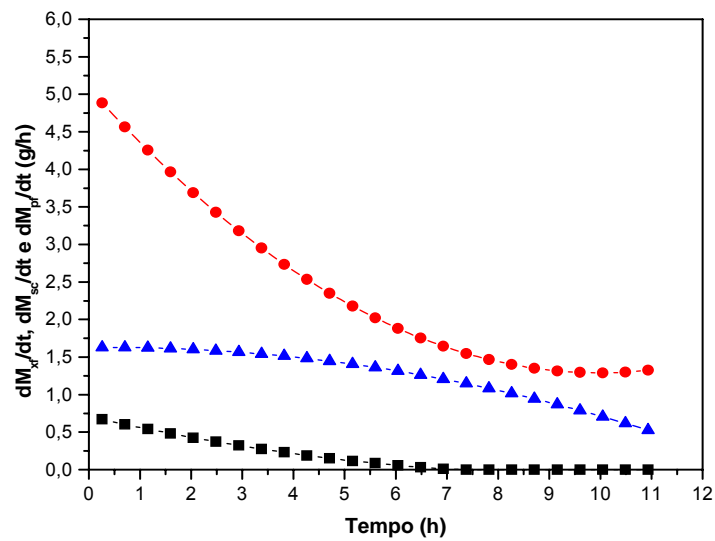
que a velocidade de alimentação é igual a 6,4 gramas de açúcares/hora e as velocidades de consumo de substrato são menores que 5 g/h Figura 5.9.



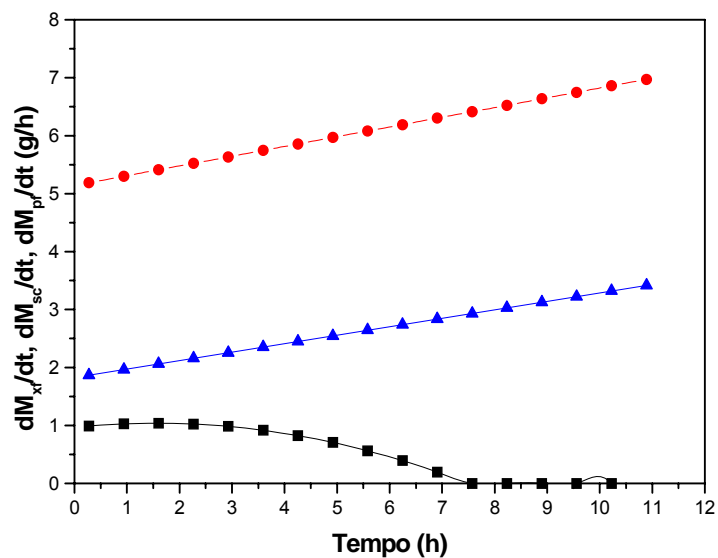
**Figura 5.7** – Massa de células formada (-■-), de substrato consumido (-●-) e de butanodiol formado (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado através da variação do pH e adsorção com carvão ativo.



**Figura 5.8** – Massa de células formada (-■-), de substrato consumido (-●-) e de butanodiol formado (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado com resinas de troca iônica.



**Figura 5.9** – Velocidades de formação de células (-■-), de consumo de substrato (-●-) e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado através da variação do pH e adsorção com carvão ativo.



**Figura 5.10** – Velocidades de formação de células (-■-), de consumo de substrato (-●-) e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado com resinas de troca iônica.

Comportamento inverso foi observado na fermentação em que empregou-se hidrolisado tratado com resinas de troca iônica: mesmo com uma velocidade mássica de alimentação maior que a do ensaio anterior (7,2 gramas de açúcares/hora), a velocidade de consumo de substrato aumentou com o tempo (Figura 5.10) e, conseqüentemente, não houve acúmulo (Figura 5.6).

Como pode-se observar na Figura 5.8, até o final da alimentação cerca de 65 gramas de substrato já haviam sido consumidos, o que corresponde a 85% do açúcar adicionado. Já no ensaio anterior apenas 40% do substrato adicionado havia sido consumido até o final da alimentação (Figura 5.7).

Com relação à formação de produto nota-se nitidamente a qualidade do hidrolisado tratado com resinas. Neste caso em 10,5 horas foram produzidos 29 gramas de butanodiol. No ensaio utilizando hidrolisado tratado com carvão, foram produzidos, no mesmo tempo, aproximadamente 13,7 gramas de butanodiol, resultados que estão diretamente relacionados com as velocidades de formação de produto. Como se verifica na figura 5.9 a velocidade de formação de produto durante o ensaio empregando-se hidrolisado tratado com carvão decresce com o tempo. O mesmo não aconteceu no ensaio em que se empregou hidrolisado tratado com resinas, ou seja, a velocidade de formação de produto foi crescente durante toda a fase de alimentação, chegando a valores próximos a 3,5 g/h (Figura 5.10).

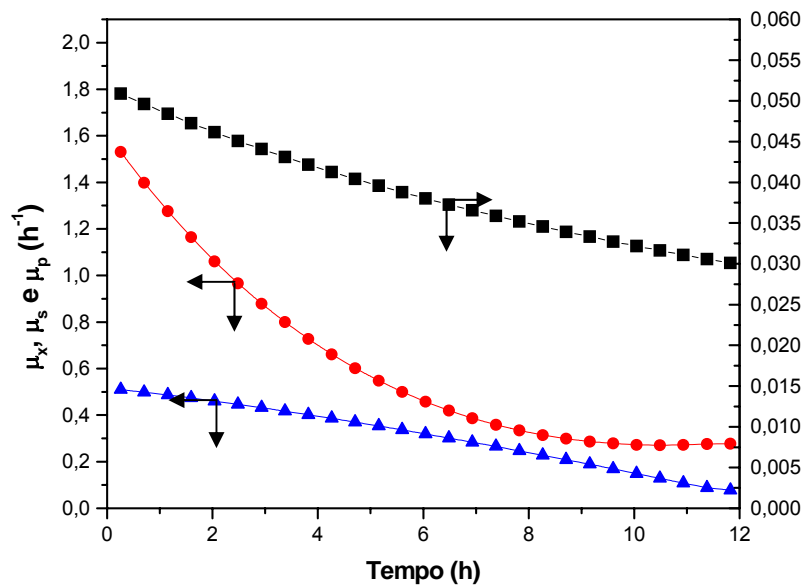
Com relação ao crescimento celular, observa-se em ambos ensaios um pequeno aumento na massa de células até o tempo de aproximadamente 6,5 horas (Figura 5.7 e 5.8), mantendo-se praticamente constante até o final da alimentação. Com cerca de 7 horas de fermentação a velocidade de crescimento celular passa a ser nula (Figura 5.9 e 5.10).

Observa-se que nos dois ensaios as velocidades específicas máximas de crescimento celular ocorreram no início do cultivo e decresceram durante a alimentação (Figura 5.11 e 5.12), sendo que  $\mu_x$  chegou a valores próximos de zero a partir de 7 horas.

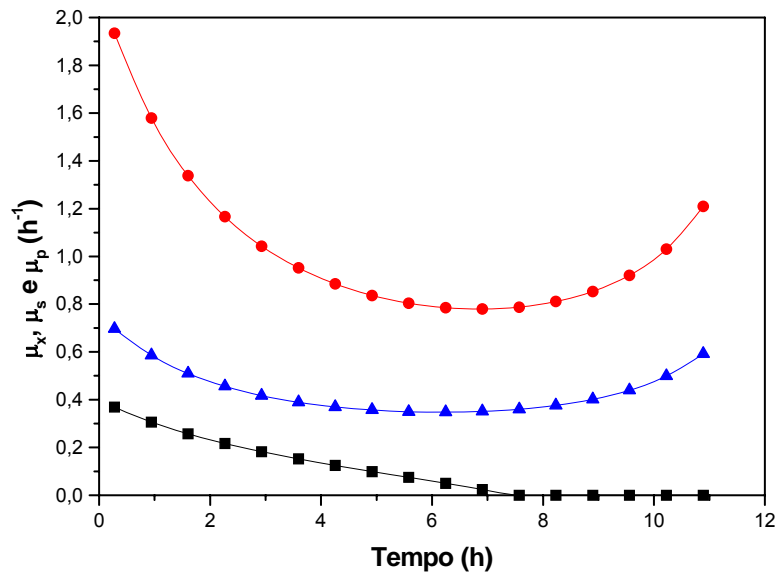
A Tabela 5.19 mostra os valores das velocidades específicas máximas encontradas durante a fermentação dos dois diferentes hidrolisados empregados.

**Tabela 5.19 - Velocidades específicas máximas encontradas durante a fermentação dos dois diferentes hidrolisados empregados**

	$\mu_{\max}$	$\mu_{s\max}$	$\mu_{p\max}$
Empregando-se hidrolisado tratado com carvão ativo	0,05 h <sup>-1</sup>	1,5 h <sup>-1</sup>	0,5 h <sup>-1</sup>
Empregando-se hidrolisado tratado com resinas de troca iônica	0,37 h <sup>-1</sup>	1,9 h <sup>-1</sup>	0,7 h <sup>-1</sup>



**Figura 5.11** – Velocidades específicas de crescimento (-■-), de consumo de substrato (-●-) e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado através da variação do pH e adsorção com carvão ativo.



**Figura 5.12** – Velocidades específicas de crescimento (-■-), de consumo de substrato (-●-) e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado com resinas de troca iônica.

Na Tabela 5.20 encontram-se os parâmetros fermentativos do processo: Massa de butanodiol obtida, fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ), fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ ) e produtividade mássica em butanodiol ( $Q_p$ ) das fermentações realizadas.

Pode-se considerar que no ensaio onde empregou-se o hidrolisado tratado com carvão ativo obteve-se uma produtividade relativamente baixa (1,28 g/h) quando comparada ao valor obtido no ensaio em que se empregou hidrolisado tratado com resinas. Neste caso obteve-se uma produtividade mássica de 2,8 g/h, praticamente o mesmo valor obtido por Garcia (1999), que trabalhou com as mesmas condições de fermentação, porém com um hidrolisado de eucalipto com características diferentes e obteve uma produtividade de 2,9 g/h.

Isto sugere que o tratamento com carvão ativo não foi eficiente a ponto de remover totalmente os inibidores do metabolismo microbiano, resultando uma baixa velocidade do processo, mesmo obtendo-se fatores de conversão próximos do teórico.

Com relação ao tratamento com resinas, pode-se considerá-lo eficiente pois removeu 100% dos inibidores que foram dosados, o que possibilitou obter ótimos resultados durante o processo fermentativo. Sugere-se a possibilidade de aumentar a concentração de substrato do meio de alimentação para que seja possível obter maiores concentrações de butanodiol, favorecendo assim a sua recuperação no meio fermentado.

**Tabela 5.20 – Parâmetros fermentativos dos ensaios conduzidos em sistema descontínuo alimentado empregando hidrolisado tratado através da variação do pH e adsorção com carvão ativo (R1) e hidrolisado tratado com resinas de troca iônica (R2).**

PARÂMETROS AVALIADOS	R1	R2
Produção de 2,3-butanodiol	15,8 g	29,8 g
Y <sub>x/s</sub>	0,08 g/g	0,07 g/g
Y <sub>p/s</sub>	0,50 g/g	0,46 g/g
Q <sub>p</sub>	1,28 g/h	2,8 g/h

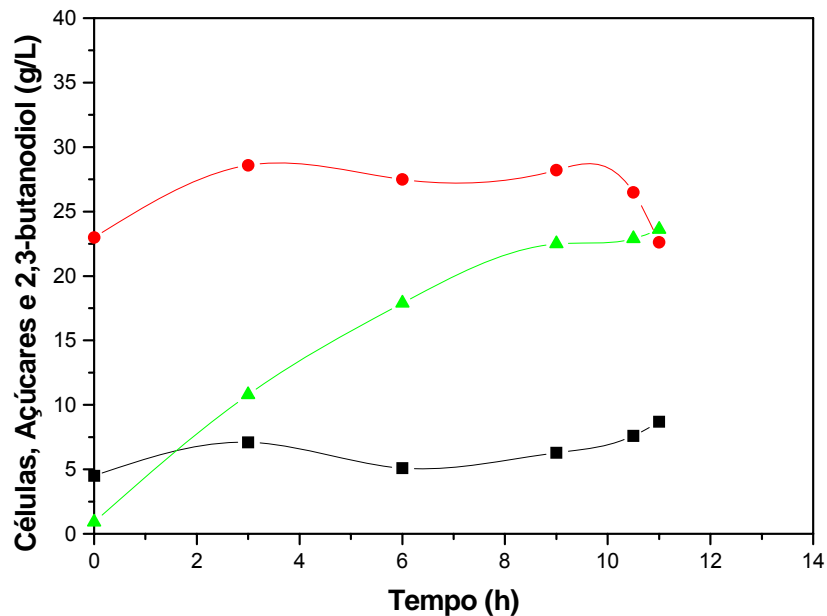
## 5.8 AVALIAÇÃO DA NECESSIDADE DE NUTRIENTES

Com o objetivo de avaliar o desempenho da bactéria *Klebsiella pneumoniae* na ausência de alguns nutrientes, foi realizado um ensaio de fermentação onde o meio de alimentação foi composto por hidrolisado tratado com resinas de troca iônica e suplementado apenas com extrato de levedura (5 g/L). Os ensaios foram conduzidos em sistema descontínuo alimentado, conforme descrito no item (4.7.2). Na tabela 5.21 encontram-se os valores das concentrações de células, substrato, produto e ácido acético durante a fase de alimentação do ensaio realizado. Todos os parâmetros utilizados na discussão também foram calculados durante a fase de alimentação. A concentração de açúcares do meio de alimentação foi de 114,2 g/L e a de ácido acético foi nula.

**Tabela 5.21 – Ensaio fermentativo de produção de butanodiol, em hidrolisado suplementado apenas com extrato de levedura.**

TEMPO (h)	CÉLULAS (g/L)	SUBSTRATO (g/L)	PRODUTO (g/L)	ÁC. ACÉTICO (g/L)
0	4,5	23	0,9	1,1
3	7,1	28,6	10,8	0,7
6	5,1	27,5	17,9	0,5
9	6,3	28,2	22,5	0,43
10,5	7,6	26,5	22,9	0,3

Os perfis da fermentação realizada estão apresentados na Figura 5.13, onde a linha pontilhada indica o final da alimentação. Observa-se que durante a alimentação o comportamento em relação às concentrações de células, de açúcares e de butanodiol foi semelhante ao obtido no ensaio realizado com hidrolisado suplementado com todos os nutrientes da (Tabela 4.6) (Figura 5.6).



**Figura 5.13 –** Concentrações de células (-■-), de açúcares (-●-) e de 2,3-butanodiol (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado com resinas e suplementado apenas com extrato de levedura.

Observa-se na Figura 5.14 que o comportamento das duas fermentações, A e B, em termos de massa de substrato consumido e de produto formado foram semelhantes, atingindo cerca de 70 g e 30 g, respectivamente.

De acordo com o observado pela velocidade de formação de células (Figura 5.15 A), o crescimento celular cessou após 7,5 horas no ensaio em que se empregou hidrolisado suplementado com todos os nutrientes, causando um decréscimo na concentração de células (Figura 5.6), devido à variação do volume do reator até 10,5 horas.

Com relação à velocidade de consumo de substrato, não se nota diferenças significativas, porém, com relação à velocidade de formação de produto o perfil da curva é inverso, ou seja, decresce com o tempo.

Na Tabela 5.22 encontram-se os parâmetros fermentativos do processo: Massa de butanodiol obtida, fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ), fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ ) e produtividade mássica em butanodiol ( $Q_p$ ) da fermentação realizada com hidrolisado suplementado com extrato de levedura.

**Tabela 5.22 – Parâmetros fermentativos do ensaio conduzido em sistema descontínuo alimentado empregando hidrolisado tratado com resinas de troca iônica e suplementado com extrato de levedura.**

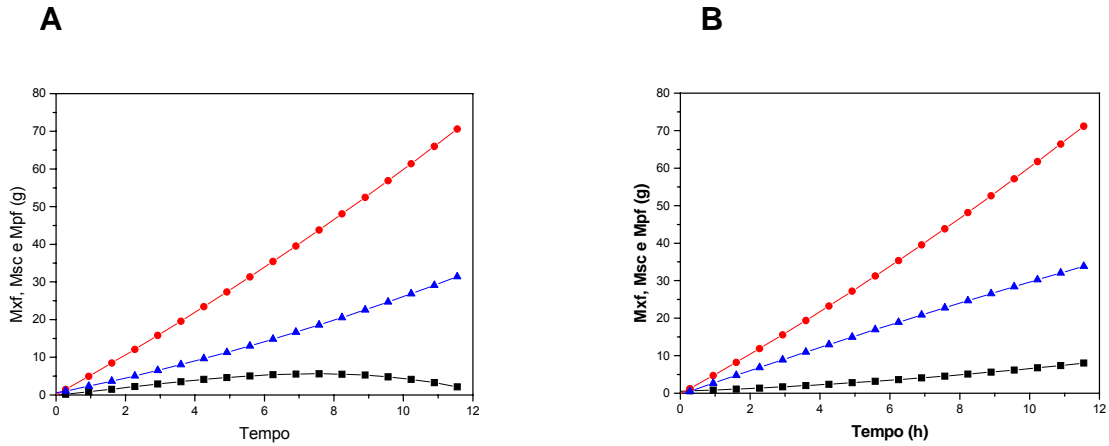
PARÂMETROS AVALIADOS	RESULTADOS OBTIDOS
Produção de butanodiol	30,9 g
$Y_{x/s}$	0,12 g/g
$Y_{p/s}$	0,49 g/g
$Q_p$	2,9 g/h

Embora existam algumas diferenças entre os dois ensaios, estas não afetaram a produção de butanodiol, que foi de 29,8 g no ensaio A (Tabela 5.21) e 30,9 no ensaio B (Tabela 5.22). O mesmo acontece com a produtividade, onde obteve-se valores próximos (2,8 g/h para o ensaio A e 2,9 g/h para o ensaio B).

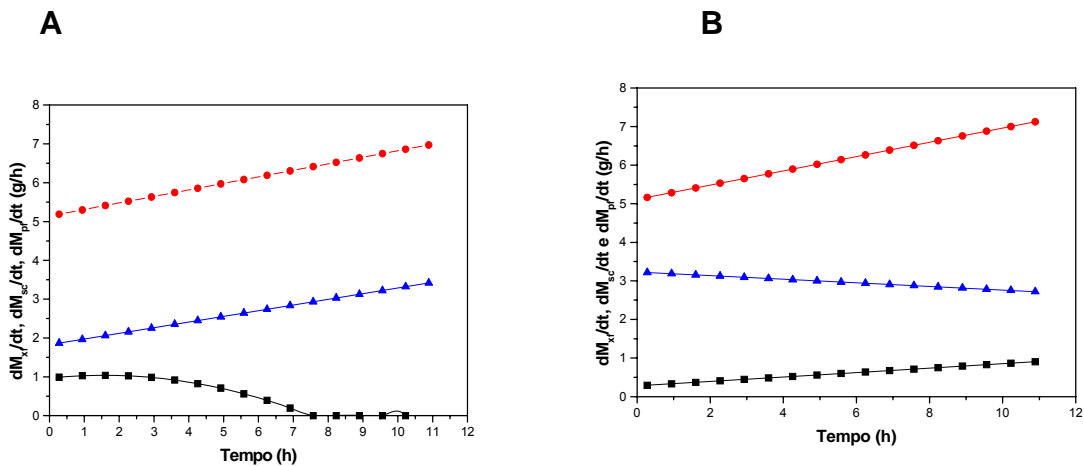
Como o objetivo desta etapa foi testar o comportamento da bactéria na ausência de alguns nutrientes, para que estes possam ser eliminados e, conseqüentemente, diminuir custos e tempo de processo, pode-se concluir que



apenas o extrato de levedura é suficiente para suplementar o meio de alimentação, mantendo valores de produtividades desejáveis.



**Figura 5.14** Massa de células formada (-■-), de substrato consumido (-●-) e de 2,3-butanodiol formado (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado com resinas de troca iônica e suplementado com todos os nutrientes (A) e com apenas extrato de levedura (B).



**Figura 5.15** Velocidades de formação de células (-■-), de consumo de substrato (-●-) e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se hidrolisado de aparas de eucalipto tratado com resinas de troca iônica e suplementado com todos os nutrientes (A) e com apenas extrato de levedura (B).

## 5.9 TESTES DA VAZÃO DE ALIMENTAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO

Com o objetivo de aumentar a produtividade do processo fermentativo, foram realizados dois ensaios em sistema descontínuo alimentado conforme descrito no item (4.7.3), um utilizando uma vazão de alimentação ( $\phi$ ) de 170 mL/h e uma concentração de substrato no meio de alimentação ( $S_i$ ) de 120 g/L, correspondendo a uma vazão mássica de adição de substrato igual a 20,4 g/h, e outro utilizando uma vazão de alimentação de 72 mL/h e uma concentração de substrato no meio de alimentação de 221 g/L, correspondendo a uma vazão mássica de adição de substrato igual a 16,6 g/h

Empregou-se em todos os ensaios um meio de alimentação composto por hidrolisado tratado com resinas de troca iônica e suplementado apenas com extrato de levedura (5 g/L).

### 5.9.1 ENSAIO DE FERMENTAÇÃO UTILIZANDO UMA VAZÃO MÁSSICA DE ALIMENTAÇÃO DE 20,4 g/h

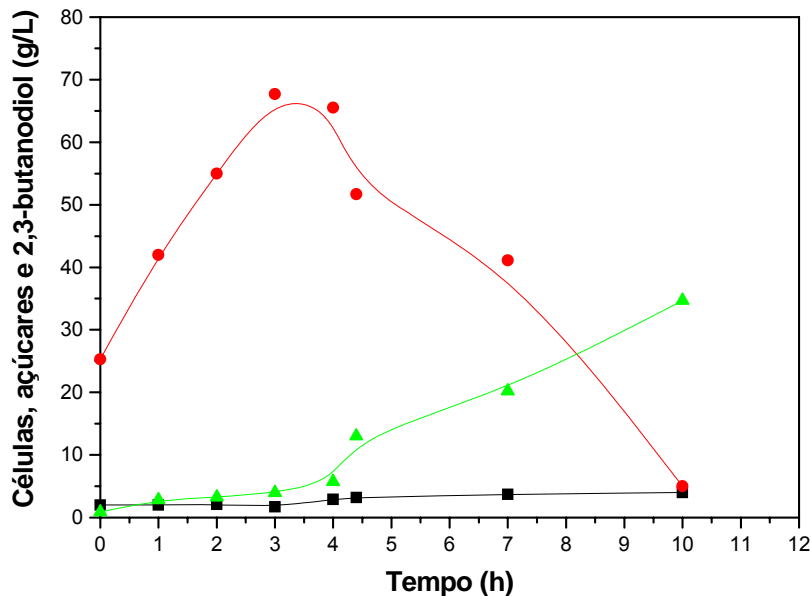
Na tabela 5.23 encontram-se os valores das concentrações de células, substrato, produto e ácido acético durante 10 horas de fermentação. A fase de alimentação durou 4,4 horas.

**Tabela 5.23 – Ensaio fermentativo de produção de butanodiol, em hidrolisado suplementado apenas com extrato de levedura.**

Tempo (h)	Células (g/L)	Substrato (g/L)	Produto (g/L)	Ác. Acético (g/L)	Qp (g/h)
0	2,0	25,3	0,9	1,1	0
1	1,98	42	2,82	1,21	2,17
2	2,1	55	3,25	1,34	1,53
3	1,7	67,7	3,94	1,54	1,46
4	2,9	65,5	5,7	1,13	1,82
4,4	3,2	51,7	13,0	0,8	3,99
7	3,7	41,1	20,2	0,2	3,9
10	4,0	5,0	34,7	2,7	4,7

Os resultados obtidos em termos de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto estão apresentados na Figura 5.16. Observa-se

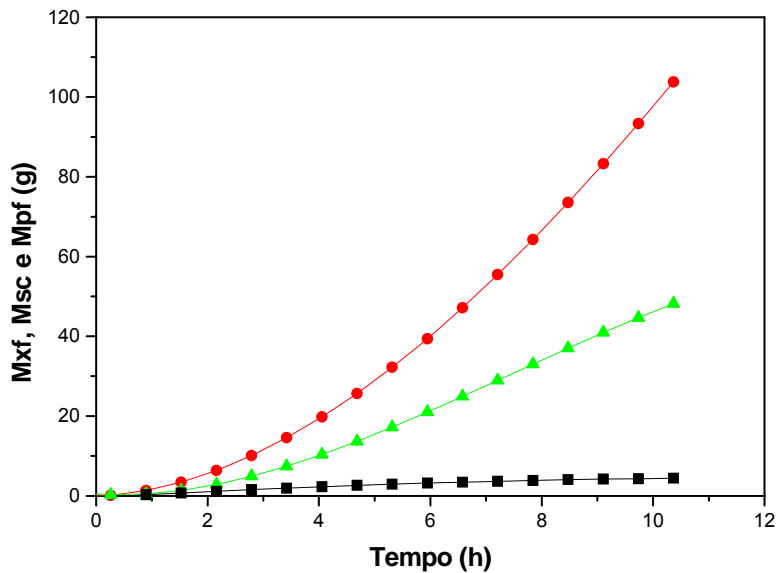
que com 10 horas de fermentação praticamente todo o substrato foi consumido, favorecendo o aumento da produtividade em relação aos resultados obtidos anteriormente. As concentrações de células durante a alimentação foram menores que devido a elevada vazão de alimentação, no entanto as velocidades específicas de consumo de substrato e de formação de produto foram elevadas, comparadas com as obtidas em ensaios anteriores.



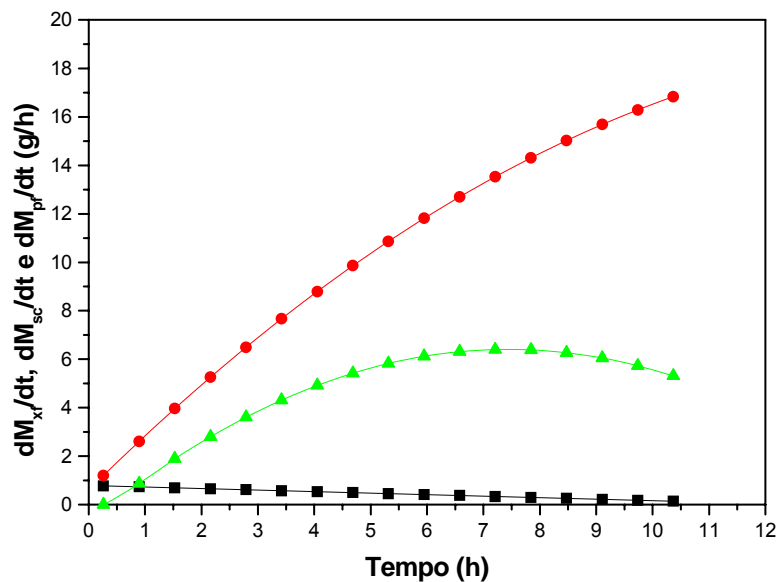
**Figura 5.16** – Concentrações de células (-■-), de açúcares (-●-) e de 2,3-butanodiol (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, utilizando  $\phi=170$  mL/h e  $S_i=120$  g/L .

Na Figura 5.17 estão apresentados os valores calculados das massas de células, de açúcares e de butanodiol, durante a fermentação, em função do tempo. As velocidades de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto, em função do tempo, assim como as respectivas velocidades específicas, estão apresentadas nas Figuras 5.18 e 5.19. As velocidades máximas de consumo de substrato e de formação de produto foram de 16,8 g/h e 5,7 g/h, respectivamente, valores considerados elevados quando comparados aos obtidos anteriormente, que ficaram em torno de 7 g/h e 3 g/h, respectivamente.

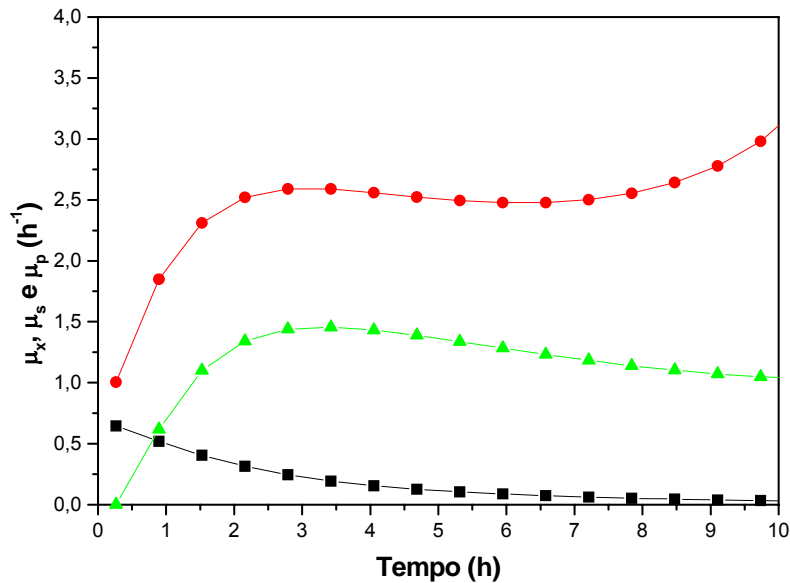
Na Tabela 5.24 encontram-se os parâmetros fermentativos do processo: Massa de butanodiol obtida, fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ), fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ ) e produtividade mássica em butanodiol ( $Q_p$ ), que foram calculados no final da fermentação.



**Figura 5.17** – Massa de células formada (-■-), de substrato consumido (-●-) e de 2,3-butanodiol formado (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se  $\phi=170$  mL/h e  $S_i=120$  g/L .



**Figura 5.18** – Velocidades de formação de células (-■-), de consumo de substrato (-●-) e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se  $\phi=170$  mL/h e  $S_i=120$  g/L .



**Figura 5.19** – Velocidades específicas de formação de células (-■-), de consumo de substrato (-●-) e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se  $\phi=170$  mL/h e  $S_i=120$  g/L .

**Tabela 5.24** – Parâmetros fermentativos do ensaio conduzido em sistema descontínuo alimentado empregando hidrolisado tratado com resinas de troca iônica e suplementado com extrato de levedura a uma vazão mássica de 20,4 g/h.

PARÂMETROS AVALIADOS	RESULTADOS OBTIDOS
Produção de butanodiol	46,3 g
$Y_{x/s}$	0,04 g/g
$Y_{p/s}$	0,48 g/g
$Q_p$	4,63 g/h

A massa de produto e a produtividade obtidas permitem concluir que as condições utilizadas neste ensaio podem ser consideradas até o momento as mais favoráveis ao processo em estudo, considerando que para o processo de recuperação do produto a concentração de butanodiol no meio fermentado deve ser a maior possível.

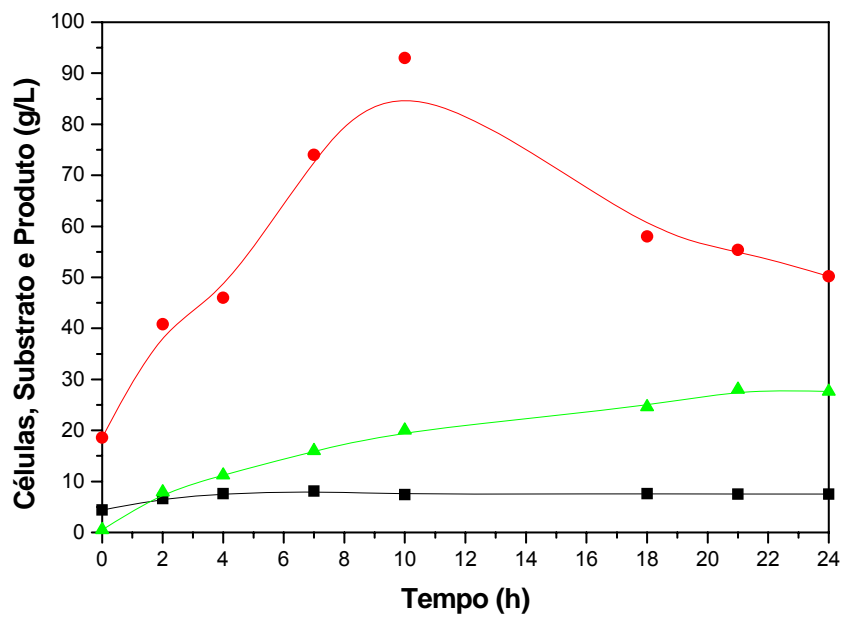
### 5.9.2 ENSAIO DE FERMENTAÇÃO UTILIZANDO UMA VAZÃO MÁSSICA DE ALIMENTAÇÃO DE 16,6 g/h.

Na tabela 5.26 encontram-se os valores das concentrações de células, substrato, produto e ácido acético durante 24 horas de fermentação. A fase de alimentação durou 10 horas.

**Tabela 5.25 Ensaio fermentativo de produção de 2,3-butanodiol, em hidrolisado suplementado apenas com extrato de levedura e utilizando uma vazão mássica de alimentação de 16,6 g/h.**

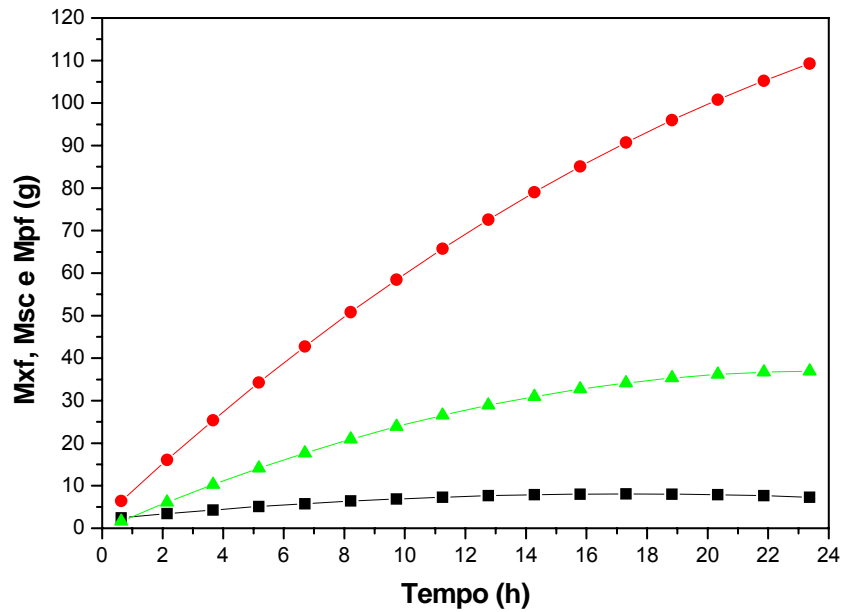
Tempo (h)	Células (g/L)	Substrato (g/L)	Produto (g/L)	Ác. Acético (g/L)	Qp (g/h)
0	4,4	18,6	0,5	1,1	0
2	6,6	40,8	7,9	0	2,96
4	7,6	46	11,2	0,7	2,52
7	8,1	74	16	1,1	2,57
10	7,4	93	20	1,2	2,70
18	7,6	58	24,6	1,1	1,85
21	7,5	55,4	28	1,3	1,80
24	7,5	50,2	27,5	1,4	1,55

Os resultados obtidos em termos de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto estão apresentados na Figura 5.20. Observa-se que após 20 horas de fermentação a produção de butanodiol praticamente não aumentou, proporcionando o decréscimo da produtividade.

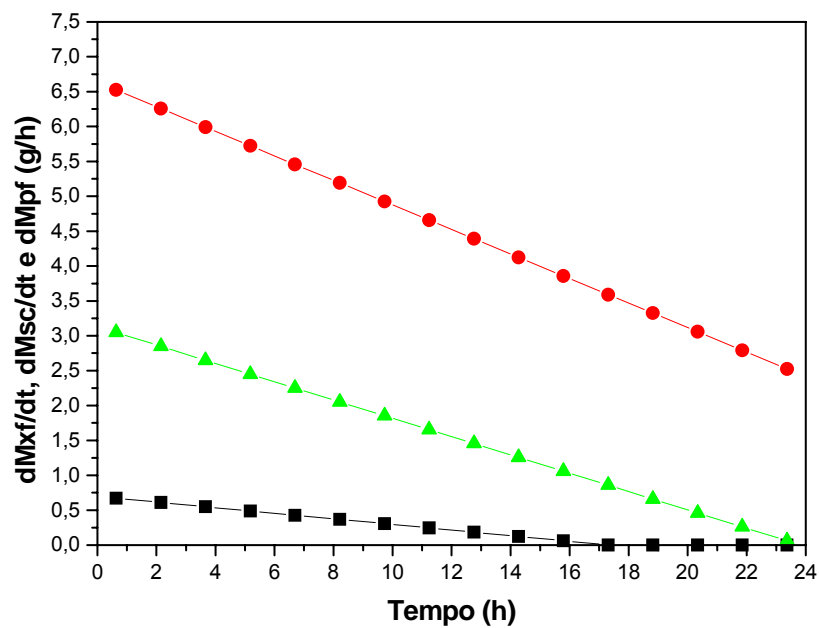


**Figura 5.20** – Concentrações de células (-■-), de açúcares (-●-) e de butanodiol (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, utilizando  $\phi=72$  mL/h e  $S_i=221$  g/L .

Na Figura 5.21 estão apresentados os valores calculados das massas de células, de açúcares e de 2,3-butanodiol, durante a fermentação, em função do tempo. As velocidades de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto, em função do tempo, assim como as respectivas velocidades específicas, estão apresentadas nas Figuras 5.22 e 5.23. As velocidades máximas de consumo de substrato e de formação de produto foram de 6,5 g/h e 3,0 g/h, respectivamente, valores considerados baixos quando comparados aos obtidos no ensaio anterior, que foram de 16,8 g/h e 5,7 g/h, respectivamente.

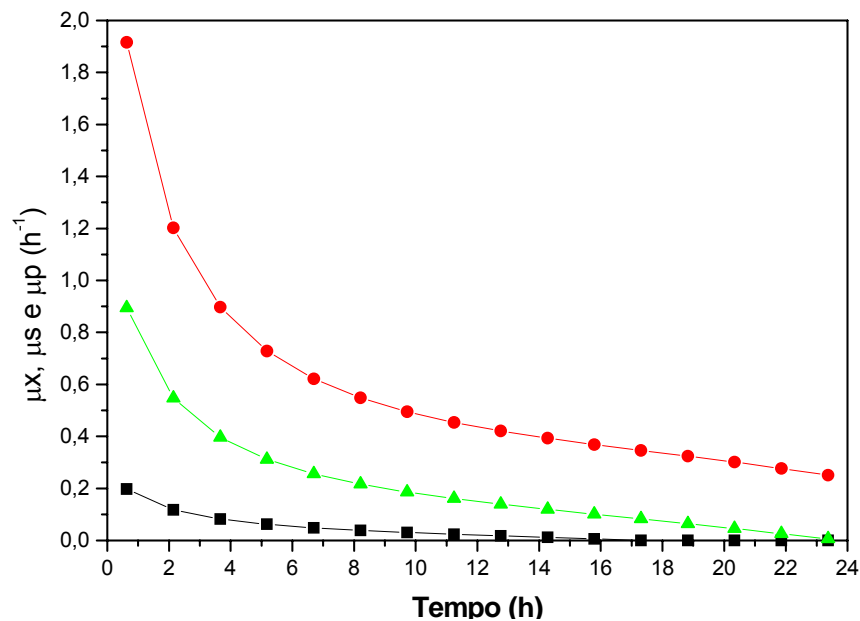


**Figura 5.21** – Massa de células formada (-■-), de substrato consumido (-●-) e de 2,3-butanodiol formado (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se  $\phi=72$  mL/h e  $S_i=221$  g/L .



**Figura 5.22** – Velocidades de formação de células (-■-), de consumo de substrato (-●-) e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se  $\phi=72$  mL/h e  $S_i=221$  g/L .





**Figura 5.23** – Velocidades específicas de formação de células (-■-), de consumo de substrato (-●-), e de formação de produto (-▲-), em função do tempo, durante ensaio de fermentação em sistema descontínuo alimentado, empregando-se  $\phi=72$  mL/h e  $S_i=221$  g/L.

Observa-se que a velocidade de consumo de substrato decresce com o tempo, bem como a velocidade de formação de produto. Este comportamento sugere que houve uma inibição do processo, devido ao acúmulo de substrato que chegou a atingir 93 g/L.

Na Tabela 5.26 encontram-se os parâmetros fermentativos do processo: Massa de 2,3-butanodiol obtida, fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ), fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ ) e produtividade mássica em 2,3-butanodiol ( $Q_p$ ), que foram calculados no final da fermentação.

**Tabela 5.26** – Parâmetros fermentativos do ensaio conduzido em sistema descontínuo alimentado empregando hidrolisado tratado com resinas de troca iônica e suplementado com extrato de levedura, a uma vazão mássica de 16,6 g/h.

PARÂMETROS AVALIADOS	RESULTADOS OBTIDOS
Produção de 2,3-butanodiol	37,1 g
$Y_{x/s}$	0,045 g/g
$Y_{p/s}$	0,22 g/g
$Q_p$	1,55 g/h

A massa de produto e a produtividade obtidas permitem concluir que as condições utilizadas neste ensaio não são favoráveis para o processo em estudo, quando comparadas ao ensaio anterior, onde obteve-se uma produção de 2,3-butanodiol de 46,3 g com uma produtividade de 4,63 g/h.

### 5.10 RECUPERAÇÃO DO PRODUTO

Para os estudos de recuperação de butanodiol através da técnica de “salting out”, o meio fermentado foi inicialmente submetido a centrifugação para remoção de células.

Com o objetivo de determinar a melhor temperatura e a melhor concentração de sal que proporcione uma maior recuperação de 2,3-butanodiol do meio fermentado, foi realizado um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> completo.

Na Tabela 5.27 está apresentada a matriz de planejamento utilizada, contendo os fatores temperatura e concentração de sal, assim como os resultados obtidos em termos de recuperação de butanodiol.

Observa-se que com o aumento da temperatura de 20 °C para 60 °C a recuperação de butanodiol diminui nitidamente (ensaio 3 e 4). Em temperaturas menores o aumento da concentração de sal foi mais favorável ao processo de recuperação do que em temperaturas maiores.

**Tabela 5.27 – Matriz de planejamento fatorial 2<sup>2</sup> utilizada.**

ENSAIOS	VARIÁVEIS		RESPOSTA
	TEMPERATURA (°C)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (%)	RECUPERAÇÃO DE BUTANODIOL (%)
1	20	30	0
2	60	30	0
3	20	70	91
4	60	70	33
5	40	50	31
6	40	50	29
7	40	50	31

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada utilizando-se os programas STATGRAPHICS versão 2.1 e STATÍSTICA versão 5.0. As estimativas dos efeitos, erros padrão e teste t para o modelo que representa a recuperação de 2,3-butanodiol em função da temperatura e da concentração do sal, são mostrados na Tabela 5.28, onde **A** e **B** correspondem às variáveis codificadas: temperatura (°C) e concentração de sal (%).

A partir desta análise verificou-se que os efeitos **A** e **B** e a interação **A.B** foram significativos ao nível de 95% de confiança ( $t_{cal.} > t_{tab.}$ ).

**Tabela 5.28 – Estimativa dos efeitos, erros padrão e teste t para a concentração de xilose.**

EFEITOS	ESTIMATIVA	ERRO-PADRÃO	t
MÉDIA	30,7143	± 0,404061	76,014
A	-29,0	± 1,06904	27,127
B	62	± 1,06904	57,996
A.B	-29	± 1,06904	27,127

**Erro estimado a partir do erro total com 3 graus de liberdade ( t = 2,353 )**

A análise de variância foi realizada, estando os resultados apresentados na Tabela 5.29. Nesta análise observa-se que todos os fatores foram significativos, com um coeficiente de determinação de 99,9%.

**Tabela 5.29 – Análise de variância dos fatores temperatura, concentração de sal e interação.**

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GL	QUADRADO MÉDIO	F	P
A	841,0	1	841,0	735,87	0,0001
B	3844,0	1	3844,0	3363,50	0,0000
A.B	841,0	1	841,0	735,87	0,0001
Erro Total	3,42857	3	1,14286		
Total		6			

**R<sup>2</sup> = 99,9%**

Avaliando a variância do modelo com erro puro (Tabela 5.31), verifica-se que a falta de ajuste não é significativa (**p = 0,5286**), ou seja, a diferença entre os

valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pela equação do modelo pode ser explicada somente pelo erro experimental.

**Tabela 5.30 – Análise de variância com erro puro dos fatores temperatura, concentração ácida, relação sólido líquido e suas interações.**

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GL	QUADRADO MÉDIO	F	P
A	841,0	1	841,0	735,87	0,0001
B	3844,0	1	3844,0	3363,50	0,0000
A.B	841,0	1	841,0	735,87	0,0001
Falta de ajuste	0,761905	1	0,761905	0,57	0,5286
Erro Puro	2,66667	2	1,33333		
Total	5529,43	6			

**R<sup>2</sup> = 99,9%**

Pode-se considerar que o modelo é linear e é adequado para descrever os dados observados com 95% de confiança.

Com base nos dados obtidos, o do modelo linear proposto para descrever a recuperação de butanodiol do meio fermentado, na região em estudo, foi aquele representado pela equação 1:

$$Y = 30,7143 - 14,5*A + 31*B - 14,5*A*B$$

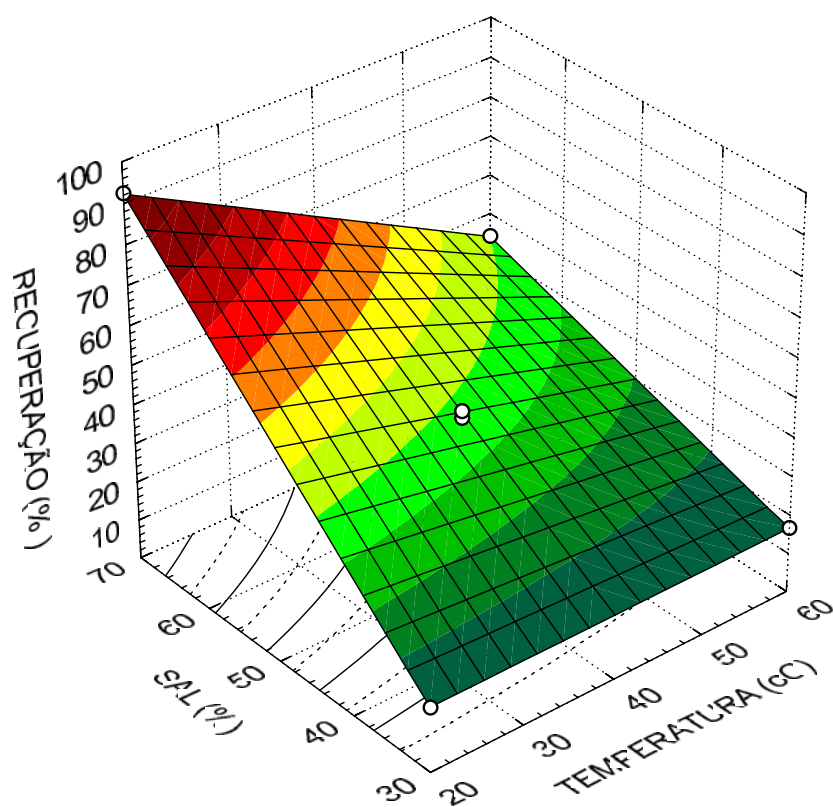
**(Equação 1)**

Onde:

Y: recuperação de butanodiol estimada pelo modelo

A: temperatura

B: concentração de sal



**Figura 5.24** Recuperação de 2,3-butanodiol em função da temperatura e da concentração de  $K_2CO_3$ .

## 6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- As aparas de eucalipto constituem uma fonte rica em carboidratos, possíveis de serem extraídos a partir do processo de hidrólise ácida.
- A maior extração de açúcares do material hemicelulósico é obtida quando emprega-se uma temperatura de 160 °C, uma concentração de ácido de 0,8% e uma proporção sólido:líquido de 1:3 e que condições mais drásticas favorecem a degradação dos açúcares, o que, conseqüentemente, faz com que o valor da porcentagem de pentosana extraídas seja baixo.
- O tratamento do hidrolisado com resinas de troca iônica é mais eficiente que o tratamento com carvão ativo, pois removeu 100% dos inibidores que foram dosados, resultando ótimos resultados durante o processo fermentativo, onde obteve-se uma produtividade mássica de 2,8 g/h.
- Extrato de levedura é suficiente para suplementar o meio de alimentação, na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto pela bactéria *Klebsiella pneumoniae*.

- A vazão mássica de adição de substrato mais favorável ao processo em estudo é de 20,4 g/h, obtendo-se 46,3 g de 2,3-butanodiol e uma produtividade de 4,63 g/h.

- Pela metodologia estatística usada foi possível estabelecer um modelo matemático para descrever a recuperação de 2,3-butanodiol do meio fermentado por *Klebsiella pneumoniae*. O modelo previsto para esta resposta, em função das variáveis estudadas e do efeito interativo entre elas, é dado pela equação:

$$\text{Recuperação \%} = 30,7143 - 14,5 \cdot \text{Temperatura} + 31 \cdot [\text{K}_2\text{CO}_3] - 14,5 \cdot \text{Temperatura} \cdot [\text{K}_2\text{CO}_3]$$

Sendo que, através desta equação, o modelo prevê uma recuperação máxima de butanodiol de 92 %, dentro do intervalo de confiança de 95 %.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o processo de hidrólise da fração celulósica do resíduo de eucalipto, com o objetivo de se obter maiores concentrações de açúcares, que podem ser utilizados pela bactéria *Klebsiella pneumoniae* na produção de 2,3-butanodiol.
- Avaliar a necessidade de se eliminar totalmente o ácido acético do hidrolisado hemicelulósico, durante o tratamento com resinas, visando simplificar o processo.
- Avaliar a utilização de uma vazão mássica de alimentação maior que 20,4 g/h, visando obter maiores concentrações de 2,3-butanodiol.
- Estudar alternativas para a purificação do produto.



## 8 REFERÊNCIAS

AFSCHAR, A.S., BELLGARDT, K.H., VAZ ROSSELL, C.E., CZOK, A., SCHALLER, K. The production of 2,3-butanediol by fermentation of high test molasses. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 34, p. 582-585, 1991.

AFSCHAR, A.S., VAZ ROSSEL, C.E., JONAS, R., CHANTO, A.Q. Microbial Production and Downstream Processing of 2,3-Butanediol. Journal of Biotechnology, v. 27, p. 317-329, 1993.

ALMEIDA E SILVA, J. B. Aplicação de Modelagem Matemática na Produção de Proteína Microbiana por *Paecilomyces variotti*, em Hidrolisado Hemicelulósico de Eucalipto. 160p. Tese (Doutorado). FCF – USP. São Paulo. 1996.

ALVES, L.A., FELIPE, M.G.A., SILVA, J.B., SILVA, S.S., PRATA, A.M.R. Pre Treatment of Sugar Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate for Xylitol Production by *Candida guilliermondii*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 70-72, p. 89-98, 1998.

BARRET, E.L., COLLINS, E.B., HALL, B.J., MATOJ, S.H. Journal of Dairy Science, v.66, p. 2507-2514, 1983.

BERBERT DE MOLINA, M.A. Avaliação de Caldo de Cana-de-Açúcar para Obtenção de 2,3-Butanodiol. 123p. Dissertação (Mestrado). FCF-USP, São Paulo. 1995.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of Celulosic Materials: Substrates, Microorganisms, Enzymes and Products. Enzyme and Microbial Technology, Surrey, v.3, p. 90-103, 1981.

BRITO, J.O.; BARRICHELO, L.E.G.; COUTO, H.T.Z.; FAZZIO, E.C.M.; CARRADINI, L.; CARRARA, M.A.; MIGLIORINI, A.J. Avaliação das características dos resíduos de exploração florestal do eucalipto para fins energéticos. Piracicaba: IPEF, 1979. (Circ. Tec. 62).

CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M.; PEREGO, P.; SILVIO, S. S.; ZILLI, M. Wood hydrolysis and hydrolysate detoxification for subsequent xylitol production. Chemical Engineering Technology, v. 23, p. 1013-1020, 2000.

CONVERTI, A.; PEREGO, P.; SORDI, A.; TORRE, P. 2,3-Butanediol Bioproduction from glucose by *Enterobacter aerogenes* and *Bacillus licheniformis*. In: 10<sup>th</sup> EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY, 8-11, JULY, 2001. Final Programme and Abstract Book. P. 191.

CRUZ, J.M., DOMÍNGUEZ, J.M., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J.C. Preparation of Fermentation Media from Agricultural Wastes and Their Bioconversion into Xylitol. Food Biotechnology, v.14(1&2), p.79-97, 2000.

DALE, B. E. Lignocellulose conversion and the future of fermentation biotechnology. Tibtech, v. 5, p. 287-291, 1987.

DECHOW, F.J. Separation and Purification Techniques in Biotechnology. New Jersey: Noyes Publications, 1989, 490p.

DEKKER, R. F. H. The enzymatic hydrolysis for biomass. In: Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa, 2, Maringá, 1985. Maringá, Universidade Estadual de Maringá, 1985. p. 11-13.

DUNNING, J.W.; DALLAS, D.E. Analytical procedures for control of saccharification process. Analytical Chemistry, v.21, n.6, p.727-729, 1949.

EITEMAN, M. A., MILLER, J. H. Effect of succinic acid on 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca*. Biotechnology Letters, v. 17, n. 10, p. 1057-1062, 1995.

ESENER, A.A., ROELS, J.A., KOSSEN, N.W.F. The influence of temperature on the maximum specific growth rate of *Klebsiella pneumoniae*. Biotechnology and Bioengineering, v. 23, p. 1401-1405, 1981.

ESPINOSA, J.A. Informe Temático Sobre la Utilización de la Lignina. Informe Interno ICIDCA, Cuba, 1972.

EVANS, S.; AZEMAN, A. Radiofrequency and microwave dielectric properties of aqueous cryoprotectant agents: dimethyl sulphoxide and 2,3-butanediol. Physics in Medicine and Biology, v. 43, n. 10, p. 2817-2829, 1998.

FAN, L.T.; LEE, Y.H.; GHARPURAY, M.M. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. Advance Biochemistry Engineering. V. 23, p. 158-187, 1982.

FAO (Food Agriculture Organization of the United Nations) Disponível na Internet via www. URL: [http://www.fao.org/forestry/fo/country/is.jsp?geo\\_id=206&lang\\_id=443](http://www.fao.org/forestry/fo/country/is.jsp?geo_id=206&lang_id=443) acesso em 02/04/2001.

FEARNSIDE, P.M. Plantation forestry in Brazil: Projection to 2050. Biomass and Bioenergy, v. 15, p. 437-450, 1998.

FELIPE, M.G.A., MANCILHA, I.M., VITOLO, M., ROBERTO, I.C., SILVA, S.S., ROSA, S.A.M. Preparation of Xyliol by Fermentation of a Hydrolysate of Hemicellulose Obtained from Sugarcane Bagasse. Arquivos de Biologia e Tecnologia, v.36, n.1, p.103-114, 1993.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989, 613p.

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

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

GARCIA, A. D. Definição das Condições Iniciais para Produção de 2,3-Butanodiol em Sistema Descontínuo Alimentado. 74 p. Dissertação (Mestrado). FAENQUIL. Lorena. 1999.

GARG, S. K., JAIN, A. Fermentative Production of 2,3-Butanediol: A Review. Bioresource Technology, v. 51, p. 103-109, 1995.

GOMES, J.M. COUTO, L. Produção de mudas de eucalipto. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 12, p. 80-82, 1986

GONG, C. S., CAO, N., TSAO, G. T. Biological Production of 2,3-Butanediol from Renewable Biomass. In: SAHA, B. C., WOODWARD, J. Eds. Fuels and Chemicals from Biomass. ACS SYMPOSIUM SERIES. Washington: American Chemical Society, 1997. p. 280-293.

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

HARLAND, C.E. Ion Exchange: Theory and Practice. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994, 285p.

IRICK, T.J.; WEST, K.; BROWNELL, H.H.; SCHWALD, W., SADDLER, J.N. Comparison of Colorimetric and HPLC Techniques for Quantitating the Carbohydrate Components of Steam – Treated Wood. Scientific Note. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 17, p.137-149, 1988.

JANSEN, N.B.; TSAO, G.T. Bioconversion of pentoses to 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. Advances in Biochemistry Engineering and Biotechnology, v. 27, p. 85-99, 1983.

JANSEN, N.B.; FLICKINGER, M.C.; TSAO, G.T. Production of 2,3-butanediol from D-Xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Biotechnology and Bioengineering, v. 26, p. 362-369, 1984.

JEFFRIES, T.W., LIGHTFOOT, E.N., FADY, J.H. Effect of Glucose Supplements on the Fermentation of Xylose by *Pachsolon tannophilus*. Biotechnology and Bioengineering, v.27, p.171-176, 1985.

KERN, M. NIDETZKY, B., KULBE, K.D., HALTRICH, D. Effect of nitrogen sources on the levels of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in the xylose-fermenting yeast *Candida tenuis*, Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 85, p.196-202, 1998.

KIM, S.B., YUM, D.M. PARK, S.C. Step-Change Variation of Acid Concentration in Percolation Reactor for Hydrolysis of Hardwood Hemicellulose. Bioresource Technology, v.72, p.289-294, 2000.

KUHAD, R.C., SINGH, A. Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects. Critical Reviews in Biotechnology, v. 13, n.2, p.151-172, 1993.

KUSUMEGI, K., YOSHIDA, H., TOMIYAMA, S. Inhibitory Effect of Acetic Acid on Respiration and Growth of *Zygosaccharomyces rouxii*. Journal of Fermentation and Bioengineering. v.85, n.2, p.213-217, 1998.

LEDDINGHAM, G.A., NEISH, A.C. Fermentative production of 2,3-butanediol. In: UNDERKOFER, L.A., HICKEY, R.J., Industrial Fermentations. New York, Chemical Publishing Co., 1954. p.27-93.

LONG, S., PATRICK, R. The present status of the 2,3 butylene-glycol fermentation, Advances in Applied Microbiology, v. 5, p. 135-155, 1963.

LYNCH, J.M. Utilization of lignocellulosic wastes. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement, p. 715-835, 1987.

- MADDOX, I.S., MURRAY, A.E. Production of n-Butanol by Fermentation of Wood Hydrolysate. Biotechnology Letters, v. 5, n. 3, p. 175-178, 1983.
- MADDOX, I. S. Microbial Production of 2,3-Butanediol. In: Rehm, H. J. & Reed, G. eds. Biotechnology: A Comprehensive Treatise in 8 Volumes. VCH Publishers, 1988, v.6b, cap. 2, p. 31-50.
- MAGALHÃES, J.G.R. Produção de sementes de eucalipto. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 12, p. 5-7, 1986.
- MAGEE, R.L., KOSARIC, N. The microbial production of 2,3-butanediol, Advances in Applied Microbiology, v. 32, p. 89-161, 1987.
- MENZEL, K.; ZENG, A. P.; BIEBL, H.; DECKWER, W. D. Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: I. The phenomena and characterization of oscillation and hysteresis. Biotechnology and Bioengineering, v. 52, p. 549-560, 1996.
- McMILLAN, J.D., Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In. Conversion of Hemicellulose Hydrolysates to Ethanol, Himmel, ME; Baker, 10, Overend, RP, (eds.), American Chemical Society Symposium. Série 566, p.292-324, 1994<sup>a</sup>
- MISHRA, P., SINGH, A. Microbial pentose Utilization. Advances in applied and Microbiology, v. 39, p. 91-149, 1993.
- MOSER, A. Special Cultivation Techniques. In: Rehm, H. -J. and Reed, G. (Eds.), Biotechnology, Fundamentals of Biochemical Engineering. Verlagsgesellschaft, Weinheim, v. 2, p. 311-347, 1985.
- MOHANDAS, D.V. WHELAN, D.R., PANCHAL, C.J. Developmentt of xylose fermenting yeast for etanol production at high acetic acid concentrations. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 51/52, p 307-318, 1995.
- MOTWANI, M., SETH, R., DAGINAWALA, H. F., KHANNA, P. Microbial production of 2,3-butanodiol from water hyacinth. Bioresearch Technology, v. 44, p.187-195, 1993.
- NIGAM, J.N. Ethanol Production from Wheat Straw Hemicellulose Hydrolysate by *Pichia stipitis*. Journal of Biotechnology, v.87, p.17-27, 2001.
- NILEGAONKAR, S.S., BHOSALE, S. B., DANDAGE, C. N., KAPADI, A. H. Potential of *Bacillus licheniformis* for the Production of 2,3-Butanediol. Journal of Fermentation and Bioengineering, v.82, n.4, p. 408-410, 1996.

- NILVEBRANT, N.O., REIMANN, A., LARSSON, S., JÖNSSON, L.J. Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates with Ion-Exchange Resins. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.91-93, p.35-49, 2001.
- NISHIKAWA, N.W., SUTCLIFFE, R., SADDLER, H.N. The influence of lignin degradation products on xylose fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 27, p. 549-552, 1988.
- OLSON, B.H., JOHNSON, M.J. The production of 2,3-butylene-glycol by *Aerobacter aerogenes* 199. Journal of Bacteriology, v. 55, p. 209-222, 1948.
- PALMQVIST, E.; HAHN – HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource Technology, v. 74, p. 25-33, 2000
- PARAJÓ, J.C., DOMINGUEZ, H., DOMINGUEZ, J.M. Improved Xylitol Production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from Raw or Detoxified Wood Hydrolysates. Enzyme and Microbial Technology, v.21, p.18-24, 1997.
- PARAJÓ, J.C., DOMINGUEZ, H., DOMINGUEZ, J.M. Biotechnology Production of Xylitol, Part 3: Operation in Culture Media Made from Lignocellulose Hydrolysates. Biorresouce Technology, v.66, p.25-40, 1998c.
- PESSOA JR, A.; MANCILHA, I.M.; SATO, S. Acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane bagasse. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 14, n. 3, p. 291-297, 1997.
- PIRT, S.J. The oxygen requirement of growing cultures of an *Aerobacter* species determined by means of the continuous culture technique Journal of General Microbiology, v. 16, p. 59-75, 1957.
- PIRT, S.J., CALLOW, D.S. Exocellular product formation by microorganisms in continuous culture. I - Procution of 2,3-butanediol by *Aerobacter aerogenes* in a single stage process. Journal of Applied Bacteriology, v. 21, p. 188-205, 1958.
- PRATA, A.M.R. Obtenção de 2,3-Butanodiol a Partir de Hidrolisado Hemicelulósico de Eucalipto em Regime Descontínuo Alimentado. 215 p. Tese (Doutorado). FCF-USP. São Paulo. 1997.
- PRATA, A. M. R.; HISS, H. Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico de Eucalipto para crescimento da Bactéria *Klebsiella pneumoniae*. Ciência & Engenharia, v. 7, n. 2, p. 21-25, 1998.
- PRESCOTT, S.C., DUNN, C.G. The production and properties of 2,3-butanediol. In:

Industrial microbiology. New York: Mc Graw-Hill, 1959. p.399-427.

PULS, J., SCHUSEIL, J. In: COUGHLAN, M.P., HAZLEWOOD, G.P. eds. Hemicellulose and Hemicellulases. Portland Press, Cambridge, p.1-27, 1993.

QURESHI, I.N.; MEAGHER, M.M.; HUTKINS, R.W. Recovery of 2,3-Butanediol by Vacuum Membrane Distillation. Sep. Sci. Technol., v. 29, n. 13, p 1733-1748, 1994.

RIPOLI, T.C., MIALHE, LG., BRITO, J.O., Queima de canavial o desperdício não mais admissível. Álcool e Açúcar, v. 54, p. 18-23, 1990.

ROBERTO, I.C., FELIPE, M.G.A., LACIS, L.C., SILVA, S.S., MANCILHA, I.M. Utilization of Sugar Cane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate by *Candida guilliermondii* for Xylitol Production. Bioresource Technology, v.36, p.271-275, 1991.

ROBERTO, I.C., MANCILHA, I.M., SOUZA, C.A., FELIPE, M.G.A., SATO, S., CASTRO, H.F. Evaluation of Rice Straw Hemicelulosic Hydrolysate in the Production of Xylitol by *Candida guilliermondii*. Biotechnology Letter. V.16, n.11, p. 1211-1216, 1994.

RODRIGUES, R. C. L. B., PRATA, A. M. R., RAMOS, R. M. Influência do pH e do uso de carvão ativo na redução do teor de impurezas do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química-Iniciação Científica, 1. **Anais...** p. 11-14, 1995.

RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; VITOLO, M.; GÓMEZ, P.V. The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 18, n. 3, p. 299-311, 2001

SABLAYROLLES, J.M., GOMA, G. Production discontinue de 2,3-butanediol por *Aerobacter aerogenes* NRRL B199: Effects de L'Agitation-Aeration. In: COLLOQUE SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE, IFP. Ruel-Malmaison, Paris, 1982. p. 317-333.

SADDLER, J.N., MES-HARTREE, M., YU, E.K.C., BROWNELL, H.H. Enzymatic hydrolysis of various pretreated lignocellulosic substrates and the fermentation of the liberated sugars to ethanol and butanediol. Biotechnology an Bioengineering Symposium, v. 13, p. 225-238, 1983.

SADDLER, J.N. YU, E.K.C., MÊS-HARTREE, M., LEVITIN, N., BROWNELL, H.H. Utilization of enzymatically hydrolyzed wood hemiceluloses by microorganisms for production of liquid fuels. Applied and Environmental Microbiology, v. 45. p. 153-160,

1983.

SHAN, M. M., LEE, Y. Y. Process Improvement in Acetone-Butanol Production from Hardwood by Simultaneous Saccharification and Extractive Fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 45/46, p. 585-597, 1994.

SILVA, S.S. QUEIROZ, M.A., FELIPE, M.G.A., ROBERTO, I.C., MANCILHA, I.M. Detoxification Methods of the Hemicellulosic Hydrolysate of Eucalyptus for Xylitol Production by *Candida guilliermondii*. In: SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, 13 Colorado Springs, Colorado, Program and Abstracts, p.44, maio, 1991.

SILVEIRA, M.M. Estudo cinético da fermentação butileno-glicólica de sacarose por *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199. 201 p. Tese (Doutorado). EPUSP. São Paulo, 1991.

SILVEIRA, M. M.; BERBERT DE MOLINA, M. A.; PRATA, A. M. R.; SCHMIDELL, W. Production of 2,3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199 in Batch and Fed-Batch Reactors. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 41, n. 3, p. 329-334, 1998.

SJOLANDER, N.O., LANGLYKKE, A.F., PETERSON, W.H. Butyl alcohol fermentation of wood sugar. Industrial and Engineering Chemistry, v. 30, n. 11, p. 1251-1255, 1938.

SOLTYS, K.A.; A.K.; KONERU, B. Successful non-freezing, sub-zero preservation of rat liver with 2,3-butanediol and type I antifreeze proteins. Hepatology, v. 28, n. 4, p. 24-28, 1998.

STANBURY, P., WHITAKER, A. Aeration and Agitation. In: STANBURY, P., WHITAKER, A. Principles of Fermentation Technology. Oxford, Pergamam Press, 1986. p. 169-172.

STÖMER, F. C. The pH 6 acetolactate-forming enzyme from *Aerobacter aerogenes*. Journal of Biological Chemistry, v. 243, p.3735-3739, 1968.

TAHERZADEH, M.J., NIKLASSON, C., LIDEN, G. On-line Control of Fed-Batch Fermentation of Dilute-Acid Hydrolysates. Biotechnology and Bioengineering, v.69, n.3, p. 330-338, 2000

TRAN, A.V., CHAMBERS, R.P. Lignin and extractives derived inhibitors in the 2,3-butanediol fermentation of mannose-rich prehydrolysates. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 23, p. 191-197, 1986.



TSAO, G.T. Conversion of cellulosic. Part. 1. Structures of cellulosic materials and their hydrolysis by enzymes. In: ALANI, D.I., MOO-YOUNG, M. eds. Perspectives in Biotechnology and Applied Microbiology. New York, Elsevier, 1986. p.205-212.

VIIKARI, L., TENKANEN, M., BUCHERT, J., RÄTÖ, M., BAILEY, M., SIIKAAHO, M., LINKO, M. Hemicellulases for Industrial Applications. In: J.N. SADDLER ed. Biotechnology in Agriculture, No 9. Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues, Wallingford: C.A.B. International, p. 131-182, 1993.

VIÑALS, M. V. Aplicação de resinas de troca iônica no tratamento de hidrolisado hemicelulósico para processos fermentativos. 79 p. Dissertação (Mestrado). FAENQUIL, Lorena, 2001.

VITAL, B. R., DELLA LUCIA, R. M. Propriedades físicas e mecânicas do eucalipto. Informe Agropecuário, v. 12, n. 141, p. 71-74, 1986.

VOLOCH, M., JANSEN, N.B., LADISCH, M.R., TSAO, G.T., NARAYAN, R., RODWELL, V.M. 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, p. 933-947.

WARD, G.F., PETTIJOHN, O.G., COGHILL, R.D. Production of 2,3-butanediol from Acid-Hydrolyzed Starch. Industrial Engineering and Chemistry, v. 37, p.1189-1194, 1945.

WATSON, N.E., PRIOR, B.A., du Preez, J.C., LATEGAN, P.M. Oxygen Requirement for the Xylose Fermentation to Ethanol and Polyols by *Pachysolen tannophilus*. Enzyme and Microbial Technology, v.6, p.447-450, 1984.

YU, E.K.C.; DESCHATELETS, L. SADDLER, J.N. The Bioconversion of wood hydrolyses to butanol and butanediol. Biotechnology Letters, v. 6, p. 327-332, 1984.

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

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

ZANÃO, D.F. Estudo da Vazão Mássica de Adição de Substrato para o Processo de Produção de 2,3-Butanodiol em Sistema Descontínuo Alimentado. 71 p. Dissertação

(Mestrado). FAENQUIL. Lorena. 2001.

ZENG, A-P, BIEBL, H., DECKWER, W-D 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes* in continous culture: role of oxygen suppl. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 33, p. 364-368, 1990.