



Potencialidade de aproveitamento de resíduos das indústrias sucroalcooleiras para produção de 2,3-butanodiol por *Klebsiella oxytoca*

Victoria Maria Baschera¹, Maria Eduarda Ribeiro², Caroline Rossi³,
Eloane Malvessi⁴, Mauricio Moura da Silveira⁵

¹Universidade de Caxias do Sul (vicbaschera@hotmail.com)

²Universidade de Caxias do Sul (mersouza@ucs.br)

³Universidade de Caxias do Sul (crossi5@ucs.br)

⁴Universidade de Caxias do Sul (emalvess@ucs.br)

⁵Universidade de Caxias do Sul (mmsilvei@ucs.br)

Resumo

A indústria sucroalcooleira é tradicional no Brasil tendo em vista a produção e comercialização de açúcar e etanol. Entretanto, como resultado, há geração de grande quantidade de subprodutos, os quais nem sempre são destinados corretamente. O bagaço de cana-de-açúcar, apesar do direcionamento para a geração de vapor e energia elétrica nas próprias usinas, apresenta-se como um problema, pois grande quantidade não é utilizada. Com o devido tratamento do bagaço, é possível a obtenção de hidrolisados lignocelulósicos, que são ricos em fontes de carbono como xilose e glicose, o que os torna matéria-prima aproveitável em fermentações. *Klebsiella oxytoca* é capaz de converter os açúcares presentes nos hidrolisados, levando à formação de 2,3-butanodiol (2,3-BDO), metabólito com grande potencial de aplicação em diferentes setores industriais. No presente trabalho foram formulados meios sintéticos baseados em misturas de glicose e xilose, em diferentes concentrações, como uma forma de simulação do uso de hidrolisados lignocelulósicos. Os parâmetros cinéticos de crescimento celular, consumo de substratos e formação de 2,3-BDO por *K. oxytoca* foram avaliados. Na presença simultânea de glicose e xilose, a glicose é o substrato preferencialmente consumido em detrimento da xilose durante o cultivo. A produção de 2,3-BDO foi superior na concentração mais alta de substratos avaliada (10 g/L de glicose + 65 g/L de xilose), atingindo cerca de 32 g/L, com total consumo dos substratos, o que indica a potencialidade de *K. oxytoca* na conversão de hidrolisados lignocelulósicos em 2,3-BDO.

Palavras-chave: 2,3-butanodiol, hidrolisados lignocelulósicos, xilose e glicose, *Klebsiella oxytoca*.

Área Temática: Tecnologias Ambientais

1 Introdução

As indústrias sucroalcooleiras são tradicionais no Brasil, envolvendo processos de produção e comercialização de açúcar e de etanol. Por esse motivo, o setor agroindustrial da cana-de-açúcar cresce a cada ano. Para a 2017/18, estima-se a produção média de 650 milhões de toneladas de cana, semelhante à safra anterior de 2015/16 (CONAB, 2017). Assim, milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar também são descartadas anualmente, e a destinação nem sempre é adequada. Quando não utilizado para a finalidade de produção de energia elétrica por sua queima, o bagaço se torna um fator poluente.



Entretanto, hidrolisados lignocelulósicos podem ser obtidos do bagaço de cana-de-açúcar por tratamento químicos, físico-químicos ou enzimáticos, obtendo assim, produtos com maior poder calorífico que o próprio bagaço. Os hidrolisados são ricos em fontes de carbono fermentescíveis, principalmente xilose e glicose, o que os torna particularmente atrativos como matéria-prima a ser utilizada em fermentações para obtenção de outros produtos, com destaque para o 2,3-butanodiol (2,3-BDO) (GEDDES *et al*, 2011).

Com o intuito de identificar e quantificar o percentual de açúcares presentes nos hidrolisados lignocelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar, Geddes *et al* (2011) relatam o uso de processos enzimáticos, em reações conduzidas entre 160 a 190°C. Segundo os autores as concentrações de glicose no hidrolisado podem variar de 1,4 a 8,9 g/L, e de xilose entre 36,6 a 65 g/L, podendo-se obter um xarope com cerca de 75 g/L de açúcares. Deste modo, as fontes de carbono glicose e xilose provenientes de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar podem ser utilizadas em ensaios de fermentação com enterobactérias como *Klebsiella oxytoca* para obtenção de 2,3-BDO.

O 2,3-BDO (C₄H₁₀O₂) é um líquido incolor e inodoro, com alto poder calorífico. Seus derivados possuem potencial aplicação na indústria de plásticos e na produção de solventes, como agente aromatizante altamente valorizado em produtos alimentares e como aditivo de combustíveis, além de ser intermediário químico para produção de borracha sintética (ZENG & SABRA, 2011; GARG & JAIN, 1995). Tem elevado ponto de ebulição, que chega a cerca de 180°C e seu poder calorífico (27,198 J/g) se compara favoravelmente ao de outros combustíveis líquidos como o metanol (22,081 J/g) e o etanol (29,055 J/g), indicando a possibilidade de sua utilização como biocombustível (FLICKINGER, 1980; MAGEE e KOSARIC, 1987). O butanodiol possui grande potencialidade em substituição aos derivados do petróleo, por ser um composto considerado biodegradável, se pensando em questões de potencial poluidor que os combustíveis fósseis acarretam. Ainda, o substrato utilizado para sua obtenção por via fermentativa pode ser advindo de fontes renováveis e de baixo custo, o que acaba por favorecer ainda mais os estudos sobre esses processos (CELINSKA e GRAJEK, 2009).

Nesse contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento celular, o consumo de substratos e a produção de 2,3-butanodiol por *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, em meios formulados com sais minerais e diferentes proporções de glicose e xilose, simulando a mistura encontrada em hidrolisados lignocelulósicos.

2 Material e Métodos

O microrganismo utilizado nos experimentos descritos no presente trabalho foi a enterobactéria *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, adquirida do banco de linhagens Bioscan (São Paulo, Brasil).

A cultura foi armazenada a 4°C e para sua ativação foram realizados repiques em placa de Petri contendo meio ágar nutriente, incubados a 37°C por 24 horas. O inóculo foi preparado a partir de uma suspensão de células obtida da raspagem da cultura previamente crescida, correspondente a 0,2 unidades de densidade óptica para cada frasco.

Os experimentos foram realizados em frascos sob agitação recíproca de 300 rpm, em agitador de bancada (Certomat U, B. Braun Biotech, Sartorius). Os frascos utilizados foram do tipo Erlenmeyer de 500 mL, com gargalo alongado, contendo 100 mL de meio formulado com sais minerais (descrito por Pirt e Callow, 1958) e as referidas fontes de carbono. Os frascos foram cobertos com uma manta de gaze e algodão hidrófobo. O pH inicial foi de 5,5 e controlado durante o processo pela adição de carbonato de cálcio (CaCO₃), para ser mantido numa faixa adequada para o cultivo (entre 5,5 e 6,5) (VOLOCH *et al*, 1985).



Os ensaios foram realizados em duplicatas e as condições testadas foram 5 g/L de glicose + 65 g/L de xilose no ensaio definido de A; 10 + 60 g/L no ensaio B; e 10 + 65 g/L no de glicose e xilose, respectivamente, no ensaio C. Essas condições foram definidas a partir de relatos de Geddes *et al* (2011), que afirmaram que a concentração de açúcares presentes no hidrolisados lignocelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar é de, em média, 10 g/L de glicose e 65 g/L de xilose. Estes dados serviram como base para simular, em meio sintético, a concentração das fontes de carbono no meio de produção de 2,3-BDO.

Alíquotas de 1 mL foram retiradas periodicamente para quantificação do crescimento celular, consumo de substrato e formação de produtos.

A quantificação do crescimento celular foi definida por medidas de densidade óptica, determinada a 520 nm em espectrofotômetro T80+ UV/VIS Spectrometer (PG Instruments Ltda). Os valores obtidos foram convertidos em concentração massa/volume (g/L) utilizando-se uma curva de calibração. As concentrações dos açúcares e dos principais produtos da fermentação, como o 2,3-BDO, acetil-metil-carbinol (acetoína) e etanol, foram quantificadas por cromatografia em fase líquida (Shimadzu, modelo LCMS 8030), utilizando coluna Aminex HPX-87H (300mm x 7,8mm, 9µm), volume de injeção de 5 µL, a 60°C, vazão de 0,6 mL/min e fase móvel H₂SO₄ 0,005 mol/L (Girardi, 2014).

Os ensaios foram conduzidos por um período de tempo que proporcionasse o consumo total das fontes de carbono, o que variou de uma condição avaliada para outra.

3 Resultados e Discussões

Na Figura 1 é apresentado o perfil de crescimento celular, de consumo de substrato e de formação de produtos durante os cultivos de *K. oxytoca*. Quando analisada a concentração celular nos ensaios A, B e C foram determinados 9,8, 8,2 e 8,6 g/L de biomassa, respectivamente. Esta pequena variação se deve, possivelmente, às concentrações iniciais de açúcares utilizadas, também próximas. Entretanto, a concentração celular máxima nem sempre foi atingida no mesmo período de cultivo, como pode ser observado na Figura 1.

Glicose e xilose foram totalmente consumidas entre 25 e 30 h de cultivo, independente da concentração inicial de substratos. Mesmo sendo o consumo identificado previamente, em período mais curto, os cultivos foram mantidos por 39 h com o intuito de avaliar o acúmulo dos produtos de interesse no meio reacional.

Em todas as condições, a glicose foi totalmente metabolizada nas primeiras horas de cultivo, lembrando que a concentração inicial de glicose foi inferior à concentração de xilose em todos os ensaios. É possível observar, na Figura 1 os perfis de consumo de substrato para A, B e C. Há um indicativo que, de acordo com o aumento da concentração de substrato total (glicose+xilose) o tempo para o consumo completo também foi superior. Pela análise do ensaio A, o substrato foi esgotado em cerca de 26 h; no ensaio B em 28 h e no ensaio C, em 29 h.

O perfil de variação de pH está intimamente ligado ao crescimento celular e a produção de 2,3-butanodiol, sendo seu controle essencial para o processo. Fora da faixa ideal, que pode variar de 5,5 a 6,5 para o microrganismo utilizado neste trabalho, o crescimento é claramente desacelerado (VOLOCH et al., 1985). Foi possível também manter o pH dentro da faixa indicada como ideal para *K. oxytoca* nesse tipo de processo (dados não mostrados). Portanto, a adição de carbonato de cálcio (CaCO₃) é percebida como essencial para manter o pH controlado ao longo do processo, já que o aumento da massa celular leva à acidificação do meio em função da formação de alguns metabólitos com caráter ácido.

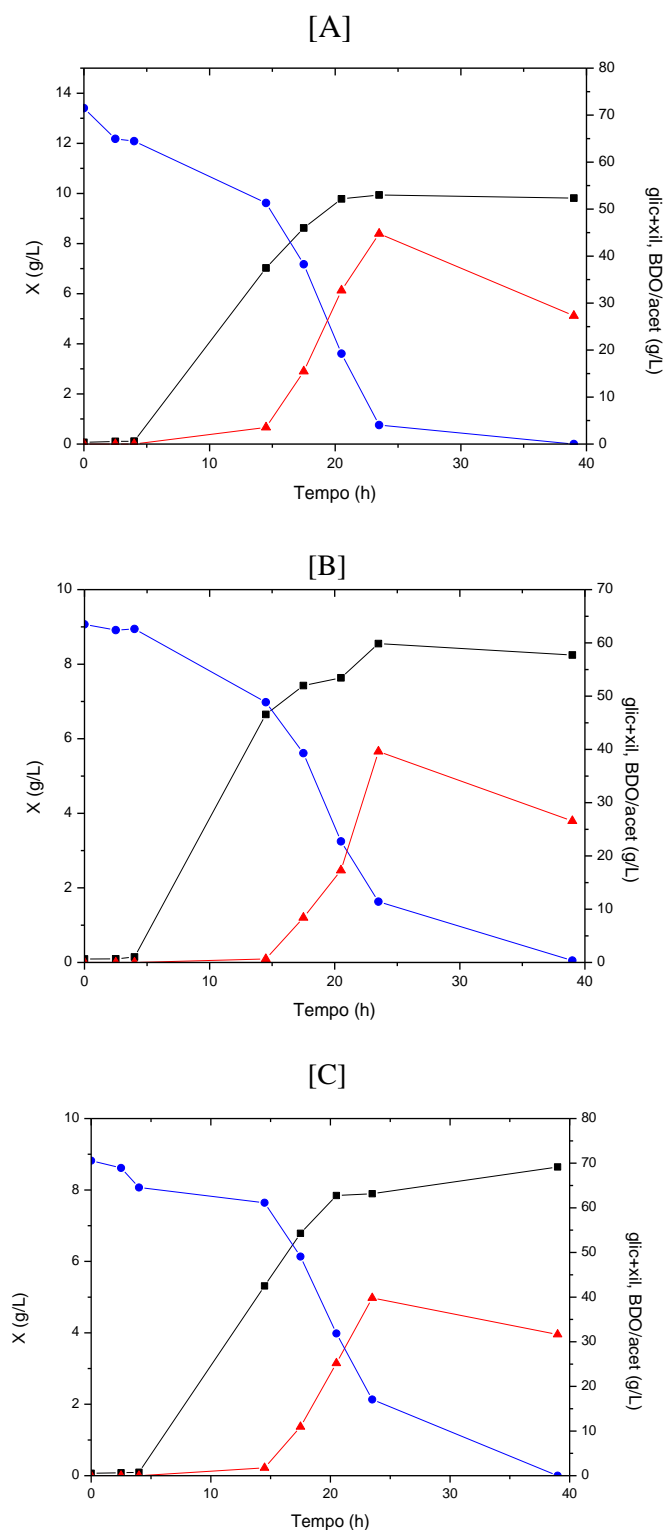


Figura 1 – Variação da concentração celular, consumo de substrato (glicose e xilose) e formação de produtos (2,3-butanodiol + acetoina) em função do tempo, nos ensaios de *Klebsiella oxytoca* conduzidos em frascos sob agitação, utilizando meio mineral suplementado com fontes de carbono. [A] ensaio A- 5 g/L glicose + 65 g/L xilose; [B] ensaio B - 10 g/L glicose + 60 g/L xilose; [C] ensaio C 10 g/L glicose + 65 g/L xilose (■) crescimento celular (g/L), (▲) 2,3-butanodiol (BDO)/acetoina (g/L), (●) glicose e xilose (g/L).



A concentração de 2,3-BDO é dividida entre os isômeros meso (BDO 1) e dextro-rotatório ou L(+) (BDO 2) produzidos por *K. oxytoca*. Analisando-se a formação dos produtos, considerando a soma de 2,3-butanodiol (BDO 1 e 2) e acetoína no processo, os valores máximos obtidos foram 27,3, 26,6 e 31,6 g/L respectivamente para os ensaios A, B e C. Observa-se que a maior concentração inicial de ambas as fontes de carbono, glicose e xilose proporciona o maior o acúmulo dos produtos de interesse no meio reacional, o que era esperado por fatores bioquímicos de conversão do substrato em produto (Figura 1).

De acordo com a Figura 2, pode ser observada a formação isolada de BDO1, BDO2 e acetoína. Nos ensaios A e B, atingiram-se aproximadamente 3,0 e 7,0 g/L de BDO1 e BDO2, respectivamente ao final de 39 h de cultivo, enquanto o ensaio C, foi determinado cerca de 6 e 9 g/L, respectivamente (Figura 2A e 2B).

Para acetoína, no ensaio A foi atingido 16 g/L e valor levemente inferior, cerca de 15 g/L nos ensaios B e C. Destaca-se que o perfil de produção foi semelhante nos três experimentos, isso possivelmente por se tratar de uma exposição frente a concentrações de substratos e de condições de processo similar (Figura 2C).

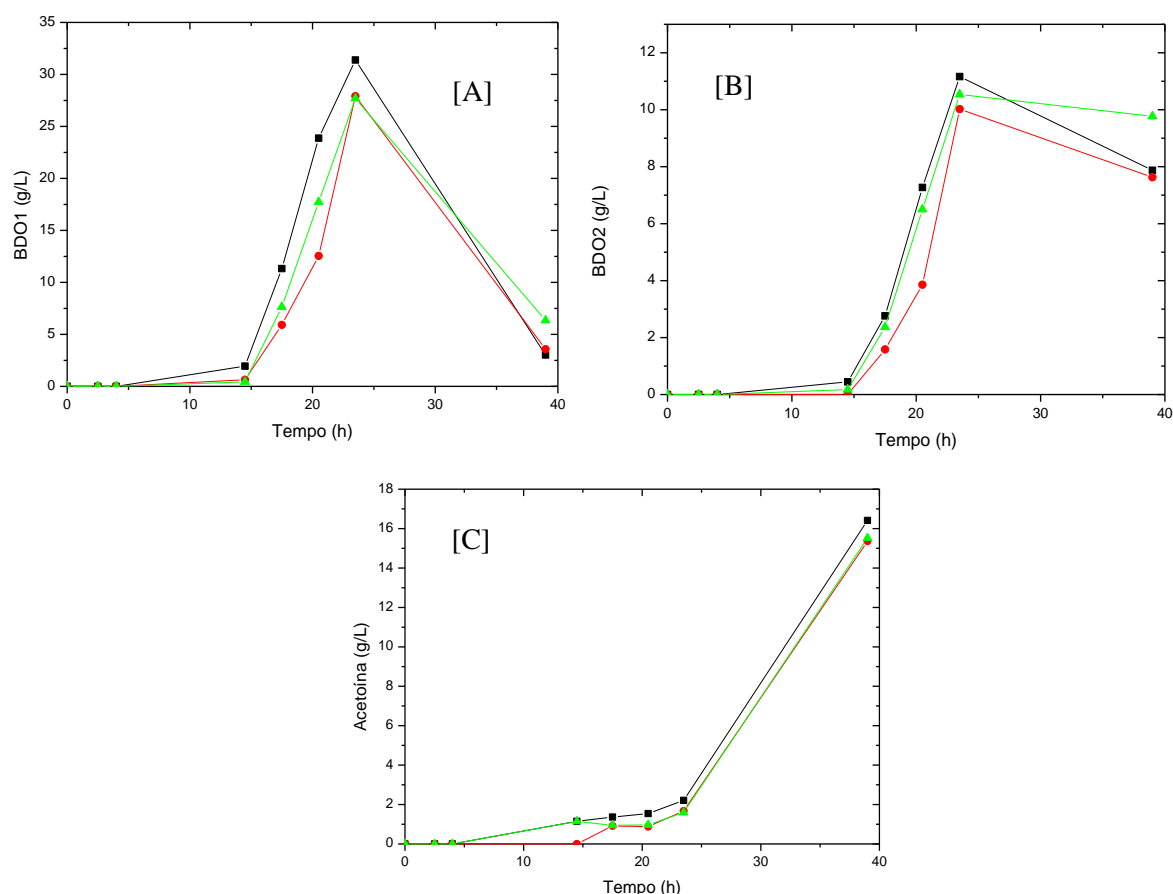


Figura 2. Produção de 2,3-butanodiol 1 [A], 2,3-butanodiol 2 [B] e acetoína [C] em função do tempo, nos ensaios de *Klebsiella oxytoca* conduzidos em frascos sob agitação, utilizando meio mineral suplementado com fontes de carbono. (■)ensaio A- 5 g/L glicose + 65 g/L xilose; (●)ensaio B - 10 g/L glicose + 60 g/L xilose); (▲)ensaio C 10 g/L glicose + 65 g/L xilose.



Em todos os ensaios foi observada a formação ascendente de 2,3-butanodiol (BDO) 1 e 2 e acetoína até aproximadamente 24 h de processo. Em 24 h, as fontes de carbono foram totalmente consumidas, o que influenciou no aumento do pH. A partir desse momento, identificou-se a queda na concentração de BDO 1 e 2 em todas as condições, o que é característico desse processo, ocorrendo, então, a conversão à acetoína, que aumenta exponencialmente nas últimas horas, como pode ser identificado na Figura 2C.

Na Tabela 1 são resumidos os resultados gerais dos cultivos de *K. oxytoca* em meios formulados com sais minerais e na presença simultânea de glicose e xilose, em diferentes concentrações.

Tabela 1 – Resultados gerais dos cultivos de *Klebsiella oxytoca* conduzidos em frascos sob agitação, utilizando meio mineral suplementado com fontes de carbono.

	Ensaio A	Ensaio B	Ensaio C
$X_{\text{máx}}$ (g/L)	9,94	8,55	8,64
$T_{X_{\text{máx}}}$ (h)	23,50	23,50	39
$P_{\text{máx}}$ BDO 1 (g/L)	3,01	3,58	6,35
$P_{\text{máx}}$ BDO 2 (g/L)	7,87	7,63	9,77
$P_{\text{máx}}$ Acetoína (g/L)	16,41	15,36	15,52
$P_{\text{máx}}$ total (g/L)	27,30	26,57	31,64

$X_{\text{máx}}$: crescimento máximo (g/L); $T_{X_{\text{máx}}}$: tempo (h) que se obteve o crescimento máximo; $P_{\text{máx}}$ total: produto máximo formado (meso 2,3-BDO 1+ dextro-rotatório BDO 2 + acetoína). Ensaio A - 5 g/L glicose + 65 g/L xilose; Ensaio B - 10 g/L glicose + 60 g/L xilose; Ensaio C 10 g/L glicose + 65 g/L xilose

Quando analisado o crescimento celular máximo ($X_{\text{máx}}$) nos diferentes ensaios, em A obteve-se a maior concentração celular. Porém, no ensaio A e B, $X_{\text{máx}}$ foi atingido em 23,5 h, enquanto que no ensaio C foi apenas em 39 h. A produção máxima de BDO1 foi aproximadamente o dobro no ensaio C (6,35 g/L) comparado com cerca de 3,0 g/L dos ensaios A e B. Em relação ao BDO2, o ensaio que levou à obtenção de maior concentração de produto foi o C, indicando a influência do substrato no meio, em concentração não inibidora, sobre a formação de produto. Para acetoína, a produção máxima por *K. oxytoca* foi similar em todas as condições testadas. De qualquer forma, torna-se necessária a avaliação de outros parâmetros de processo, como a concentração de oxigênio dissolvido, o controle efetivo do pH, regimes de condução, os quais são melhor controlados em cultivos conduzidos em biorreator de bancada.

4 Conclusões

Os resultados aqui apresentados demonstram a capacidade de *K. oxytoca* na metabolização das fontes de carbono glicose e xilose quando presentes simultaneamente no meio reacional, o que indica a aplicabilidade de hidrolisados lignocelulósicos na composição de meio de fermentação. O hidrolisado obtido do bagaço da cana-de-açúcar apresenta-se como potencial matéria-prima para a produção de 2,3-butanodiol/acetoína, processo que proporciona a destinação adequada dos resíduos das indústrias sucroalcooleiras no Brasil e consequente obtenção de um produto com uma gama de aplicações na indústria petroquímica.



5 Referências Bibliográficas

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

FLICKINGER, M. C. Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into liquid fuels: how far have we come? *Biotechnology and Bioengineering*, v. 22, p. 22–48, 1980.

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

GEDDES, C.C.; MULLINNIX, M.T.; NIEVES, I.U.; PETERSON, J.J.; HOFFMAN R.W.; YORK, S.W., YOMANO, L.P.; MILLER E.N.; SHANMUGAM, K.T.; INGRAM, L.O. Simplified process for ethanol production from sugarcane bagasse using hydrolysate-resistant *Escherichia coli* strain MM160. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 2702-2711, 2011.

GIRARDI, V. Emprego do glicerol como fonte de carbono na produção fermentativa de 2,3-butanodiol por *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Dissertação de Mestrado. Universidade de Caxias do Sul, 2014.

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

PIRT, S. J.; CALLOW, D. S. Exocellular Product Formation By Microorganisms in Continuous Culture. I. Production of 2,3-Butanediol By *Aerobacter aerogenes* in a Single Stage Process. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 21, n. 2, p. 188 – 205, 1958.

ROSSI, C. Produção fermentativa de 2,3-butanodiol a partir de misturas de glicose, xilose e sacarose. Projeto de Mestrado. Universidade de Caxias do Sul, 2017.

VOLOCH, M.; JANSEN, N. B.; LADISCH, M. R.; TSAO, G. T.; NARAYAN, R.; RODWELL, V. W. 2,3-Butanediol. In: *Industrial Chemicals, Biochemicals and Fuels*. West Lafayette: Pergamon Press, p: 933–947, 1985.

ZENG, A.P.; BIEBL, H.; DECKWER, W.D. Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3-butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v: 33, p: 485-489, 1990.