



Produção de 2,3-butanodiol por *Enterobacter aerogenes* com o uso de açúcares presentes em resíduos da indústria sucroalcooleira

Maria Eduarda Ribeiro ¹, Victoria Baschera ², Caroline Rossi ³, Maurício Moura da Silveira ⁴, Eloane Malvessi ⁵

¹ Universidade de Caxias do Sul, RS (mersouza@ucs.br)

² Universidade de Caxias do Sul, RS (vicbaschera@hotmail.com)

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

⁴ Universidade de Caxias do Sul, RS (mmsilvei@ucs.br)

⁵ Universidade de Caxias do Sul, RS (emalvess@ucs.br)

Resumo

Na indústria sucroalcooleira é gerada grande quantidade de resíduos, com destaque para o bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço hidrolisado, em função da presença de fontes de carbono fermentescíveis, consiste em alternativa de matéria-prima a ser utilizada em cultivos microbianos para a produção de 2,3-butanodiol (2,3-BDO), contribuindo, também, para a gestão racional de resíduos nestas indústrias. Microrganismos anaeróbios facultativos do gênero *Enterobacter* são relatados como produtores de 2,3-BDO, composto usado como intermediário químico na indústria petroquímica. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento e formação de 2,3-BDO por *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em meios de cultura sintéticos, contendo xilose e glicose, com intuito de simular a utilização de hidrolisados lignocelulósicos. Os ensaios foram realizados em agitador de bancada, usando meio mineral suplementado com mistura de glicose e xilose ou com o uso isolado das referidas fontes de carbono. Foi observada a influência da concentração de xilose e glicose sobre o desenvolvimento microbiano. Dentre as condições avaliadas, o crescimento celular e produção de 2,3-BDO foram superiores com o uso de açúcares puros, sendo atingido cerca de 25 e 18 g/L de BDO com glicose e xilose, respectivamente. Com o uso de diferentes concentrações da mistura de açúcares, foi observada pequena variação na produção de BDO, em média 8,5 g/L. Embora preliminares, os resultados indicam a metabolização de pentoses, além de hexoses, por *E. aerogenes*, sendo necessária, entretanto, a avaliação do balanço de carbono no meio de cultivo a fim de favorecer o processo microbiano global.

Palavras-chave: 2,3-butanodiol. *Enterobacter aerogenes*. Bagaço de cana-de-açúcar.

Área Temática: Tecnologias Ambientais

1 Introdução

O setor agroindustrial brasileiro da cana-de-açúcar é tradicional e de grande importância, visto que o país é um dos maiores produtores mundiais (PAOLIELLO, 2006). Para a safra de 2017/18, foi estimada produção de 647,6 milhões de toneladas de cana, sendo na sua maioria, destinada para a produção de etanol e açúcar. A cana-de-açúcar é considerada uma das grandes fontes de obtenção de biocombustíveis (CONAB, 2017).

No setor sucroenergético é gerado, como resultado do processamento da cana para produção de álcool, uma grande quantidade de resíduos. Entre estes, destaca-se o bagaço da cana-de-açúcar, que corresponde, de acordo com União da Indústria de Cana de Açúcar, a 280 kg para cada tonelada de cana produzida (CASTRO, 2013). Devido a sua característica energética, esse resíduo é utilizado, normalmente, para a geração de energia elétrica nas próprias usinas. No entanto, por meio de tratamentos químicos, físico-químicos ou



enzimáticos, é possível a obtenção de hidrolisados lignocelulósicos, possibilitando a geração de produtos com maior calor de combustão, com destaque para o 2,3-BDO, um potencial aditivo de combustível, que pode chegar a 27.200 kJ/kg, valor superior ao metanol (22.100 kJ/kg) e etanol (29.100 kJ/kg) (FLICKINGER, 1980).

Apesar de ser aproveitado para produção de energia, o bagaço é um material muito volumoso, sendo necessárias grandes áreas para o seu armazenamento, enquanto a sua disposição ao ar livre propicia a fermentação natural, o que acarreta em redução do seu rendimento energético (PAOLIELLO, 2006; BONASSA *et al*, 2015). Por se tratar de um subproduto rico em fontes de carbono fermentescíveis, como a xilose e a glicose, os hidrolisados, obtidos a partir do bagaço, consistem uma alternativa de matéria-prima para ser utilizada em fermentações, visando a produção de 2,3-BDO.

O 2,3-BDO é um álcool que possui característica de biodegradabilidade, o que o torna interessante, pois pode ser aplicado como intermediário químico para obtenção de produtos com importância nas mais diversas indústrias, principalmente da borracha sintética e do combustível, visto que possui um elevado valor de aquecimento e aumenta o número de octanas dos combustíveis (BIALKOWSKA, 2016).

Na literatura há relatos de diferentes microrganismos capazes de produção de 2,3-BDO a partir de substratos puros como glicose e xilose. No entanto, apenas alguns o produzem em quantidade significativa, destacando-se as espécies pertencentes aos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Bacillus* (BIALKOWSKA, 2016; JI, HUANG & OUYANG, 2011). A espécie *Enterobacter aerogenes*, apesar de citada como produtora de 2,3-BDO, ainda não foi amplamente estudada para esta finalidade. Nesse contexto o objetivo desse trabalho foi avaliar o crescimento e formação de 2,3-BDO por *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em meios de cultura sintéticos contendo xilose e glicose, com intuito de simular a utilização de subprodutos da indústria sucroalcooleira.

2 Materiais e Métodos

Os ensaios fermentativos foram realizados com a bactéria anaeróbia facultativa *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, obtida do Centro de Culturas Tropical André Tosello (São Paulo, Brasil). A propagação das culturas foi realizada em placas de Petri com meio ágar nutriente, durante 24 h, a 37 °C.

O meio mineral utilizado nos ensaios fermentativos foi descrito por Pirt & Callow (1958), tendo o pH ajustado inicialmente para 5,5 com a adição de HCl 2,0 mol/L. Os meios foram suplementados com uma mistura de glicose e xilose, visando simular a utilização de subprodutos da indústria sucroalcooleira, ou usadas de forma isolada. Para cada ensaio foram utilizadas diferentes proporções das respectivas fontes de carbono, as quais podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Ensaios fermentativos propostos envolvendo a suplementação de glicose e xilose no meio mineral.

| Ensaio | Glicose (g/L) | Xilose (g/L) |
|--------|---------------|--------------|
| S1 | 5 | 65 |
| S2 | 10 | 60 |
| S3 | 10 | 65 |
| S4 | 60 | 0 |
| S5 | 0 | 60 |

Os ensaios foram conduzidos em agitador de bancada sob agitação recíproca, a 300 rpm e 37 °C, utilizando frascos Erlenmeyer de 500 mL, de gargalo alongado, contendo 100



mL de meio. O inóculo foi preparado a partir de uma suspensão de células em água esterilizada, correspondente a 0,2 unidades de densidade óptica para cada 100 mL de meio, obtidas através da raspagem das células previamente crescidas por 24 h. Os frascos foram cobertos por uma manta de gaze e algodão hidrófobo.

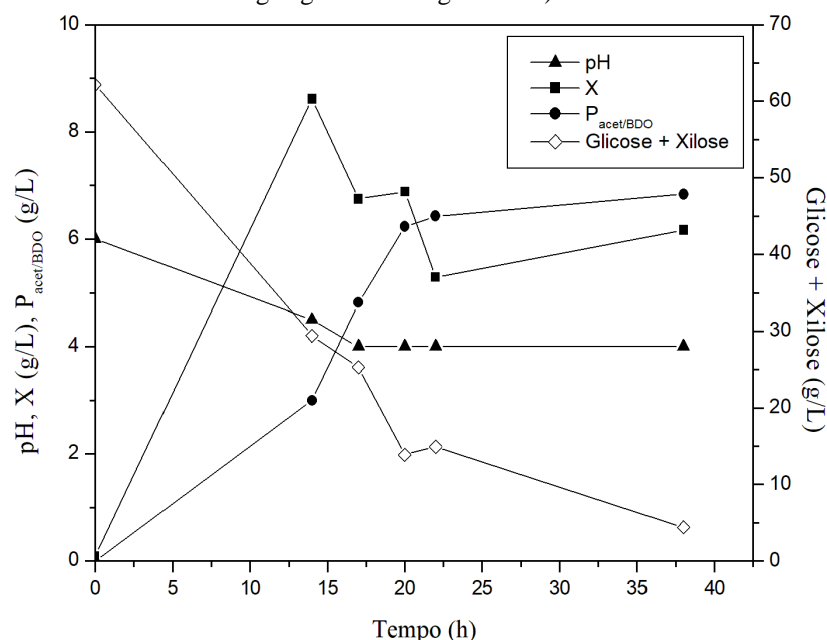
Ao longo dos cultivos foram coletadas amostras em espaços periódicos de tempo, a partir das quais foram realizadas as medições de pH, concentração celular e análise de consumo das fontes de carbono e formação de produtos. Durante o cultivo, quando necessário, o ajuste do pH dos meios foi realizado com a adição de CaCO_3 .

A concentração celular foi quantificada a partir da absorbância, determinada a 520 nm em espectrofotômetro. Para análise das fontes de carbono e produtos, foi realizada a centrifugação da amostra por 10 minutos a 10000 rpm, sendo o sobrenadante recolhido para a realização de análises por cromatografia em fase líquida (coluna Aminex HPX-87H, volume de injeção de 5 μL , a 60 °C, vazão de 0,6 mL/min e fase móvel H_2SO_4 0,005 mol/L) (SOUZA *et al*, 2017a).

3 Resultados e Discussão

Os três ensaios foram encerrados em 38 h, antes do consumo total do substrato, pois verificou-se que não ocorria mais o consumo do mesmo. Na Figura 1 pode ser observado o perfil global do ensaio S1, envolvendo crescimento celular, variação do pH, consumo de substrato e formação de produtos por *E. aerogenes*.

Figura 1 – Variação da concentração celular, pH, consumo de substratos e formação de produtos em cultivo de *Enterobacter aerogenes* em frascos sob agitação, em meio contendo mistura de glicose e xilose (Ensaio S1- 5 g/L glicose + 65 g/L xilose)



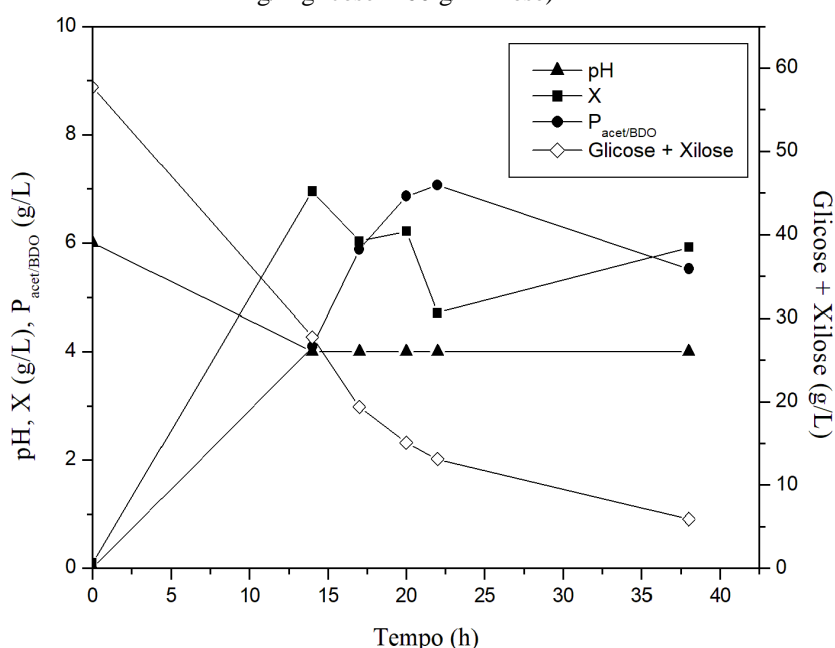
Concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$) foi de 8,6 g/L, atingida em aproximadamente 14 h de processo, seguida de um perfil de redução gradual. Como consequência do intenso crescimento celular, ocorre a acidificação do meio, o que torna necessário o controle desse parâmetro, realizada, no caso, com a adição de carbonato de cálcio. Esta substância tem baixa solubilidade, o que proporciona a manutenção do pH em níveis favoráveis ao desenvolvimento microbiano. Cerca de 4,4 g/L de substrato residual - mistura de glicose e



xilose – foi detectada em 38 h de cultivo, o que pode ter acontecido pela adaptação parcial do microrganismo frente a essa mistura de substratos. A concentração de 2,3-BDO atingida ao final desse cultivo foi de 9,08 g/L.

No ensaio S2, a máxima concentração celular atingida foi de 6,95 g/L, também em 14 h de processo. Perfil de queda do pH muito semelhante a ensaio anterior (S1) foi observado e, desta forma, também houve a adição de carbonato de cálcio para garantir a estabilidade do pH durante o cultivo. Cerca de 5,91 g/L de substrato residual foi quantificado e a concentração de 2,3-BDO atingida ao final do cultivo foi de 8,58 g/L, levemente inferior à atingida no ensaio S1. O gráfico com os resultados obtidos para o ensaio S2 está apresentado na Figura 2.

Figura 2 – Variação da concentração celular, pH, consumo de substratos e formação de produtos em cultivo de *Enterobacter aerogenes* em frascos sob agitação, em meio contendo mistura de glicose e xilose (Ensaio S2- 10 g/L glicose + 60 g/L xilose)



Na Figura 3 é apresentado o perfil do ensaio S3. A concentração celular máxima foi de 6,50 g/L, em 14 h de processo e, assim como nos ensaios anteriores, foi observada uma queda no pH do início do processo até esse tempo. Nesse ensaio foi identificada concentração residual de substrato ainda superior, totalizando 11,03 g/L, o que indica a necessidade de adaptação da cultura quando exposta a concentrações crescentes de glicose e xilose. A concentração de 2,3-BDO atingida ao final do cultivo foi de 6,8 g/L, inferior ao obtido em S1 e S2.

Os resultados gerais, referentes à formação de produto e crescimento celular, obtidos nas cinco condições avaliadas, estão apresentados na Tabela 2. Nos ensaios S1, S2 e S3, realizados com a mistura dos açúcares, foram atingidos $X_{máx}$ inferiores se comparados com o ensaio S4, contendo apenas glicose, no qual determinou-se crescimento celular de 24,41 g/L. Porém, se comparados com o ensaio S5, realizado com xilose, onde o crescimento foi de 5,34 g/L, possivelmente a presença de glicose na mistura tenha favorecido o desenvolvimento microbiano, pois apresentaram valores superiores de $X_{máx}$ em relação ao meio formulado somente com xilose. Em outros ensaios realizados com xilose, também se verificou um crescimento inferior quando comparado com a glicose, fato que pode estar associado à diferença de rota metabólica utilizada para metabolizar açúcares de cinco carbonos (xilose) e as hexoses, de 6 carbonos, como é o caso da glicose.



Figura 3 – Variação da concentração celular, pH, consumo de substratos e formação de produtos em cultivo de *Enterobacter aerogenes* em frascos sob agitação, em meio contendo mistura de glicose e xilose (Ensaio S3- 10 g/L glicose + 65 g/L xilose)

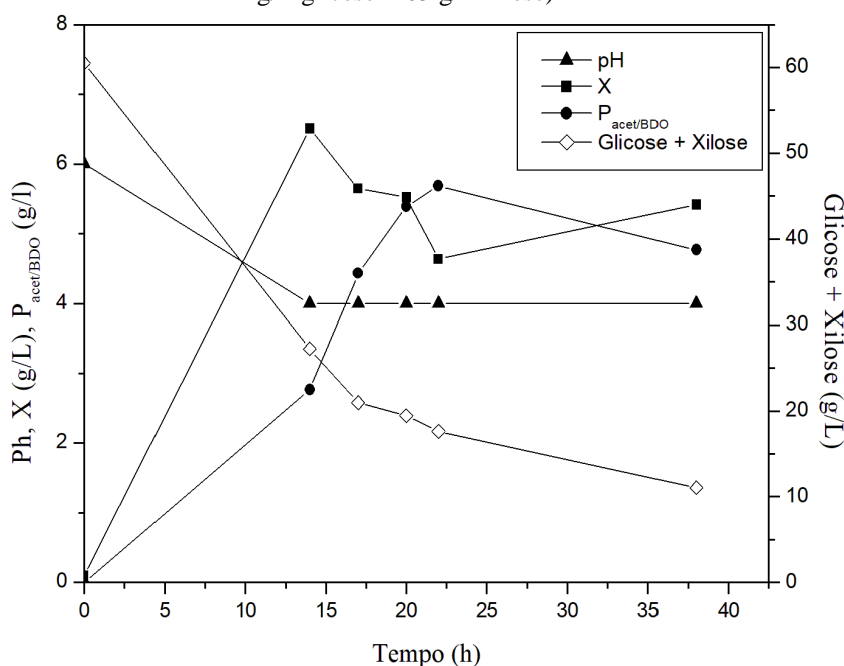


Tabela 2 – Resultados gerais dos cultivos de *Enterobacter aerogenes*, realizados em frascos sob agitação, em meios contendo glicose e xilose como fontes de carbono.

| | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 |
|---------------------------------|------|------|------|-------|-------|
| X _{máx} (g/L) | 8,61 | 6,95 | 6,50 | 24,41 | 5,34 |
| T _{X,máx} (h) | 14 | 14 | 14 | 20 | 25 |
| P _{máx} BDO 1 (g/L) | 4,48 | 5,19 | 4,17 | 15,24 | 12,87 |
| P _{máx} BDO 2 (g/L) | 0,32 | 0,37 | 0,0 | 1,09 | 1,29 |
| P _{máx} acetoína (g/L) | 4,28 | 3,02 | 2,63 | 8,61 | 4,57 |
| P _{máx} total (g/L) | 9,08 | 8,58 | 6,8 | 24,94 | 18,73 |

X_{máx}: concentração celular máxima; T_{X,máx}: tempo onde atinge o X_{máx}; P_{máx}: produto máximo formado (meso 2,3-BDO 1+ dextro-rotatório BDO 2 + acetoína).

Ensaio: S1, 5 g/L glicose + 65 g/L xilose; S2, 10 g/L glicose + 60 g/L xilose; S3, 10 g/L glicose + 65 g/L xilose; S4, 60 g/L glicose; S5, 60 g/L xilose.

Ao longo do processo fermentativo o microrganismo produz dois isômeros de 2,3-BDO, o meso BDO (BDO 1) e o dextro-rotatório (BDO 2), além de acetoína. A identificação dos isômeros formados se torna importante tendo em vista a aplicação diferenciada destes compostos na indústria (SOUZA *et al*, 2017b). Nos ensaios S1, S2 e S3 foi identificada formação de BDO 1 de 4,48, 5,19 e 4,17 g/L, enquanto para os testes S4 e S5, observaram-se, na devida ordem, valores de 15,24 e 12,87 g/L. Em relação ao BDO 2, formação menor foi identificada para todos os testes, o que é característico do microrganismo utilizado frente às condições de processo empregadas, resposta encontrada também em testes anteriormente realizados (SOUZA *et al*, 2017b). A produção de acetoína também foi inferior nos ensaios S1, S2 e S3, atingindo valores de 4,28, 3,02 e 2,63 g/L, enquanto para o S4 e S5 foram determinados valores de 8,61 e 4,57 g/L.

Ao comparar os testes realizados com a mistura de açúcares ou com o uso isolado de glicose ou frutose, verificou-se que a maior formação de produto nos ensaios com a fonte de carbono isolada, apresentando valores de P_{máx} médio de 25 g/L para o S4 e 18 g/L para o S5,



ressaltando que no ensaio com xilose (S5) observa-se menor formação total de produto pela diferença da cadeia carbônica de glicose e xilose. Apesar do desempenho constatado em S4 e S5, o mesmo não foi observado quando os açúcares foram misturados, tendo uma formação de produto inferior para os ensaios S1, S2 e S3. Isto pode ter ocorrido devido a um desvio da rota metabólica para formação de outros compostos intermediários, como o ácido acético e ácido lático. Relatos na literatura indicam a ocorrência de desvios de rota metabólica com a utilização de diferentes açúcares e combinações de açúcares com emprego do mesmo microrganismo. Entre os testes realizados com a mistura dos açúcares o que apresentou maior formação de 2,3-BDO foi o ensaio S1, atingindo um valor médio de 9,0 g/L.

4 Conclusão

Com a utilização da mistura de fontes de carbono (glicose e xilose), presentes em maior quantidade nos hidrolisados lignocelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar, verificou-se a menor formação de 2,3-BDO se comparado aos ensaios realizados com o uso das fontes de forma isolada. Isto pode estar relacionado, entre outros fatores, ao desvio da rota metabólica quando na presença de outros açúcares fermentescíveis. Desta forma, estes resultados preliminares indicam a necessidade de avaliação, em biorreatores em escala de bancada, de outros parâmetros que podem influenciar o desempenho microbiano global.

Referências

CONAB, 2017 Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar. V.4 – Safra 2017/18, n. 1 – Primeiro levantamento, abril 2017. Conab – Companhia Nacional de Abastecimento.

BIALKOWSKA, A. M. Strategies for efficient and economical 2,3-butenodiol production: new trends in this field. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 12, p. 1-14, 2016.

CASTRO, H. F. de. **Apostila de Processos Químicos Industriais II: Indústria alcooleira**. Universidade de São Paulo – Escola de Engenharia Lorena, 2013.

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.

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

PAOLIELLO, J. M. M. **Aspectos Ambientais e Potencial Energético no Aproveitamento de Resíduos da Indústria Sucroalcooleira**. 2006. 180f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) – Universidade Estadual Paulista, Programa de Pós-Graduação em Engenharia, São Paulo, 2006.

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.

SOUZA, B. C.; RIZZOTTO, M. G. P.; BOSSARDI, F. F.; BIANCO, C. C. ; CARRA, S. ; TORRES, A. P. R. ; SILVEIRA, M. M. ; MALVESSI, E. . Effect of the culture medium composition on the growth of *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 and the production of 2,3-butanediol from crude glycerol. **In: XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)**, 2017a, Aracaju.

SOUZA, B. C.; RIZZOTTO, M. G. P. ; ADLER, P. D. ; BIANCO, C. C. ; CARRA, S. ; Beal, L. L. ; SILVEIRA, M. M. ; MALVESSI, E. Comparison among glucose, pure glycerol and crude glycerol byproduct of biodiesel synthesis as substrates for the production of 2,3-butanediol by *Enterobacter aerogenes*. **In: XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)**, 2017b, Aracaju.