

# PRODUÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE GLICEROL EM CULTIVO DE *Klebsiella oxytoca* EM REGIMES DESCONTÍNUO E DESCONTÍNUO ALIMENTADO



Caroline Hartmann, Eloane Malvessi  
 INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA - UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL/RS  
 Projeto BioH<sub>2</sub> E-mail: chartmann@ucs.br



## INTRODUÇÃO

Na etapa produtiva do biodiesel, combustível oriundo de fontes renováveis, tem-se a geração de cerca de 10% de glicerol residual, caracterizado como impuro e de baixo valor comercial (Ooi *et al.*, 2004; Amaral *et al.*, 2009). Como alternativa, este resíduo tem sido empregado como fonte de carbono em cultivos microbianos (Silva *et al.*, 2009).

Bactérias do gênero *Klebsiella* são capazes de metabolizar glicerol e de produzir compostos de interesse como o 2,3-butanodiol (Brisse *et al.*, 2006). Este é um produto de interesse por ter potencial de aplicação diversificado, visto que pode ser utilizado como intermediário da borracha e de diversos plásticos, empregado como anti-congelante, solvente, além de ser empregado na indústria de alimentos (SYU, 2001). Também é um potencial combustível com poder calorífico de 27.198 J/g, o qual se compara favoravelmente com outros combustíveis líquidos (GARG; JAIN, 1995).

Para a obtenção de maior rendimento e evitar o efeito de inibição pelo substrato, o cultivo microbiano pode ser conduzido em regime descontínuo alimentado.

## OBJETIVO

Avaliar a produção de 2,3-butanodiol por *Klebsiella oxytoca* utilizando glicerol comercial como fonte de carbono, em cultivos em regimes descontínuo e descontínuo alimentado

## MATERIAL E MÉTODOS

### MICROORGANISMO

*Klebsiella oxytoca* ATCC 8724



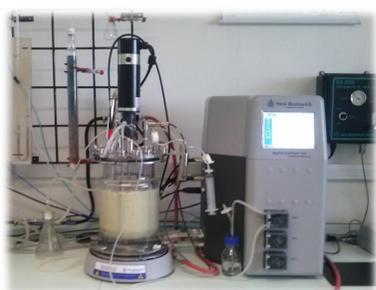
**Propagação**  
 ágar nutriente; 37°C; 24h

### MEIO DE CULTIVO

- Meio de nutrientes - meio PC (Pirt & Callow, 1958), em (g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 7,2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6,0; KOH, 0,45; EDTA, 0,51; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,30; CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,09; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,0225; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,0075; MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,0038.
- Meio suplementado com glicerol.
- pH inicial de 6,5, controlado com a adição de CaCO<sub>3</sub>
- Meios esterilizados a 1 atm, por 15 min.



**Ativação da cultura**  
 Meio PC + 20g/L glicerol; 37°C; 24h



### Cultivos em biorreator

Meio PC + glicerol

Biorreator de bancada Bioflo (New Brunswick)  
 4L de meio; 650 rpm; fluxo de ar de 1,5 L/min;  
 37°C; pH 5,5



### Preparo do inóculo

Frascos Erlenmeyer de 500mL  
 80mL de meio PC + 20 g/L glicerol  
 agitação recíproca, 300rpm;  
 37°C; pH inicial 6,5

### Condições avaliadas

- Regime descontínuo:** cultivos realizados com concentrações iniciais (S<sub>0</sub>) de 120 e 160g/L de glicerol.
- Regime descontínuo alimentado:** cultivos iniciados com 3L de meio, com S<sub>0</sub> = 60g/L, com alimentações em lotes de soluções contendo sais nutrientes e glicerol, até atingir o volume de 4L, correspondendo às concentrações finais (S<sub>f</sub>) de 160 ou 220g/L de glicerol.

### Metodologia analítica

- Biomassa:** pré-tratamento com HCl 2M a fim de remover CaCO<sub>3</sub> do meio, seguido da determinação de densidade óptica, a 520nm. Biomassa convertida em massa/volume a partir de uma curva de calibração.
- Glicerol:** método colorimétrico adaptado para glicerol (Carra, 2012).

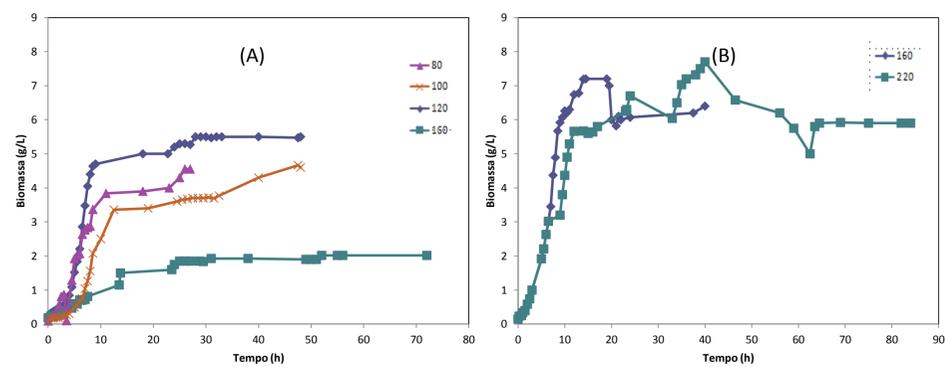
## REFERÊNCIAS

Amaral *et al.* (2009). *Food Bioproc Process.* 78:179-186.  
 Brisse *et al.* (2006). *Prokaryotes.* 6: 159-196.  
 Carra, S. (2012). Dissertação de Mestrado. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul/RS.  
 Garg, S. K.; Jain, A. (1995) *Biores.Technol.* 51, 103-109.  
 Ooi *et al.* (2004). *J. Oleo Sci.* 53.  
 Pirt, S.J.; Callow, D.S. (1958). *J. Appl. Bacteriol.* 21, 188-205  
 Silva *et al.* (2009). *Biotechnol Adv.* 27: 30-39.  
 Syu, M. J (2001). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 10-18

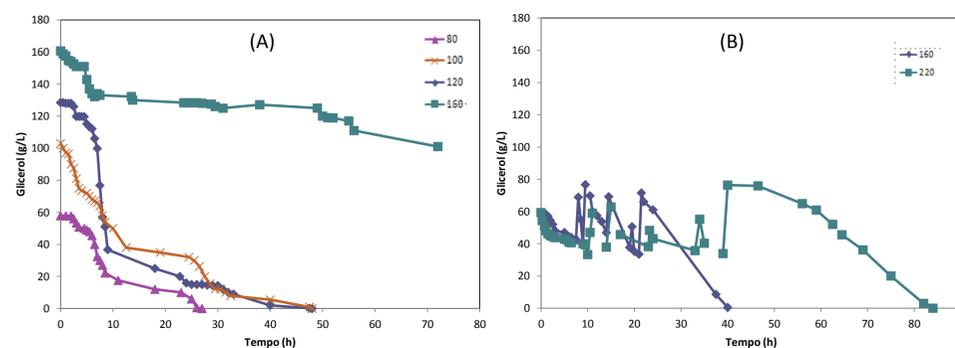
## APOIO



## RESULTADOS



Perfis cinéticos de crescimento celular em cultivos em regime descontínuo (A) e em regime descontínuo alimentado (B).



Perfis cinéticos de consumo de glicerol em cultivos em regime descontínuo (A) e em regime descontínuo alimentado (B).

Resultados referentes ao crescimento celular e consumo de substrato obtidos em cultivos de *Klebsiella oxytoca* conduzidos em regimes descontínuo (RD) e descontínuo alimentado (RDA), utilizando diferentes concentrações de glicerol.

Regime de condução	S <sub>0</sub> (g/L)	t (h)	X <sub>f</sub> (g/L)	μ <sub>xmax</sub> (h <sup>-1</sup> )	Y <sub>X/S</sub> (g/L/h)	dS/dt <sub>gh</sub> (g/L/h)	dX/dt <sub>gh</sub> (g/L/h)
RD	80	27	4,5	0,63	0,05	2,88	0,17
RD	100	48	4,6	0,42	0,04	5,07	0,19
RD	120	48	5,5	0,52	0,04	8,90	0,30
RD	160	72	2,1	0,21	0,03	3,63	0,12
RDA	160	40	6,4	0,81	0,027	2,21	0,59
RDA	220	84	7,3	0,80	0,032	2,60	0,44

S<sub>0</sub> - concentração inicial de glicerol; t - tempo total de processo; X<sub>f</sub> - biomassa final; μ<sub>xmax</sub> - máxima velocidade específica de crescimento; Y<sub>X/S</sub> - fator de conversão de glicerol em células; dX/dt = velocidade média de crescimento celular até o tempo indicado; dS/dt - velocidade média de consumo de cada substrato até o tempo indicado.

Resultados referentes à formação de 2,3-butanodiol e etanol obtidos em cultivos de *Klebsiella oxytoca* em cultivos conduzidos em regimes descontínuo (RD) e descontínuo alimentado (RDA), utilizando diferentes concentrações de glicerol.

Regime de condução	S <sub>0</sub> (g/L)	butanodiol (g/L)	Y <sub>P/S but</sub> (g/g)	ρ <sub>but</sub> (%)	Etanol (g/L)	Y <sub>P/S et</sub> (g/g)	ρ <sub>et</sub> (%)
RD	80	32,8	0,35	71	6,45	0,07	14
RD	100	37,8	0,36	73	3,5	0,03	7
RD	120	53,6	0,42	85	6,2	0,05	10
RD	160	9,2	0,25	51	2,9	0,08	15
RDA	160	74,1	0,42	85	3,8	0,02	4
RDA	220	92,1	0,46	93	2,7	0,01	3

S<sub>0</sub> - concentração inicial de glicerol; Y<sub>P/S</sub> - fator de conversão de glicerol em produtos; ρ - rendimento em relação ao máximo teórico

## CONCLUSÕES

Estes resultados demonstram que o regime de condução do processo é fator determinante no sucesso do cultivo de *K. oxytoca*. Enquanto que em regime descontínuo foi observado o efeito inibidor do emprego de altas concentrações iniciais de substrato, em regime descontínuo alimentado, o uso de concentração de glicerol igual ou ainda superior àquela que induziu a inibição, proporcionou a obtenção de incremento em termos de formação de biomassa e de produto.

Na continuidade dos estudos produção de 2,3 butanodiol por *K. oxytoca* será avaliada a suplementação de glicerol residual e de vinhoto.