

5º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



TÍTULO DO TRABALHO:

Seleção microbiana para produção de álcool utilizando glicerol como substrato

AUTORES:

Jocélia S. Mendes, Jouciane S. Silva, Andrea L. O. Ferreira, Regiane R. Rocha, Giovanilton Ferreira da Silva

INSTITUIÇÃO:

Universidade Federal do Ceará

SELEÇÃO MICROBIANA PARA PRODUÇÃO DE ÁLCOOL UTILIZANDO GLICEROL COMO SUBSTRATO

Abstract

In this paper, it was studied the ethanol production by three microorganisms *Saccharomyces sp.* 1201, *Saccharomyces sp.* 1238 and *Klebsiella pneumonia* 396 (ATCC 29665), using residual glycerol from biodiesel industry. The experiments were made in shaker using specific conditions for each microorganism. It can be observed glycerol consumption and ethanol production for all microorganisms available. *Saccharomyces sp.* 1201 and *Saccharomyces sp.* 1238 did not consumed glycerol as carbon source. However, results obtained for *Klebsiella pneumoniae* 396 (ATCC 29665) showed consumption of glycerol after 5h of fermentation and maximum ethanol production of 47 mmol/L.

Introdução

Devido ao crescimento populacional o consumo de energia também aumenta, principalmente a oriunda dos derivados de petróleo, os quais não são renováveis e instáveis economicamente. Este cenário mundial tem impulsionado as universidades e empresas privadas a desenvolverem pesquisas em busca de novas fontes de energias alternativas de baixo custo, que sejam renováveis e venha atender a grande demanda populacional. A produção de bicomcombustíveis, dentre eles álcool e biodiesel, vêm crescendo e se destacando cada vez mais no mercado mundial, devido às mesmas serem originadas de fontes renováveis ou por reaproveitarem resíduos industriais, serem biodegradáveis e terem queima limpa (Vicente et al., 1998). O álcool é um composto fundamental para a cadeia primária de diversos processos industriais e, nos últimos anos, vem crescendo seu uso como combustível automotivo, o que impulsiona a procura por novos métodos, rotas e microrganismos capazes de produzir álcool. Este trabalho teve como objetivo selecionar um microrganismo capaz de produzir álcool utilizando como fonte de carbono o glicerol residual da indústria do biodiesel. Dada à disponibilidade do glicerol, preços baixos e alto grau de redução, o glicerol tornou-se ideal para a produção de compostos reduzidos através de fermentação anaeróbia (Silva GP, et al, 2008). Considerando que, cada 10 kg de biodiesel produzido por transesterificação de óleos vegetais ou de gorduras animais, são gerados 1 kg de glicerol bruto (González-Pajuelo et al., 2004; Mu et al., 2006). A utilização do glicerol neste trabalho visa dar valor agregado a este sub-produto indesejado da indústria do biodiesel contribuindo assim, para o não agravamento da situação ambiental global. Para este fim, realizou-se um estudo literário sobre diversos microrganismos produtores de álcool, tais como o etanol e 1,3 – propanodiol (PDO). O PDO possui inúmeras aplicações como em polímeros, medicamentos, alimentos, cosméticos e lubrificantes. A conversão de glicerol a PDO via rota microbiológica pode ser realizada por microrganismos tais como *Clostridium butyricum*, *Citrobator*, *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae* (Zhao et al., 2006). Sendo que, este último microrganismo apresenta a maior produtividade de PDO. E a partir deste estudo selecionaram-se apenas os capazes de utilizar glicerol como principal fonte de carbono. Dentre eles, três apresentaram grande potencial de conversão do glicerol a álcool, são eles: *Saccharomyces sp.* 1201, *Saccharomyces sp.* 1238 e *Klebsiella pneumonia* 396 (ATCC 29665).

Metodologia

Cultivo da *Saccharomyces sp.*

A levedura foi estocada em tubos e placas de petri com ágar dextrose sabouraud (AS). O meio utilizado para inóculo contém (g/L) glicose 30; extrato de levedura 10; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10; Na_2HPO_4 4,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,0; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,65.

Meio fermentativo contém (g/L): extrato de levedura 5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10; KH_2PO_4 4,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,0 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,65; glicerol 1% v/v (autoclavado a 121°C por 15 min). O pH dos meios foi ajustado para 5,0 e autoclavados a 110°C por 10 min.

As fermentações foram conduzidas em mesa rotatório utilizando erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio, a 30 °C e 150 rpm, amostras foram retiradas a cada hora para acompanhar o consumo de glicerol e produção de etanol.

Cultivo da *Klebsiella pneumoniae*

A bactéria foi estocada em tubos e placas de petri com ágar nutriente (AN). O meio para o inóculo contém (g/L): glicerol 20; K_2HPO_4 3,036; KH_2PO_4 1,3; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; CaCl_2 0,026; extrato de levedura 1; elemento traçador 1mL/L. O meio fermentativo contém (g/L): glicerol 20; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3,893; KH_2PO_4 1,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; CaCl_2 0,026; extrato de levedura 1; elemento traçador 1mL/L. O pH dos meios foram ajustados para 7,0 e, em seguida, autoclavados a 110°C por 10 min (Cheng et al., 2004)

As fermentações foram conduzidas em mesa rotatório utilizando erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio, a 40 °C e 200 rpm, amostra foram retiradas a cada hora (Ma et al., 2009).

Procedimentos analíticos

A densidade ótica foi medida por espectrofotometria (Spectronic instruments/ Spectronic 20 Genesys) a 660 nm e 650 nm, respectivamente, para *Saccharomyces sp.* e *Klebsiella pneumoniae* (Ma et al., 2009).

Os produtos obtidos foram analisados por HPLC (Waters) utilizando detector de infravermelho e coluna supelcogel C - 610H, 30cm x 7,8mm (Supelco), a 30°C, volume das amostras de 10µL, com ácido fosfórico 0,1 M como fase móvel a uma vazão de 0,5 mL/min.

Resultados e Discussão

Com a finalidade de se obter um microrganismo que seja produtor de etanol e que o mesmo utilize glicerol como fonte de carbono, diversos ensaios foram realizados com os três microrganismos.

***Saccharomyces sp.* 1201**

As fermentações utilizando *Saccharomyces sp.* 1201 foram conduzidas utilizando 1% de inóculo com as condições operacionais descritas anteriormente. Através de análises realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) pode-se perceber que não houve resultados promissores para o objetivo deste trabalho. Devido ao baixo consumo de glicerol e a baixíssima produção de etanol. Acredita-se que a baixa produção de etanol possa ser consequência dos resíduos existentes no glicerol oriundo da indústria do biodiesel. Para analisarmos este resultado, foi realizado um ensaio onde utilizou-se glicerol p.a. para efeito comparativo. Neste ensaio foi constatado que a baixa produção não é causada pelo glicerol proveniente da indústria de biodiesel. Acredita-se que o microrganismo necessite da fonte de carbono mais acessível, para isto em estudos posteriores realizaremos a hidrólise ácida ou básica do glicerol.

***Saccharomyces sp.* 1238**

As fermentações utilizando *Saccharomyces sp.* 1238 foram conduzidas utilizando 1% de inóculo com as mesmas condições operacionais já descritas. Através de análises feitas no HPLC pode-se perceber que não houve resultados promissores com este microrganismo para o objetivo deste trabalho. As análises mostram um baixo consumo de glicerol e baixíssima produção de etanol. A baixa produção de etanol pode ser efeito dos resíduos contidos no glicerol oriundo da indústria do biodiesel. Para confirmar este resultado, um ensaio utilizando glicerol p.a. foi realizado. Neste ensaio foi constatado que a baixa produção não é causada pelo glicerol proveniente da indústria de biodiesel. Acredita-se que o microrganismo necessita da fonte de carbono mais acessível, para isto em estudos posteriores realizaremos a hidrólise ácida ou básica do glicerol.

***Klebsiella pneumonia* 396 (ATCC 29665)**

As fermentações realizadas com *Klebsiella pneumonia* 396 (ATCC 29665), mostraram bons resultados. Nesta fermentação utilizou 1% de inóculo com condições operacionais descrita anteriormente. Na Figura 1 podemos ver o consumo de glicerol em função do tempo e na Figura 2 a produção de etanol em função do tempo.

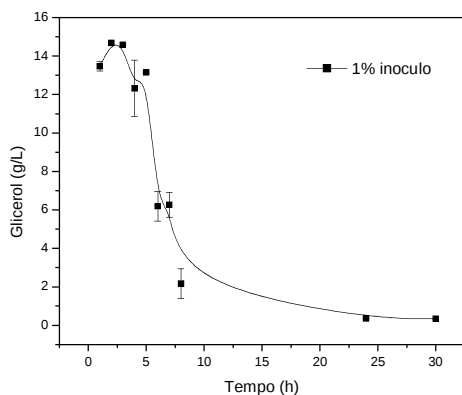


Figura 1 - Curva de consumo de glicerol

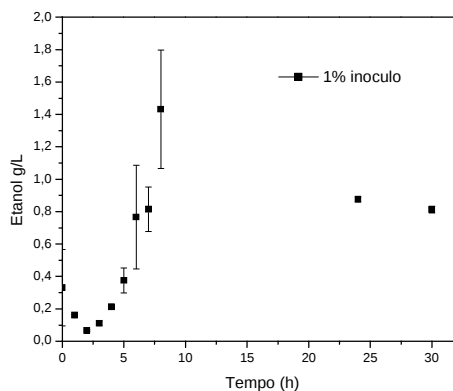


Figura 2 – Curva da produção de etanol

Através da Figura 1 observa-se que entre 0 e 5 horas o microrganismo consumiu pouco glicerol, isto se deve ao período de adaptação do mesmo. Entre 5 a 10 horas temos a fase exponencial de crescimento do microrganismo, observando o alto consumo de glicerol. Pelo gráfico podemos observar que a produção de etanol segue o metabolismo de produção primário.

Na Figura 2 pode-se ver que em 8 horas de fermentação temos a maior produção de etanol, cerca de 1,4 g/L de etanol, após 8 horas temos um queda na curva de produção. Essa queda pode ocorrer devido à falta de glicerol já que em torno de 8 horas o glicerol tem uma queda brusca em sua curva. Para uma melhor produção de etanol seria mais adequada uma configuração do biorreator batelada alimentada, que garantiria o fornecimento de fonte de carbono para o meio, não deixando cair a produção. É interessante industrialmente que o biorreator seja operado dentro das condições experimentais observadas no período de 5 a 10 horas de fermentação, etapa onde houve maior produção de etanol.

Em estudos posteriores estudaremos o decaimento da curva após 8 horas de fermentação, avaliando uma possível inibição pelo substrato.

Na Figura 3 temos a curva de consumo de glicerol em função do tempo, com as condições experimentais descrita anteriormente modificando a quantidade de inóculo, onde se utilizou 10% de inóculo. Na Figura 4 temos a curva de produção de etanol em função do tempo.

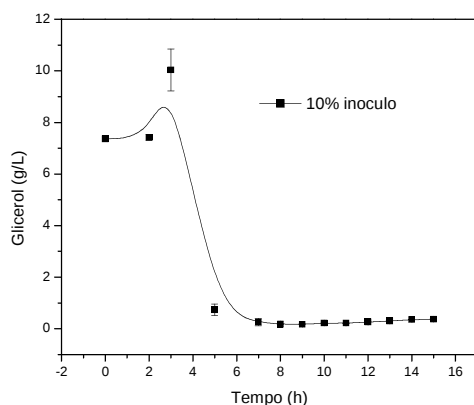


Figura 3 – Curva de consumo de glicerol

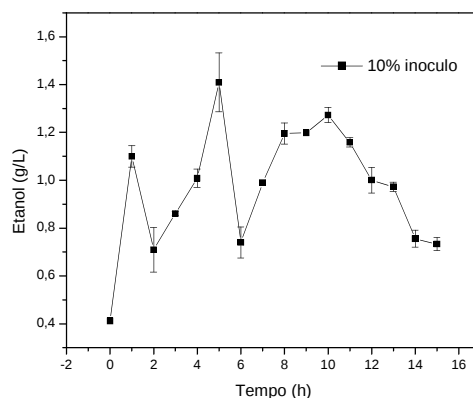


Figura 4 – curva de produção de etanol

Observa-se através da Figura 3 que após decorrido 3 horas de fermentação há uma redução significativa da concentração do glicerol e que após 7 horas sua concentração permanece constante. Esse consumo acelerado comparado com o da Figura 1 deve-se ao fato de que nessa fermentação a quantidade de inóculo é 10 vezes maior, o que aumenta o consumo de glicerol, já na Figura 4 observa-se que o aumento da quantidade de inóculo não foi significativo para a produção de etanol, visto que a produção continuou em aproximadamente de 1,4 g/L.

A diferença que houve quando se aumentou a quantidade de inóculo, foi o tempo para atingir a produção máxima que na fermentação. Na fermentação com 1% de inóculo esse tempo foi com 8 horas de fermentação, já na fermentação utilizando 10% de inóculo foi com 5 horas de fermentação. Para trabalhos futuros optou-se trabalhar com 1% de inóculo visto que a diferença não é significativa, visto que o escopo deste trabalho era verificar os efeitos de diferentes microrganismos na produção de etanol, ensaios mais sistemáticos serão realizados para verificar o efeito do inóculo na produtividade. Uma vez que a produtividade é um parâmetro importantíssimo para concepção de uma produção industrial.

Conclusões

Através deste estudo foi verificado que dos microrganismos avaliados apenas a *Klebsiella pneumonia* 396 (ATCC 29665) foi mais adequada para produção de etanol utilizando glicerol como substrato. As duas cepas de *Saccharomyces* sp.1201 e *Saccharomyces* sp.1238, não tiveram os resultados esperados, sua produção de etanol foi menor do que o esperado e não houve consumo de glicerol considerável, assim não sendo adequada para o nosso estudo.

Alem disso, utilizando 1% de inóculo obteve-se o mesmo rendimento quando utilizamos 10%. Em estudos posteriores verificaremos as condições ótimas para produção de etanol como: temperatura, rotação e pH. Estudaremos também a possível produção de butanol e 1,3 propanodiol através da *Klebsiella pneumonia*396 (ATCC 29665).

Agradecimentos

Os autores agradecem ao apoio da ANP, FINEP.

Referências Bibliográficas

CHENG, K. K., LIU, D. H., SUN, Y., & LIU, W. B. 1,3-Propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies. **Biotechnology Letters**. 26, 911–915, 2004.

GONZÁLEZ-PAJUELO M., ANDRADE J.C., VASCONCELOS I. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. **J Ind Microbiol Biotech.**31, 442–6, 2004.

MA, B. BIN; XU, X. L.; ZHANG, G. L.; WANG, L. W.; WU, M.; LI, C. Microbial Production of 1,3-Propanediol by *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li under Different Aeration Strategies. **Appl Biochem Biotechnol.** 152,127–134, 2009.

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: 1. The Phenomena and Characterization of Oscillation and Hysteresis. **Biotechnology and Bioengineering.** V. 52, p. 549-560, 1996.

MU, Y.; TENG, H.; ZHANG, D.J.; WANG, W.; XIU Z.L. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol biodiesel preparations. **Biotechnol Lett.** 28, 1755–9, 2006.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances.** 2008, doi:10.1016/j.biotechadv.2008.07.006.

VICENTE, G.; COLTERON, A.; MARTINEZ, J.; ARACIL, J. Application of the factorial design of experiments and response surface methodology to optimize biodiesel production. **Industrial Crops and Products.** n. 8, p. 28-35, 1998.

ZHAO, Y. N., CHEN, G., & YAO, S. J. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Engineering Journal.** 32, 93–99, 2006.