

8º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



TÍTULO DO TRABALHO:

Produção de butanol a partir de glicerina utilizando bactérias do gênero *clostridium*

AUTORES:

Aline Souza Tavares¹, Tatiana Felix Ferreira², Maria Alice Zarur Coelho³

INSTITUIÇÃO:

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, ² Universidade Federal do Rio de Janeiro, ³ Universidade Federal do Rio de Janeiro

Este Trabalho foi preparado para apresentação no 8º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás - 8º PDPETRO, realizado pela Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás - ABPG, no período de 20 a 22 de outubro de 2015, em Curitiba/PR. Esse Trabalho foi selecionado pelo Comitê Científico do evento para apresentação, seguindo as informações contidas no documento submetido pelo(s) autor(es). O conteúdo do Trabalho, como apresentado, não foi revisado pela ABPG. Os organizadores não irão traduzir ou corrigir os textos recebidos. O material conforme, apresentado, não necessariamente reflete as opiniões da Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás. O(s) autor(es) tem conhecimento e aprovação de que este Trabalho seja publicado nos Anais do 8º PDPETRO.

Produção de butanol a partir de glicerina utilizando bactérias do gênero *Clostridium*

Abstract

The n-butanol is very important for chemical industry, because can be used as intermediary reagent for solvents and fuels production plasticizers, paints, cosmetics and detergents. The industrial pathway is olefin hydroformylation reaction, as propylene (Oxo Process). The biodiesel-derived glycerin, defined as 80 % on glycerol, had been produced in excess with the largest global biodiesel production. However, this taking low glycerin prices, even unfeasibility of part of its production from other routes. Thereby, further researches has made with effort to generate new applications for that residue, including butanol production. The biotechnological pathway is more potentially viable, whereas the co-products formed are interesting for industry as ethanol and acetone. Additionally, the industrial pathway results in undesirable products as isobutanol, dibutyl ether and others heavy products. The strain *Clostridium acetobutylicum* was selected for this study. The first step was activation of this strain. The process was carried out in anaerobic chamber and, then, in shaker at 160 rpm and 37°C for 24h. Upon activated, the growth cells were transferred to penicillin bottles containing RCM (Reinforced Clostridium Medium) and stored as stock cultures. In this study, were tested three cultures media: i) Glycerol P.A. 20 g/L; ii) Crude glycerin; iii) Glucose 20 g/L. The process was carried out in shaker at 160 rpm and 37 °C for 48 h. For cell growth and pH of the fermentation the samples were collected at 0 h, 20 h, 24 h, 42 h and 48 h. Cell growth was determined using OD (Optical Density) at 600 nm. The cell growth was more intense in the media containing crude glycerin. The glycerin was also the best substrate for butanol production. Therefore, the goal of this study is to evaluate the capacity for *Clostridium acetobutylicum* to produce butanol from biodiesel-derived glycerin and to compare these results with others carbon sources as glycerin P.A. and glucose. Additionally, to analyse if the biodiesel-derived glycerin could be the only carbon source for biobutanol production.

Introdução

Os biocombustíveis estão cada vez mais ampliando seu espaço no mercado energético e, principalmente, nas pesquisas científicas. Fatores como redução da oferta de combustíveis fósseis e poluição ambiental constante chamam a atenção global para o aumento de fonte energéticas sustentáveis que possam garantir esse suprimento no futuro.

O butanol, também conhecido como álcool butílico, tem fórmula molecular $C_4H_{10}O$ e peso molecular 74,12. Tem grande importância industrial, pois é utilizado, principalmente, como intermediário para produção de solventes e combustíveis, além de plastificantes, tintas, cosméticos e detergentes (Elekeiroz, 2010). A principal via de produção industrial é por hidroformilação de oleofinas (Processo “Oxo”), como, por exemplo, o propileno (Patakova *et al.*, 2013).

A rota de obtenção industrial apresenta algumas desvantagens, entretanto, devido à formação de co-produtos indesejáveis, como o iso-butanol, dibutil-éter e produtos pesados (Ogata, 2004). Dessa forma, a rota fermentativa se mostra potencialmente viável, pois tanto o produto de interesse quanto os co-produtos formados podem ser utilizados na geração de outros químicos de valor agregado (Masiero, 2011).

A glicerina, nome comercial utilizado para produtos contendo o glicerol com 95% de pureza, pode ser produzida por via química ou fermentativa. Atualmente, é obtida em quantidades excessivas como co-produto da síntese de biodiesel. Isso, por sua vez, tem levado a uma queda nos preços da glicerina e, inclusive, à exclusão de parte da sua produção a partir de outras rotas (Mota *et al.*, 2011). Dessa

forma, novos estudos têm surgido com o intuito de gerarem novas aplicações para esse resíduo, incluindo a produção de butanol, uma vez que irá aproveitar um importante co-produto industrial por rota sustentável para gerar um intermediário químico de interesse.

Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a capacidade da bactéria *Clostridium acetobutylicum* em produzir butanol a partir da glicerina e comparar estes resultados com outras fontes de carbono como glicerol P.A. e glicose, além de verificar se a glicerina pode ser a única fonte de carbono para a biossíntese de butanol.

Metodologia

A cepa utilizada neste trabalho foi a *Clostridium acetobutylicum* NRRL B-528, a qual foi adquirida da ARS Culture Collection pertencente à United States Department of Agriculture.

Para a etapa de ativação da bactéria foram testados três tipos de meio: i) RCM (*Reinforced Clostridium Medium*) – 38 g/L; ii) Tioglicolato¹ e RCM e iii) Glicose – 20 g/L e RCM. O inóculo foi feito em câmara anaeróbica em frascos de penicilina contendo 50 mL de meio. O processo foi conduzido em *shaker* a 160 rpm e 37°C por 24 h. Como foi verificada a ativação, foram transferidos 2 mL do meio ativado em meio RCM 38 g/L para a replicação das cepas em frascos de penicilina. Do mesmo modo, o processo foi conduzido em *shaker* a 160 rpm e 37°C por 24 h e, então, as cepas foram armazenadas a 4°C. Estes ensaios foram realizados em triplicata.

Uma alíquota da cultura de células replicadas foi, então, transferida para três tipos de meio contendo os seguintes substratos: i) Glicerol P.A. 20 g/L; ii) Glicerina e iii) Glicose 20 g/L. A composição deste meio está apresentada na Tabela 1. A glicerina foi adquirida de uma planta piloto de biodiesel produzido pelo Petróleo Brasileiro S.A.

Tabela 1. Composição do meio de cultivo.

Composição	Concentração (g/L)
Peptona	10
Extrato de levedura	5
K ₂ HPO ₄	3
Na ₂ CO ₃	1
CaCl ₂	0,2
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,2
Na ₂ S	0,02
(NH ₄) ₂ SO ₄	1

Fonte: Yadav *et al.*, 2014.

Cada ensaio foi conduzido em *shaker* a 160 rpm e 37°C por 48 h, dividido nos seguintes intervalos: 0 h, 20 h, 24 h, 42 h e 48 h. A cada ponto foram retiradas alíquotas para análise do crescimento celular.

¹ Meio líquido de Tioglicolato: Peptona de caseína (15 g/L), extrato de levedura (5 g/L), tioglicolato de sódio (0,5 g/L), cloreto de sódio (2,5 g/L), L-cisteína (0,25 g/L) e ágar bacteriológico (0,75 g/L).

Além disso, também houve acompanhamento do pH do meio a cada ponto. Estes ensaios foram feitos em duplicata.

Resultados e Discussão

O crescimento celular e o comportamento do pH ao longo da fermentação estão apresentados nas Figuras 1, 2 e 3, as quais estão correlacionadas à performance do glicerol P.A., da glicose e da glicerina, respectivamente.

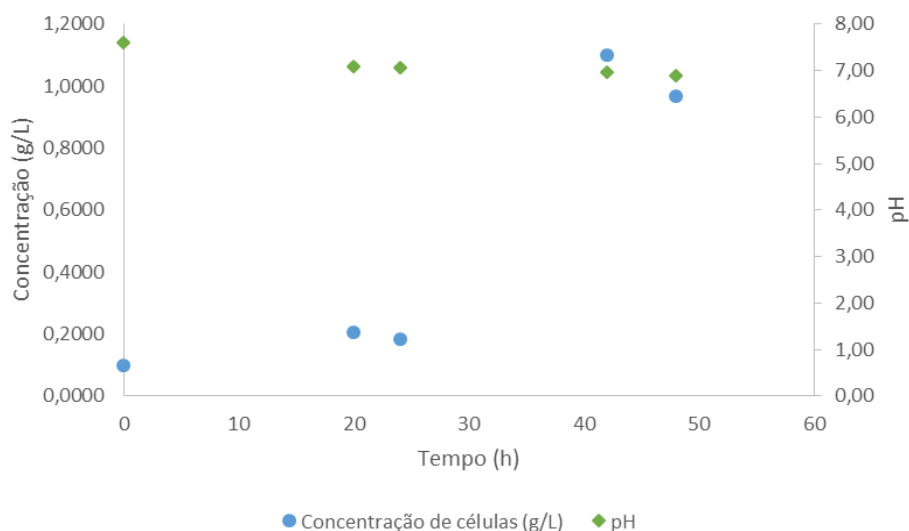


Figura 1. Crescimento celular e pH do meio quando glicerol P.A. é a fonte de carbono.

Pode-se observar um salto no crescimento celular a partir das 24 h para 42 h, porém é pouco alterado quando chega em 48 h, tendo o valor máximo de 1,1 g/L. Já o pH se manteve estável ao longo de toda a fermentação, atingindo o valor final de 6,9. Isso pode indicar que não houve a fase acidogênica, isto é, que não houve produção de ácidos ao longo da fermentação ou houve em quantidades não significativas. Ou ainda a fase solventogênica pode ter sido mais evidente.

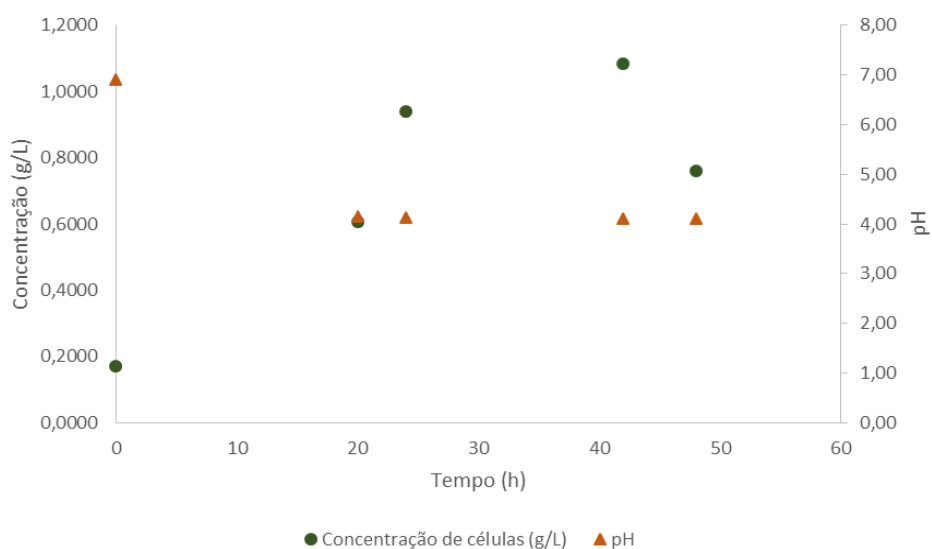


Figura 2. Crescimento celular e pH do meio quando glicose é a fonte de carbono.

Já no caso da Figura 2, o perfil do crescimento celular se mostrou bem diferente quando a fonte de carbono é a glicose. Nota-se que após 20 h de fermentação a concentração de células se encontra bem maior em relação ao consumo de glicerol. Entretanto, houve uma queda significativa na concentração

celular quando o processo atinge 48 h, tendo um valor máximo de 1,08 g/L. Além disso, o perfil do pH também se diferenciou, visto que decresce ao longo do tempo. Isso demonstra a fase acidogênica foi mais evidente e, com isso, pode-se inferir que houve produção de ácidos.

A Figura 3 apresenta o perfil do crescimento celular quando a glicerina foi consumida como fonte de carbono.

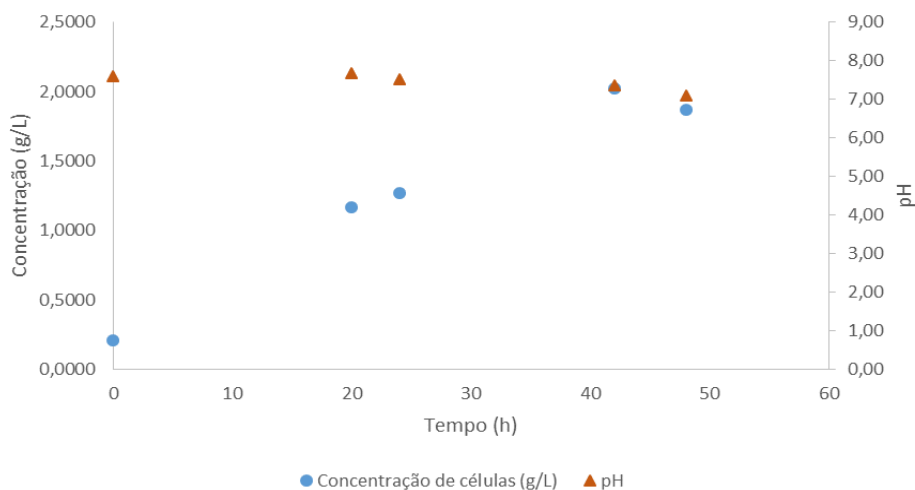


Figura 3. Crescimento celular e pH do meio quando glicerina é a fonte de carbono.

Pode-se observar que o crescimento celular apresenta melhores resultados quando a glicerina é consumida, tendo seu valor máximo de 2,02 g/L. Assim como no consumo de glicose, após 20 h a taxa de crescimento é positiva, estagnando após 42 h. Quanto ao pH, este se manteve estável ao longo do processo, indicando que também não houve a fase acidogênica ou foi pouco significativa e, com isso, a fase solventogênica pode ter sido mais evidente.

Entretanto, para a confirmação das hipóteses relativas às fases acidogênica e solventogênica faz-se necessário a análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para que os produtos sejam identificados. Masierol *et al.*, 2011 relataram que a transição destas fases estão relacionadas à presença de ácido butírico não dissociado.

Conclusões

Analisando os três substratos, a glicerina foi o que proporcionou melhores resultados no crescimento celular. Apesar de o pH não ter sido alterado ao longo da fermentação nesse caso, ainda é preciso a análise dos produtos obtidos.

Portanto, o maior crescimento celular conferido pela glicerina entra em consonância com o objetivo principal deste estudo, que se trata do aproveitamento desse resíduo como fonte de carbono para a produção de butanol.

Agradecimentos

Agradecimentos à ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, pelo fomento à pesquisa.

Referências Bibliográficas

Elekeiroz. Boletim de produtos. Disponível em: <http://www.elekeiroz.com.br/PT/produtos/boletins/N-Butanol.pdf>>. Acesso em: 30 de Nov. 2013.

Masiero, S.S; Trierweiler, L.F.; Trierweiler, J.O. Produção de Butanol por *Clostridium Acetobutylicum*. X Oktoberforum, 2011.

Mota, R.M.; Silva, L.D.; Junior, A.C.G.F.; Freitas, L.S.; Souza, M.M.V.M.; Ramos, A.L.D. Comparação de Catalisadores Heterogêneos na eterificação de glicerol com terc-butanol. 16º Congresso Brasileiro de Catálise, 2011.

Ogata, T. Aplicação do conceito de produção mais limpa na otimização do processo de produção de álcool butílico. Dissertação de Mestrado Profissional em Gerenciamento e Tecnologias Ambientais no Processo Produtivo. Departamento de Engenharia Ambiental, UFBA. 2004.

Patakova, P.; Linhova, M.; Rychtera, M.; Paulova, L.; Melzoch, K. Novel and neglected issues of acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation by clostridia: Clostridium metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems. Biotechnology Advances, 31, 58-67. 2013.

Yadav, S.; Rawat, G.; Tripathi, P.; Saxena, R. K. A novel approach for biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum* using glycerol: A low cost substrate. Renewable Energy, 71, 37-42. 2014.