

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



TÍTULO DO TRABALHO:

Otimização do pH para produção de 1,3-propanodiol por *Clostridium beijerinckii* DSM 791

AUTORES:

Daiana Wischral, Fernando Luiz Pellegrini Pessoa, Nei Pereira Jr

INSTITUIÇÃO:

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.

OTIMIZAÇÃO DO PH PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL POR *Clostridium beijerinckii* DSM 791

Abstract

In recent years, concern over the biological production of commercially important metabolites has been growing. This is mainly attributed to escalating global energy and environmental problems, which have led researchers worldwide to devise methods for producing almost everything in a “green” way. Of these, the production of biofuels has attracted a great deal of attention. Biodiesel is an alternative fuel that reduces net greenhouse effects and its use has become mandatory in many countries. The main by-product of the biodiesel plant is glycerol, a chemical compound of importance as an end product and as a starting material for other useful products, for example the 1,3-propanediol. The 1,3-propanediol is a bifunctional organic compound that could potentially be used for many synthesis reactions, in particular as a monomer for polycondensations to produce polyesters, polyethers and polyurethanes. Therefore, this work is aimed at optimizing the pH of fermentation to improve glycerol consumption and 1,3-propanediol production by *C. beijerinckii* DSM 791 using glycerol as carbon source. The methods were anaerobic fermentation in bioreactor and the products concentration were determinate by chromatography. The medium for activation was RCM (Reinforced Clostridial Medium) and to production: 0.5 g/L yeast extract, 0.005 g/L $C_2H_3NaO_2$, 5 g/L K_2HPO_4 and 22 g/L glycerol. The inoculum with 18 hours of activation was added to production medium at 37°C, 100 rpm and pH between 4.8 and 7.0. The cells growing was determinate by optical density at 600 nm. The 1,3-propanediol production from glycerol presented best results at pH 5.5-6.0, with yield to 1,3-propanediol of 0.56 g/g.

Introdução

O desenvolvimento de tecnologias para produção de biocombustíveis é uma maneira de garantir o suprimento futuro de energia em substituição aos combustíveis fósseis e atenuar os problemas ambientais provocados por eles. O biodiesel o está entre os biocombustíveis que aparecem como parte de um elenco de respostas a substituição dos combustíveis fósseis além de seu emprego ser obrigatório em alguns países (CGEE, 2009; PINTO & MOTA, 2014).

O biodiesel é obtido por catálise ácida, método mais utilizado devido ao maior rendimento, produz como subproduto uma grande quantidade de glicerol. É possível que o desenvolvimento de processos para o bioaproveitamento de glicerol, levando à obtenção de moléculas de maior valor agregado tenha impacto positivo sob a viabilidade econômica da produção de biodiesel (SILVA et al 2009; YAZDANI & GONZALEZ, 2007). Bactérias dos gêneros *Clostridium spp.*, *Klebsiella spp.* e *E. coli* modificada, são capazes de metabolizar o glicerol através de diferentes rotas metabólicas levando a obtenção de ácidos e 1,3-propanodiol.

O glicerol é primeiramente desidratado a 3-hidroxypropionaldehde (3-HPA) e em seguida reduzido a 1,3-propanodiol (YAZDANI & GONZALEZ, 2007; BIEBL et al, 1999; CELÍNSKA, 2010; HARTLEP et al, 2012). O 1,3-propanodiol é um composto intermediário da síntese de compostos cíclicos e monômeros para poliésteres, poliuretanos e polipropileno tereftalato (PTT). O campo de aplicação do 1,3-propanodiol é amplamente abrangente, desde a produção de polímeros, tintas, resinas de poliéster, lubrificantes, anticongelantes, até produção de cosméticos. Esta substância química é obtida tradicionalmente a partir de óxidos de propileno, por processos químicos, que requer alta pressão e o uso de catalisadores caros, enquanto intermediários tóxicos também são produzidos (BIEBL et al, 1999; ZENG & BIEBL, 2002).

A produção de 1,3-propanodiol através de métodos biotecnológicos fornece benefícios ambientais significativos, como muito menos consumo de energia, sustentabilidade e mitigação do aquecimento mundial em comparação com a utilização de fontes petro-químicas. A viabilidade econômica desse processo é dependente do preço da matéria-prima que é o glicerol, de modo que o uso glicerol residual para a produção de 1,3-propanodiol poderia fazer este processo altamente competitivo (ZENG & BIEBL, 2002). O objetivo do presente estudo foi otimização do pH durante a produção de 1,3-propanodiol por *Clostridium beijerinckii* DSM 791.

Metodologia

Os micro-organismo empregado neste estudo foi *Clostridium beijerinckii* DSM 791. A composição do meio empregado na etapa de ativação em g/L: extrato de levedura, 10; extrato de carne, 10; peptona, 10; cisteína, 0,5; cloreto de sódio, 5; acetato de sódio, 3; ágar, 0,5 e glicerol, 5. O meio, reduzido com injeção de nitrogênio, esterilizado, inoculado e mantido a 35 °C durante 18 horas. O meio utilizado na produção em biorreator 1L, previamente otimizado, em g/L: extrato de levedura, 0,5; acetato de sódio, 0,005; K₂HPO₄, 5; e glicerol, 22. O meio foi esterilizado, reduzido com injeção de nitrogênio, inoculado e mantido sob agitação a 100 rpm e temperatura de 35 °C.

O pH foi controlado com a adição de solução de hidróxido de amônio a 30%, o intervalo de estudo do pH foi de 4,8 a 7,0. A concentração celular foi determinada pelo método turbidimétrico a 600 nm. Para a quantificação de glicerol e 1,3-propanodiol foi utilizado o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Resultados e Discussão

A produção de 1,3-propanodiol sob pH 5,5 a 6,5, *Clostridium beijerinckii* DSM 791 apresentou maior produção de 1,3-propanodiol, em torno de 12 g/L. O maior ao crescimento celular, 3,5 expresso em OD, se deu entre os pH 5,0 e 6,0 (Figura 1).

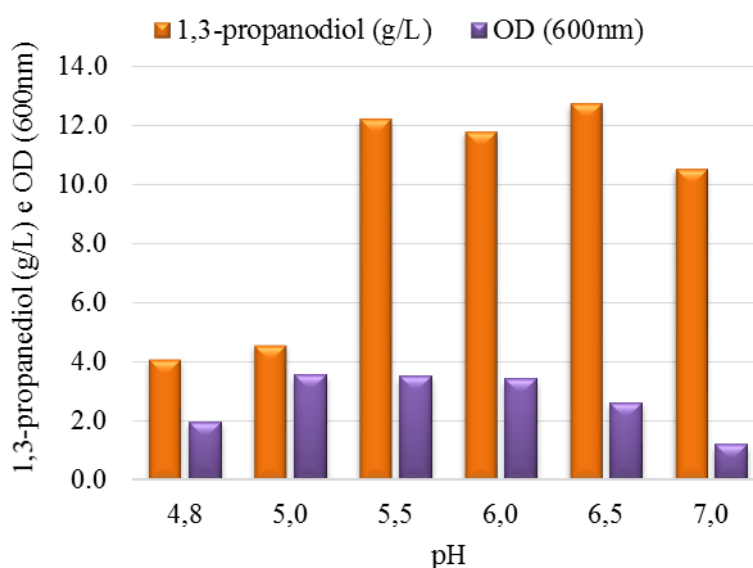


Figura 1 – Produção de 1,3-propanodiol e crescimento celular (OD a 600nm) em pH de 4,8 a 7,0.

O rendimento, expresso em gramas de 1,3-propanodiol produzido por gramas de glicerol consumido pode ser observado na Figura 2. Os melhores rendimentos, entre 0,56 g/g e 0,60 g/g (0,68 mol/mol e 0,73 mol/mol), foram obtidos entre pH 5,5 a 7,0.

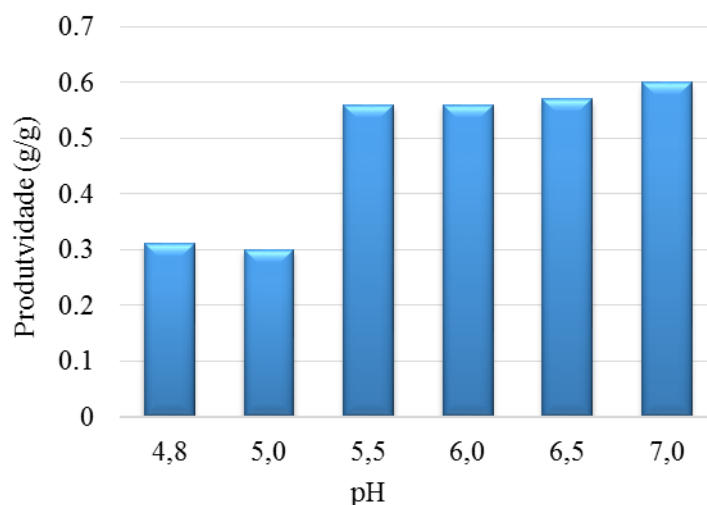


Figura 2 – Rendimento em gramas de 1,3-propanodiol produzido por gramas de glicerol consumido em pH de 4,8 a 7,0.

O rendimento percentual de substrato (RPS) consiste na quantidade de glicerol consumida em relação a quantidade adicionada. As melhores porcentagens de RPS foram 96% e 95% obtidas entre os pH 5,5 e 6,5 (Figura 3).

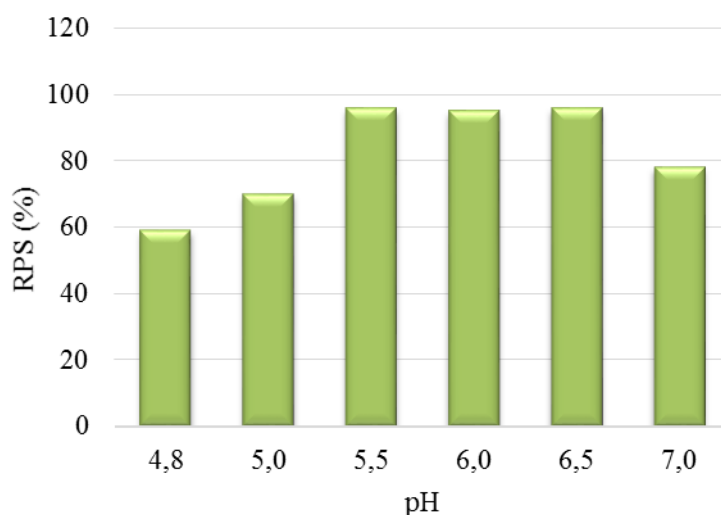


Figura 3 – Redução percentual de substrato em pH de 4,8 a 7,0.

Como a produção de 1,3-propanodiol é associada ao crescimento, ao analisar todos os resultados observa-se que os melhores pH para produção são 5,5 e 6,0, nos quais se observa maior produção, crescimento microbiano, rendimento e RPS.

Os resultados obtidos são comparáveis e melhores que os obtidos por Biebl et al. (1992) que obteve rendimento de 0.62 mol/mol de 1,3-propanodiol por *C. butyricum* e Otte et al. (2009) que chegou a 0.64 mol/mol de 1,3-propanodiol por *C. diolis*.

Conclusões

O pH certamente influencia no metabolismo de fermentação de glicerol para produção de 1,3-propanodiol e os pH ideais para produção de 1,3-propanodiol por *Clostridium beijerinckii* DSM 791 são 5,5 e 6,0.

Agradecimentos

ANP e FINEP através do Programa de Recursos Humanos (PRH 13), da Escola de Química - Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural.

Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos – Escola de Química da UFRJ.

Koffolt Laboratories - Dept. of Chemical & Biomolecular Engineering of Ohio State University.

Referências Bibliográficas

BIEBL H., MARTEN S., HIPPE H., DECKWER W. D. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 36, p. 592–597, 1992.

BIEBL H., MENZEL K., ZENG A. P., DECKWER W. D. Microbial production of 1,3-propanediol. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 52, p. 289–297, 1999.

CELÍŃSKA E. Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering. **Biotechnology Advances.** v. 28, p. 519–530, 2010.

CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - Química verde no Brasil: 2010-2030 – Edição revista e atualizada, Brasília - DF, 2010. DEMIRBAS, M.F. Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. **Applied Energy**, v. 86, p. S151 – S161, 2009.

HARTLEP M., HUSSMAN W., PRAYITNO N., MEYNIAL-SALLES I., ZENG A. P. Study of two-stage processes for the microbial production of 1,3-propanediol from glycerol. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 60, p. 60–66, 2002.

PINTO B. P., MOTA C. J. A. in Developments in glycerol byproduct-based biorefineries. Advances in Biorefineries: Biomass and Waste Supply Chain Exploitation (Waldron K., ed.), **Woodhead publishing**, Sawston, Cambridge, UK, p. 364–385, 2014.

SILVA G. P., MACK M., CONTIERO J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances.** v. 27, p. 30–39, 2009.

YAZDANI S. S., GONZALEZ R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology.** v. 18, p. 213–219, 2007.

ZENG A. P., BIEBL H. in Bulk-Chemicals from Biotechnology: The Case of 1,3-Propanediol Production and the New Trends, v. 47: **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology** (Scheper T., ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 239–259, 2002.

OTTE B., GRUNWALDT E., MAHMOUD O., JENNEWEIN S. Genome shuffling in *Clostridium diolis* DSM 15410 for improved 1,3- propanediol production. **Appl Environ Microbiol.** v. 75 (24), p. 7610–7616, 2009.