

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DO 1,3- PROPANODIOL PELO *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DO GLICEROL

FLAVIA GONÇALVES DOMINGUES FERREIRA¹

¹Dr^a. em Engenharia Química pela UFPE, Docente da Estácio Recife, Recife-PE,
flaviagdferreira1974@gmail.com

Apresentado no
Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia – CONTECC
15 a 17 de setembro de 2021

RESUMO: O glicerol, subproduto da produção de biodiesel, vem sendo investigado como fonte de carbono em processos microbianos para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado. A utilização do glicerol na produção de 1,3-propanodiol (importante monômero utilizado na síntese de polímeros). O processo microbiano ocorre em anaerobiose, onde bactérias convertem o glicerol em 1,3-PD e vários outros subprodutos, de acordo com as suas vias metabólicas. Dentre os microrganismos produtores de 1,3-PD, destacam-se as bactérias *Clostridium butyricum* e *Klebsiella pneumoniae*. No presente trabalho foi realizada uma fermentação em batelada utilizando o *Clostridium butyricum* DMSZ 10702 para produção de 1,3-PD, com o glicerol PA como fonte de carbono. Também foi adicionado no meio de produção o ácido p-aminobenzóico (PABA) e o extrato de levedura para verificar a influência desses nutrientes no rendimento em biomassa e no produto 1,3-PD. Para avaliar a biomassa, a técnica de peso seco foi utilizada para o cálculo da concentração do microrganismo presente em cada cultura. O mosto resultante da fermentação foi analisado por cromatografia líquida. Os resultados deste estudo mostram a influência das duas variáveis estudadas na produção de 1,3-PD.

PALAVRAS-CHAVE: Glicerol, 1,3-propanodiol, *Clostridium*, fermentação.

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF 1,3- PROPANODIOL BY *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* FROM GLYCEROL FERMENTATION

ABSTRACT: Glycerol, a by-product of biodiesel production, has been investigated as a carbon source in microbial processes to obtain high added value bioproducts. The microbiological use of glycerol in the production of 1,3-propanediol (an important monomer used in polymer synthesis) is a very viable application. The microbial process occurs in anaerobiosis, where bacteria convert glycerol into 1,3-PD and various other by-products, according to their metabolic pathways. Among the microorganisms producing 1,3-PD, the bacteria *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* stand out. In the present work, a batch fermentation was carried out using *Clostridium butyricum* DMSZ 10702 for the production of 1,3-PD, with glycerol PA as a carbon source. P-aminobenzoic acid (PABA) and yeast extract were also added to the production medium to verify the influence of these nutrients on biomass yield and product 1,3-PD. To assess biomass, the dry weight technique was used to calculate the concentration of the microorganism present in each culture. The must resulting from fermentation was analyzed by liquid chromatography. The results of this study show the influence of the two variables studied in the production of 1,3-PD.

KEYWORDS: Glycerol, 1,3-propanediol, *Clostridium*, fermentation.

INTRODUÇÃO

Segundo Demibras (2002), o Biodiesel é um combustível renovável e biodegradável, ambientalmente amigável. Encinar *et al.* (2002) o define como sendo um mono-alquil éster de ácidos graxos derivados de fontes renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais, obtido através de um processo de transesterificação com álcool na presença de um catalisador, no qual ocorre a transformação de triglicerídeos em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos.

Os produtos da reação química são ésteres (o biodiesel) e a glicerina (glicerol). Os ésteres têm características físico-químicas muito semelhantes as do diesel, conforme demonstram as experiências realizadas em diversos países. Segundo Oliveira (2001), esse biodiesel é uma evolução na tentativa de substituição de óleo diesel por biomassa, iniciada pelo aproveitamento de óleos vegetais in natura.

São vários os desafios a serem vencidos para atender o objetivo inicial do governo Federal de produzir 800 milhões de litros de biodiesel por ano. Dentre eles, destaca-se o aproveitamento dos subprodutos gerados, principalmente a glicerina que é o único subproduto de valor (mas a tendência progressiva é de depreciação de preços pelo acúmulo da oferta) e tem uma produção aproximada de 48 a 80 milhões de litros por ano, segundo trabalhos de Parente (2003), Shuchardt *et al.* (1998) e Encinar *et al.* (1999).

Portanto, a grande oferta de glicerol proveniente da produção do biodiesel, gera um grande problema, pois não há mercado consumidor para essa grande quantidade de glicerina. Sendo assim, o seu uso vem sendo investigado como futura fonte de carbono em processos microbianos para obtenção de bioprodutos de alto valor agregado. A produção de 1,3-propanodiol por via microbiana, utilizando glicerol, através das bactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Clostridium* é uma aplicação bastante viável. Trabalhos de Biebl *et al.* (1992), González-Pajuelo *et al.* (2006) e Xiu *et al.* (2007) mostram que sob condições de anaerobiose, esses micro-organismos convertem o glicerol em 1,3-propanodiol e vários outros produtos, de acordo com as vias metabólicas do seu processo fermentativo.

Segundo Saxena *et al.* (2009), o 1,3-propanodiol é um dos mais conhecidos produtos desse processo fermentativo. Ele foi identificado pela primeira vez em 1881 por August Freund, a partir da fermentação do glicerol em uma cultura de *Clostridium pasteurianum*. O campo de aplicação do 1,3-propanodiol (1,3-PD) é considerado abrangente, desde a produção de polímeros, tintas, resinas de poliéster, lubrificantes, anticongelantes, até a produção de cosméticos. Os polímeros a partir de 1,3-PD são mais resistentes à tensão e apresentam um alto poder de pigmentação como mostrou o trabalho de Biebl *et al.* (1999).

O objetivo do presente trabalho é utilizar o glicerol PA como fonte de carbono no processo fermentativo do *Clostridium butyricum* DMSZ 10702 em quatro experimentos diferentes, diferindo apenas na presença ou não de PABA e extrato de levedura, avaliando a influência dessas duas variáveis no crescimento do micro-organismo, no consumo do glicerol e na produção de 1,3-PD através de curvas ao longo do tempo e valores de rendimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

Micorganismo: O microrganismo utilizado no trabalho foi o *Clostridium butyricum* DMSZ 10702. Seu armazenamento foi feito de maneira anaeróbica em incubadora B.O.D. a 35°C. Após ser inoculado em meio RCM para crescimento, permaneceu na incubadora até que fosse observado o crescimento celular. Em seguida foi transferido para geladeira a 5°C para desacelerar seu metabolismo (para que não consumisse todos os nutrientes do meio e morresse) enquanto não era inoculado novamente (por exemplo, numa pré-cultura).

Soluções Utilizadas: Caldo Clostridial Reforçado (RCM) da marca HIMEDIA; Pré-Cultura e Meio para fermentação segundo Günzel *et al.* (1991); Solução Salina para diluição; Solução de Resazurina 0,025%; Solução Redutora de Tioglicolato de Sódio (12,4g de Tioglicolato de sódio em 1000mL de água destilada); Solução de Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) 5mM.

Metodologia Experimental

Meios para manutenção e crescimento: Primeiramente, o micro-organismo sofre um choque térmico, sendo colocado em banho-maria a 80°C por 10 minutos, para ativar os esporos passando para a forma vegetativa. O meio para manutenção e crescimento é o Caldo Clostridial Reforçado (RCM). Esse meio foi diluído em água destilada e prosseguiu-se como descrito no item anterior. Foram preparados 100mL, onde 80mL foram transferidos para um tubo de penicilina de 100mL. Utilizando uma seringa (c/ agulha) estéril, o microrganismo foi inoculado no tubo de penicilina contendo o meio para manutenção e crescimento na proporção de 10% v/v e incubado a 35°C.

Pré-Cultura: Com o microrganismo crescido (cerca de 10 dias depois de inoculado no meio RCM), ele pôde ser inoculado na pré-cultura, também na proporção de 10% v/v. Sua composição é segundo Günzel *et al.* (1991), e contém: KH_2PO_4 (0,5g/L), K_2HPO_4 (0,5g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01g/L), PABA (0,001g/L), Ácido Acético (2,2g/L), Extrato de Levedura (2,0g/L), Glicerol (10g/L), solução de elementos traços (1mL/L) e solução de ferro (2mL/L). Foram preparados 100mL, onde 80mL foram transferidos para um tubo de penicilina de 100mL.

Meios para fermentação: Após 24 horas na incubadora a 35°C, foi feita a inoculação (10% v/v) nos quatro ensaios para fermentação através de seringas / agulhas estéreis. Antes da inoculação, os quatro ensaios também receberam 1mL de solução redutora de tioglicolato de sódio. Os ensaios diferem entre si, pela presença ou não de PABA e extrato de levedura. A composição dos quatro ensaios encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição dos quatro ensaios para fermentação - Valores para 1000mL.

Componente	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4
K_2HPO_4	2,0g	2,0g	2,0g	2,0g
KH_2PO_4	1,0g	1,0g	1,0g	1,0g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0g	1,0g	1,0g	1,0g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4g	0,4g	0,4g	0,4g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,04g	0,04g	0,04g	0,04g
CaCO_3	4,0g	4,0g	4,0g	4,0g
Extrato de Levedura	0,0g	2,0g	2,0g	0,0g
Glicerol	30,0g	30,0g	30,0g	30,0g
Sol. Elem. Traços	2,0mL	2,0mL	2,0mL	2,0mL
Sol. Ferro	2,0mL	2,0mL	2,0mL	2,0mL
PABA	0,0g	0,001g	0,0g	0,001g

Avaliação do crescimento microbiano – Biomassa: Para avaliar o crescimento do microrganismo, foi utilizada a técnica do peso seco, para que possa ser calculada a concentração da biomassa em g/L. As amostras foram filtradas com o auxílio de um conjunto para filtração e membranas de 2µm previamente taradas, utilizando água de diluição para lavagem. A biomassa então ficou retida na membrana.

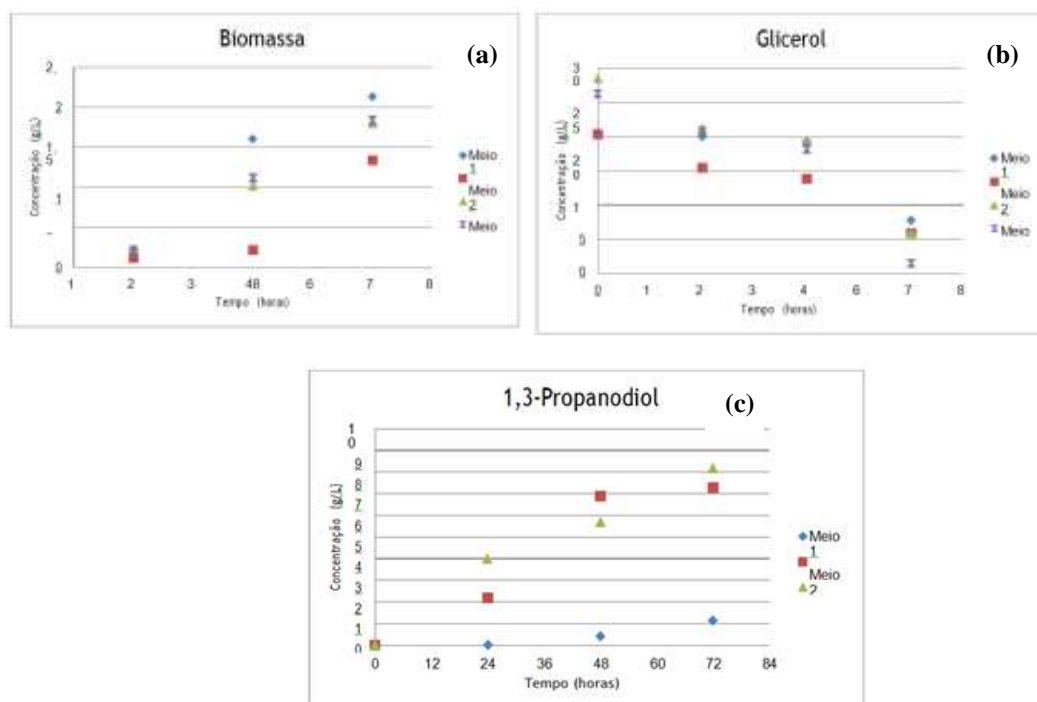
Consumo de Glicerol e produção de 1,3-propanodiol: O mosto resultante da filtração foi analisado por cromatografia de HPLC Hewlett-Packard (Agilent). A separação foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-rad) e a detecção foi obtida por índice de refração. As condições operacionais foram as seguintes: fase móvel, ácido sulfúrico 5mM; fluxo, 0,70mL/min; temperatura, 50°C e pressão, 86bar. Nessas condições, o tempo de residência do 1,3-PD foi observado em torno de 18-19 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da metodologia apresentada, a biomassa, a glicerina e o 1,3-PD foram avaliados em função do tempo de fermentação. Então, foi possível construir os gráficos correspondentes para avaliar o crescimento do micro-organismo, o consumo de glicerol e a produção de 1,3-propanodiol (Figura 1).

Observamos inicialmente dados incoerentes na Figura 2(b), onde a concentração inicial de glicerol não corresponde à concentração utilizada no meio de cultura (30g/L). Essa incoerência foi causada principalmente por erros na pesagem do glicerol, perdas na diluição e perdas na filtração. Como foi avaliado, esses erros são mais pronunciados no ensaio 2.

Figura 1 – Curva de crescimento do microrganismo (a), curva de consumo do glicerol (b) e curva de produção do 1,3-propanodiol (c) para os quatro ensaios do experimento.



Com os dados da fermentação, foi possível calcular dois coeficientes de rendimento segundo Borzani *et al.* (2001): (i) coeficiente global de conversão de substrato em produto ($Y_{1,3-PD/Glic.}$), (ii) coeficiente global de conversão de substrato em células ($Y_{Biom./Glic.}$). Os resultados para os quatro ensaios encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Coeficientes globais de conversão (em g/g) para a fermentação do *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 utilizando 30g/L de Glicerol PA como substrato.

Ensaio	$Y_{1,3-PD/Glic.}$	$Y_{Biom./Glic.}$
1	0,0088	0,166
2	0,500	0,0923
3	0,362	0,08
4	--	0,0743

Através do gráfico apresentado na Figura 1(a) podemos ver que o meio mais favorável para o crescimento do micro-organismo foi o ensaio 1. A Figura 1(b) mostra a concentração de glicerol real (detectada por cromatografia) nos tempos de fermentação. Podemos observar que após 24 horas de fermentação houve um consumo de 4,9% de glicerol no ensaio 1, 24,1% no ensaio 2, 25,7% no ensaio 3 e 20,8% no ensaio 4. Entretanto, para o final da fermentação, o consumo do glicerol foi maior no ensaio 4. Observamos então que quando há ausência de extrato de levedura e presença de PABA, o consumo de glicerol é maior. Por outro lado, o gráfico da Figura 1(c) mostra que os meios se comportaram de maneira diferente em relação à formação de produto. O primeiro fato importante que pôde ser visto, foi o ensaio 4 não produziu o 1,3-PD, contrastando com os resultados de consumo de glicerol. Ao passo que a presença de PABA e ausência de extrato de levedura favorecem o consumo de glicerol, inibem a produção de 1,3-PD.

Quando temos a ausência de PABA além da ausência de extrato de levedura, 1,3-PD é produzido, mas em pouca quantidade (resultados do ensaio 1). No entanto, quando temos a presença de extrato de levedura no meio de cultura, a produção de 1,3-PD cresce, sendo pouco influenciada pela presença de

PABA. Vemos esses resultados nos ensaios 2 e 3, onde as produções foram semelhantes, com valores de 7,29g/L e 8,21g/L respectivamente.

Agora, observando a Tabela 2, observa-se que quando o rendimento é calculado baseando-se no consumo de substrato, o ensaio 2 é o que mais se destaca na produção do 1,3-PD, enquanto que o ensaio 1 é o que mais se destaca no crescimento do microrganismo.

CONCLUSÃO

Foi possível comprovar que o *Clostridium butyricum* cresce utilizando 30g/L de glicerol PA como única fonte de carbono e produz o 1,3-propanodiol (ensaio1). Foi possível observar através das curvas da Figura 2 que existe uma relação direta entre o crescimento celular e a formação do 1,3-PD, pois o 1,3-PD é um metabólico primário sendo produzido em maior quantidade durante a fase exponencial de crescimento do micro-organismo. O resultado dos quatro ensaios mostra que para haver uma boa produção de 1,3-PD, é necessária a presença de extrato de levedura. Esse mesmo extrato de levedura afeta um pouco crescimento do microrganismo, mas de forma negativa.

Conclui-se também que o rendimento de 1,3-PD será maior, no ensaio em que o extrato de levedura e o PABA estiverem presentes (ensaio 2). Contrário a isso, o crescimento do micro-organismo é maior no ensaio com ausência de extrato de levedura e PABA (ensaio 1). Se levarmos em consideração trabalhos descritos na literatura, o rendimento (conversão de substrato em produto) alcançado é bastante satisfatório. Biebl *et al.* (1999) e Pinto (2009) encontram em seus trabalhos, rendimentos na faixa de 0,45-0,70 g/g.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Universitário Estácio do Recife, ao Departamento de Engenharia Química da UFPE.

REFERÊNCIAS

- Biebl, H.; Menzel, K.; Zeng, A. P.; 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.
- Borzani, W.; Schmidell, W.; Lima, A. U.; Aquarone, E. *Biotecnologia Industrial*. Volume 2, São Paulo: Edgar Bülcher, 2001.
- Demirbas, A. Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol. *Energ. Convers. Manage*, v. 43, p. 2349-2356, 2002.
- Encinar, J. M.; González, J. F.; Sabio, E.; Ramiro, M. J. Preparation and properties of biodiesel from *Cynara cardunculus* L. *Oil. Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 38, p. 2927-2931, 1999.
- Encinar, J. M.; González, J. F.; Rodríguez, J. J.; Tejedor, A. Biodiesel Fuels from Vegetable Oils: Transesterification of *Cynara cardunculus* L. Oils with Ethanol. *Energ. Fuel.*, v. 16, p. 443-450, 2002.
- González-Pajuelo, M.; Meynial-Salles, I.; Mendes, F.; Andrade, J. C.; Vasconcelos, I.; Soucaille, P. Microbiol Conversion of to 1,3-propanediol: Physiological Comparison of a Natural Producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an Engineered Strain, *Clostridium acetobutylicum* DC1 (pSPD5), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 72, p. 96-101, 2006.
- Günzel B.; Yonsel, S.; Deckwer, W. D. Fermentative production of 1,3-propanediol from glicerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2m³. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 36, p. 289-294, 1991.
- Oliveira, L. B. Biodiesel – Combustível limpo para transporte sustentável. In: Ribeiro, S. K. Transporte sustentável: alternativas para ônibus urbanos. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ, 2001.
- Parente, E. J. S. Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado. Fortaleza, 2003. Disponível em: <http://www.xitizap.com/Livro-Biodiesel.pdf>. Acessado em fevereiro de 2012.
- Pinto, M. M. L. Obtención bioquímica de 1,3-propanodiol a partir de Glicerina. Universidad de Valladolid, 2009.
- Saxena, R. K.; Anand, P.; Saran, S.; Isar, J. Microbial production of 1,3- propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol. Adv.*, v. 27, p. 895-913, 2009.
- SHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. *J. Brazil. Chem. Soc.*, v. 9, n. 1, p. 199-210, 1998.
- XIU, Z. L.; CHEN, X.; SUN, Y. Q.; ZHANG, D. J. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol–glucose co-fermentation in *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. *Biochem. Eng. J.*, v. 33, p. 42-52, 2007.