



XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

## Avaliação de diferentes meios de cultura na produção de metabólitos através de processo biológico anaeróbio utilizando *Clostridium pasteurianum* e glicerol como substrato principal

A. S. COLARES<sup>1\*</sup>, V. F. NUNES<sup>2</sup>, A. A. GUILHERME<sup>2</sup>, G. A. S. PINTO<sup>2</sup>, R. C. LEITÃO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará – Departamento de Engenharia Química

<sup>2</sup>Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE

\*aldoscolares@gmail.com

**RESUMO** – Na produção de biodiesel gera-se uma grande quantidade de glicerol como subproduto. Neste contexto, os processos biológicos surgem como alternativa para absorver parte do glicerol gerado, obtendo-se, assim, produtos de valor agregado. As rotas biológicas anaeróbias são muito diversificadas dependendo, dentre alguns fatores, do meio de cultivo. Este trabalho objetivou avaliar a produção de diferentes metabólitos, a partir de glicerol como substrato, em diferentes meios de cultivo, por processo biológico anaeróbio. Foi estudada a linhagem *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 em diferentes meios de cultura e glicerol como substrato principal, em ensaios conduzidos durante 10 dias a 37°C. Observou-se que os diferentes meios influenciam nas rotas metabólicas da cepa, produzindo ácidos orgânicos (acético, láctico, propiônico, butírico, succínico, valérico e isoaléxico) e álcoois (butanol e etanol). A partir destes resultados iniciais, será possível escolher o meio de cultivo adequado para o desenvolvimento de novos processos biológicos.

### 1. INTRODUÇÃO

O atual interesse por fontes energéticas de origem renovável acarreta uma procura por processos biotecnológicos que possam produzir combustíveis de forma eficiente e economicamente viável. No Brasil, o biodiesel já é produzido em larga escala e é componente do diesel combustível comum, o qual é formado por uma mistura de biodiesel e diesel de petróleo (ANP, 2013). O biodiesel é um combustível alternativo que reduz a produção dos gases do efeito estufa e o seu uso se tornou obrigatório em vários países do mundo (O'Connor, 2011). Segundo Taconi et al. (2009), o glicerol é gerado como subproduto na cadeia produtiva do biodiesel e representa 10% do volume da produção onde as indústrias químicas conseguem absorver apenas parte desse volume. O glicerol passou por uma queda rápida de preço pelo rápido aumento da produção mundial de biodiesel (Yazdani, 2007).

O glicerol pode ser biologicamente utilizado para produzir diferentes produtos químicos, tais como 1,3-propanodiol (1,3-PD) (Jun et al., 2010), ácido succínico (Lee et al., 2001), ácido capróico (Wasewar & Shende, 2010) e combustíveis alternativos, tais como hidrogênio (Ito et al., 2005), etanol (Jarvis et al., 1997) e butanol (Biebl, 2001) dentre outros produtos, por diferentes rotas biológicas

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

utilizando diferentes micro-organismos.

O principal aspecto da fermentação de glicerol versus a fermentação da glicose, por processos anaeróbios, é a produção de 1,3-PD como método metabólico para a regeneração do NADH, no balanço respiratório. O 1,3-PD é um produto químico valioso, utilizado principalmente como monômero para fabricação de materiais plásticos com características especiais, como, por exemplo, a alta biodegradabilidade, tais como o politereftalato de trimetileno (PTT). Também é utilizado em resinas, líquidos refrigerantes de motores, argamassas e tintas. O mercado de 1,3-PD tem mais de 100 milhões de libras por ano e cresce rapidamente (Salembro et al., 2009).

O ácido succínico é um bloco de construção importante que pode servir como um precursor de muitos produtos químicos de valor agregado, incluindo solventes, plastificantes, e plásticos biodegradáveis. A maior parte do ácido succínico é atualmente produzida por síntese química, utilizando anidrido maleico, derivado do petróleo. No entanto, nos últimos anos, progressos significativos foram feitos no sentido da produção em larga escala por processos fermentativos a partir de fontes de carbono renováveis, por exemplo, derivados de biomassa, a glicose (Yu et al., 2015).

O ácido caprótico (ácido n-hexanóico) é um líquido oleoso incolor e transparente na luz, com um cheiro pungente, encontrado em óleos e gorduras animais e utilizado em síntese orgânica, fabricação de perfume, medicamentos, graxa lubrificante, borrachas e corantes. O mercado para o ácido caprótico seria grandemente expandido se pudesse ser produzido a partir de materiais de baixo custo, caso fosse usado para formação de combustíveis alcanos e outros produtos. O ácido caprótico pode ser produzido comercialmente por várias vias, tais como a carbonilação do etileno com monóxido de carbono e água, a oxidação do propanal e a oxidação direta de hidrocarbonetos. Embora a via petroquímica disponha de bom rendimento, por causa do seu elevado custo, geralmente não é preferido. Devido ao aumento dos custos do petróleo, os processos biológicos para produção de ácido caprótico se apresentam como uma forma viável para produzi-lo (Wasewar & Shende, 2010).

Segundo Lin et al. (2011), o butanol pode ser um dos combustíveis alternativos mais promissores para resolver problemas de poluição ambiental podendo substituir a gasolina sem qualquer modificação dos veículos atuais, e seus motores (Atsumi et al., 2008), possui potencial para atender a necessidade de sistemas de energia verde e sustentável e pode ser transportado através de infraestrutura de tubulações já existente (Li et al., 2014). Quando cepas de *Clostridium*, na forma germinada (não esporulada), são utilizadas para fermentação ABE, vitaminas, minerais, solução tampão e um meio particular influenciam diretamente no rendimento de butanol. Meios de propagação de inóculo e de fermentação são diferentes de acordo com as cepas utilizadas. A maior parte dos meios consiste de extrato de levedura, glicose,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$  e acetato de amônio, dentre alguns microelementos e vitaminas (Li et al., 2014). Cepas de *Clostridium pasteurianum* têm sido estudadas para a produção de butanol e 1,3-PD utilizando o glicerol como fonte de carbono e energia, segundo Moon et al. (2011).

Este trabalho teve como objetivo a avaliação de diferentes meios de cultura para a produção de diferentes metabolitos utilizando o glicerol como fonte de carbono e energia, via rota biológica

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



anaeróbia, em escala de bancada.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização dos experimentos, utilizou-se a linhagem de *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013, estocada e crescida em meio de cultura RCM. O processo ocorreu em batelada durante 10 dias a 37°C. Para isto, foram utilizados Frascos Schott de 250 mL com 100 mL de volume racional, em triplicata. Devido ao pequeno volume reacional e as características de anaerobiose, os ensaios foram conduzidos sem agitação. Para garantir a anaerobiose, foi purgado nitrogênio no meio líquido por 1 min.

Os meios de cultura utilizados para os experimentos foram de acordo com Kao et al. (2013) meio A, Gallardo et al. (2014) meio B, Daria et al. (2014) meio C, Gallazi et al. (2015) meio D, Collin et al. (2000) meio E, e o meio RCM, meio F, cujas composições são mostradas nas Tabelas 1 e 2. Após o fim do experimento, os metabólitos foram quantificados por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) usando a coluna HPX-87H, temperatura do forno de 65 °C, ácido sulfúrico 0,005 mM em água MiliQ como fase móvel e uma vazão de 0,6 mL/min usando-se o índice de refração como detecção. A biomassa celular foi determinada por espectrofotometria onde a ABS foi correlacionada com massa seca (g/L).

Tabela 1 – Composição química dos meios de cultura

Componentes	Composição (g/L)					
	A	B	C	D	E	F
Glicerol bruto	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	-
Glicose	-	-	-	-	-	5,0
Acetato de sódio	-	-	-	3,0	-	3,0
Ágar	-	-	-	-	-	0,5
Amido solúvel	-	-	-	-	-	1,0
Cisteína	0,5	0,5	-	-	0,12	0,5
Extrato de carne	-	-	-	10,0	-	10,0
Extrato de levedura	4,0	1,0	-	3,0	2,0	3,0
Peptona	-	-	-	-	-	10,0
Triptona	-	-	-	10,0	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .SO <sub>4</sub>	-	-	1,23	-	2,0	-
CaCl <sub>2</sub>	-	-	-	-	0,002	-
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	0,02	0,01	-	-	-
CoCl <sub>2</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,25x10 <sup>-4</sup>	-	-	-	-	-
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,005	-	-	-	-	-
FeCl <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	-	0,01	-	-	-
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,5x10 <sup>-6</sup>	-	-	-	0,005	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,125	0,5	0,26	-	-	-

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	-	-	-	-	3,4	-
$KH_2PO_4$	-	0,5	0,02	-	1,3	-
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,1	-	-	-	-	-
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	-	-	0,1	-	0,2	-
$MnSO_4 \cdot 6H_2O$	0,1	-	-	-	-	-
NaCl	-	0,01	-	5,0	-	5,0
$NH_4Cl$	-	3,0	-	-	-	-
Solução ácida	-	1,0 mL/L	-	-	-	-
Solução básica	-	1,0 mL/L	-	-	-	-
Solução mineral	-	-	-	-	40,0mL/L	-

Tabela 2– Soluções específicas para os meios B e E

Componente	Composição (g/L)		
	Solução ácida	Solução básica	Solução mineral
EDTA	-	-	5,0
$CoCl_2$	0,06	-	-
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	-	-	0,005
$FeCl_2$	0,94	-	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	-	-	1,0
HCl	1,8	-	-
$MnCl_2$	0,06	-	-
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	-	-	0,03
NaOH	-	0,4	-
$Na_2MoO_4$	-	0,02	0,03
$NiCl_2$	0,01	-	-
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	-	-	0,036
$ZnCl_2$	0,06	-	-
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	-	-	0,2

### 3. RESULTADOS E DICUSSÃO

Nas Figuras de 1 a 3 são apresentadas as concentrações de biomassa celular e metabólitos após o término dos experimentos realizados com diferentes meios de cultura e usando glicerol como única fonte de carbono e energia.

Figura 1– Concentrações de biomassa celular nos ensaios em diferentes meios de cultura

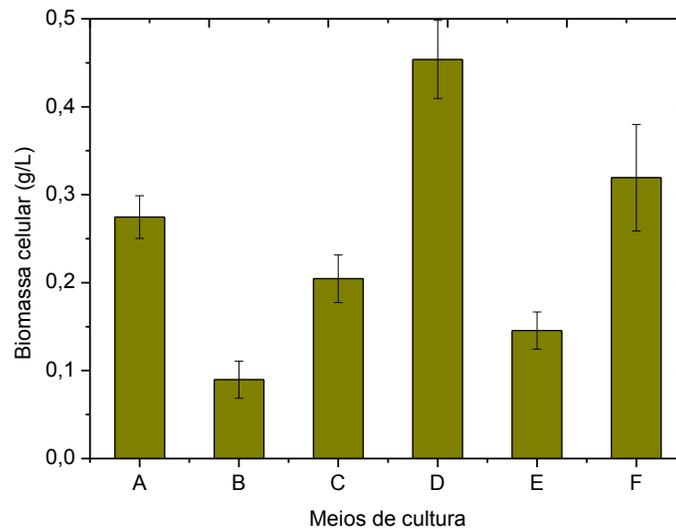


Figura 2– Concentrações de ácidos orgânicos nos ensaios em diferentes meios de cultura

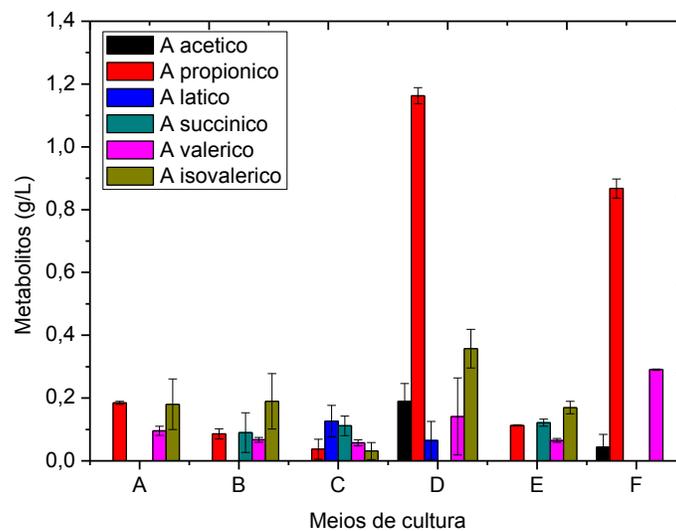
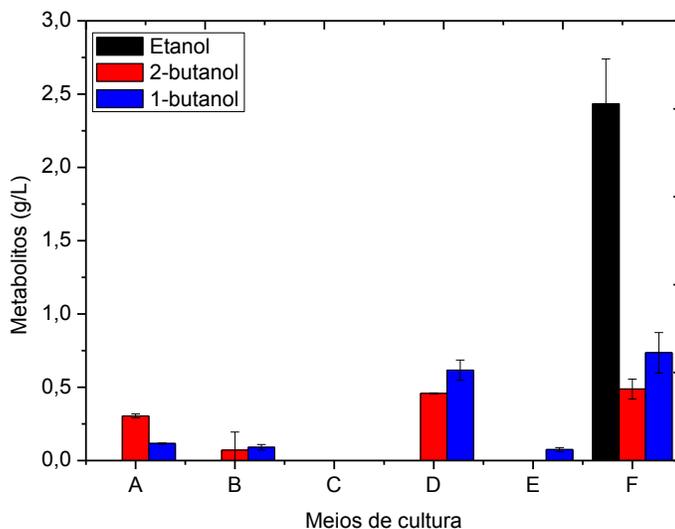


Figura 3–Concentrações de álcoois nos ensaios em diferentes meios de cultura



Pela Figura 1 pode-se observar uma baixa produção de biomassa celular, onde parte é causada pela baixa produção de ATP, uma característica dos processos anaeróbios, e parte causada por carência de nutrientes, não adaptação à fonte de carbono (glicerol) e por inibição pelos metabólitos formados. O Meio D foi o que apresentou maior produção de biomassa celular, meio que contém extrato de carne e extrato de levedura, componentes complexos em termos de nutrientes.

Pode-se observar uma produção máxima de ácido propiônico no Meio D e uma produção um pouco menor no meio F, os mesmos meios que se obteve a maior produção de biomassa celular. Nos ensaios não foram detectados a produção de 1,3-propanodiol. Provavelmente, devido ao número de carbonos (3), a produção de 1,3-PD e ácido propiônico sejam concorrentes dentro da célula e nestes estudos as rotas para produção de ácido propiônico foram ativadas pelos nutrientes contidos no meio.

Os valores de ácidos foram bem variados para os diferentes meios de cultura, uma característica dos processos anaeróbios. O ácido láctico foi encontrado em maior concentração no meio C, o ácido succínico foi encontrado em maior quantidade nos meios C e E. No meio D obteve-se a maior produção de ácido acético e ácido isovalérico. No meio F foi onde obteve-se a maior quantidade de ácido valérico.

O ácido capríco pode ser produzido metabolicamente através de um processo de alongamento de cadeia partindo do ácido acético a ácido butírico e depois formando ácido capríco. Entretanto, não foram detectados os ácidos butírico e capríco nos processos aqui estudados.

Pelos resultados de álcoois pode-se observar uma maior produção de 1 e 2-butanol para os meios D e F que são meios que contêm extrato de carne e extrato de levedura, componentes complexos em termos de nutrientes. Este resultado mostra que para a produção de butanol, deve-se conhecer melhor os nutrientes adicionados ao meio, em relação ao tipo e sua concentração.



XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

A única produção de etanol foi observada no meio F, e para a produção de solventes, não foi detectado a produção de acetona. A produção de acetona é concorrente da produção de butanol e nestes estudos foi produzido butanol e não acetona.

## 4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados pode-se concluir que as rotas metabólicas dos processos anaeróbios foram fortemente influenciadas pelos nutrientes adicionados nos meios de cultura, e suas concentrações. Para cada meio de cultivo foi produzido um metabólito específico em maior concentração. Portanto, para a produção de um metabólito específico, em um processo anaeróbio, deve-se fazer um estudo minucioso dos componentes do meio de cultura como primeira etapa para elaboração de um novo processo biológico.

## 5. REFERÊNCIAS

ANP. [RESOLUÇÃO ANP Nº 50](#), de 23 de dezembro de 2013. Visitado em 30 de Agosto de 2015.

ATSUMI, S.; CANN, A. F.; CONNOR, M. R.; SHEN, C. R.; SMITH, K. M.; BRYNILDSEN, M. P.; CHOU, K. J.; HANAI, T.; LIAO, J. C. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab Eng.*, v. 10, p. 305-11, 2008.

BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* – batch and continuous culture studies. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 27, p. 18–26, 2001.

COLIN, T.; BORIES, A.; MOULIN, C. Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 54, p. 201-205, 2000.

Du, T. F.; He, A. Y.; Wu, H.; Butanol production from acid hydrolyzed corn fiber with *Clostridium beijerinckii* mutant. *Bioresour Technol*, v. 135, p. 254–261, 2013.

EZEJI, T. C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Butanol fermentation research: upstream and downstream manipulations. *The Chemical Record*, v. 4, p. 305-314, 2004.

EZEJI, T.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnol Bioengineering*, v. 97, p. 1460-1469, 2007.

GALLARDO, R.; ALVES, M.; RODRIGUES, L. R. Modulation of crude glycerol fermentation by *Clostridium pasteurianum* DSM 525 towards the production of butanol. *Biomass and Bioenergy*, v. 71, p. 134-143, 2014.

GALLAZI, A.; BRANSKA, B.; MARINELLI, F.; PATAKOVA, P. Continuous production of n-butanol by *Clostridium pasteurianum* DSM525 using suspended and surface-immobilized cells. *Journal of Biotechnology*, v. 216, p. 29-35, 2015.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal Bioscience Bioengineering*, v. 100, p. 260-265, 2005.

JARVIS, G.N.; MOORE, E.R.B.; THIELE, J.H. Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. *J. Appl Microbiol.*, v. 83, p. 166-174, 1997.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

- JONES, D. T.; WOODS, D. R. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*, v. 50, p. 484-524, 1986.
- JUN, S.A.; MOON, C.; KANG, C.H.; KONG, S.; SANG, B.I.; UM, Y. Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol using raw glycerol with suspended and immobilized *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Biochem Biotechnol.*, v. 161, p. 491-501, 2010.
- KAO, W. C.; LIN, D. S.; CHENG, C. L.; CHEN, B. Y.; LIN, C. Y.; CHANG, J. S. Enhancing butanol production with *Clostridium pasteurianum* CH4 using sequential glucose-glycerol addition and simultaneous dual-substrate cultivation strategies. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 324-330, 2013.
- LEE, P. C.; LEE, W. G.; LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. *Biotechnol. Bioeng.*, v.72, p.41-48, 2001.
- LI, J.; BARAL, N. R.; JHA, A. K. Acetone-butanol-ethanol fermentation of corn stover By *Clostridium* species: present status and future perspectives. *World J. Microbiol Biotechnol*, v. 30, p.1145-1157, 2014.
- MOON, C.; LEE, C. H.; SANG, B. I.; UM, Y. Optimization of medium compositions favoring butanol and 1,3-propanediol production from glycerol by *Clostridium pasteurianum*. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 10561-10568, 2011.
- NI, Y.; SUN, Z. Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 83, p. 415-423, 2009.
- O'CONNOR, D. Biodiesel GHG emissions, past, present, and future. *A report to IEA Bioenergy Task 39*, 2011.
- POWAŁOWSKA, D. S. 1,3-Propanediol production from crude glycerol by *Clostridium butyricum* DSP1 in repeated batch. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 17, p. 322-328, 2014.
- SALEMBO, P. A.; PEREZ, J. M.; LLOYD, W. A.; LOGAN, B. E. Enhanced Hydrogen and 1,3-Propanediol Production From Glycerol by Fermentation Using Mixed Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 104, p. 1098-1116, 2009.
- SKOROKHODOVA, A. Y.; MORZHAKOVA, A. A.; GULEVICH, A. Y.; DEBABOV, V. G. Manipulating pyruvate to acetyl-CoA conversion in *Escherichia coli* for anaerobic succinate biosynthesis from glucose with the yield close to the stoichiometric maximum. *Journal of Biotechnology*, v. 214, p. 33-42, 2015.
- TACONI, K. A.; VENKATARAMANAN, K. P.; JOHNSON, D. T. Growth and solvent production by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 utilizing biodiesel-derived crude glycerol as the sole carbon source. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, v.28, n.1, 2009.
- WASEWAR, K. L.; SHENDE, D. Z. Extraction of caproic acid using tri-*n*-butyl phosphate in benzene and toluene at 301 K. *J. Chem. Eng.*, v. 55, p. 4121-4125, 2010.
- 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.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO

