



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

Avaliação do metabolismo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC e DSMZ na presença de gás de síntese

Roberta dos Reis Ribeiro¹, Tatiana Felix Ferreira² e Priscilla F. Fonseca Amaral¹

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro – Escola de Química - Departamento de Engenharia Bioquímica
Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Lab E-123 - CEP 21941-909 Rio de Janeiro - RJ - E-mail:
(robertadosreisribeiro@gmail.com)

²Universidade Federal do Rio de Janeiro – Escola de Química - Departamento de Processos Orgânicos
Av. Athos da Silveira Ramos, 149, E-208 - CEP 21941-909 Rio de Janeiro - RJ

RESUMO

No Brasil o etanol é produzido através da fermentação do caldo de cana-de-açúcar por leveduras do gênero *Saccharomyces*. Entretanto, essa produção não é suficiente para suprir a demanda desse combustível no mercado brasileiro e rotas alternativas para produção de etanol têm sido estudadas, dentre elas destaca-se a fermentação de gás de síntese, que pode ser gerado a partir de pirólise de resíduos urbanos. Algumas espécies de bactérias acetogênicas são conhecidas como fermentadoras desse gás, sendo capazes de convertê-lo em etanol, butanol e ácido butírico. O presente trabalho visa a biossíntese de etanol a partir de gás de síntese utilizando *Clostridium carboxidivorans*. Nos experimentos de batelada simples obteve-se melhor crescimento celular e maior produção de etanol (0,196 g/L) em meio ATCC2713, valor próximo ao encontrado na batelada alimentada (0,164 g/L).

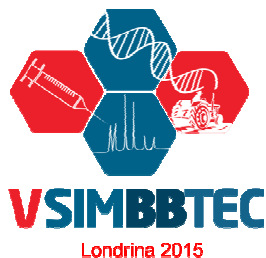
Palavras-chave: Etanol, gás de síntese e bactérias acetogênicas.

INTRODUÇÃO

O etanol pode ser obtido principalmente por duas rotas: química e fermentativa. Na rota química, obtém-se o etanol a partir de hidrocarbonetos insaturados, como eteno e etino, de gases de petróleo e da hulha e por Fischer-Tropsch (FT). Na rota fermentativa os açúcares fermentescíveis são convertidos em etanol e dióxido de carbono pela ação de leveduras.

Atualmente, uma rota híbrida vem sendo estudada: a obtenção de gás de síntese através da pirólise de matéria orgânica, seguida por sua fermentação a etanol. Esta via é considerada muito atrativa uma vez que quando comparada aos processos químicos e de etanol 2G já desenvolvidos, tem como vantagens a utilização de toda a composição da biomassa, incluindo a lignina; a eliminação do complexo processo de pré-tratamento da biomassa e os custos de enzimas; a alta especificidade do biocatalizador; a independência da razão $H_2:CO$ para a bioconversão; a esterilização da fermentação utilizando as altas temperaturas do processo de geração de gás de síntese; a operação em condições ambientais; e contorna o problema de envenenamento de catalisadores, uma vez que utiliza bactérias acetogênicas (Munasinghe, 2010).

Essas bactérias chamadas acetogênicas são obrigatoriamente anaeróbias e capazes de assimilar vários substratos como monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrogênio, metanol e também ácidos graxos. Algumas espécies têm sido relatadas na literatura como capazes de realizar essa bioconversão, entre elas *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium*



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

autoethanogenum, *Eubacterium limosum*, *Clostridium* sp. Strain P11 (*Clostridium ragsdalei*), *Alkalibaculum bacchi* e *Clostridium carboxidivorans* (Wilkins, 2011; Mohammadi, 2011).

O presente trabalho visa a produção de etanol a partir de gás de síntese por rota biotecnológica utilizando cepa da espécie *Clostridium carboxidivorans*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Gás de Síntese: O gás utilizado no presente trabalho foi adquirido da empresa de gases White Martins e possui composição: 40% H₂, 25% CO, 10% CO₂, 10% N₂ e 11% CH₄.

Micro-organismo: A cepa utilizada no presente trabalho foi *Clostridium carboxidivorans* DSM 15243, adquirida da empresa alemã DSMZ.

Meios de crescimento: Os meios testados nos experimentos foram os meios ATCC 2713, DSMZ 879 e meio contendo apenas peptona a 10 g/L. Os gases testados foram o gás de síntese e o nitrogênio (controle).

Meio DSMZ 879: Para 1 litro de solução foram utilizados os seguintes reagentes: NH₄Cl (1 g), KCl (0,1 g), MgSO₄·7 H₂O (0,2 g), NaCl (0,8 g), KH₂PO₄ (0,1 g), CaCl₂·2H₂O (0,02 g), extrato de levedura (1 g), Na₂WO₄·2H₂O (0,2 mg), NaHCO₃ (1 g), frutose (5 g), HCl de cisteína (0,3 g), Na₂S·9H₂O (0,3 g), 10 mL de solução de elementos traços e 10 mL de solução de vitaminas, ao final do preparo a solução teve o seu pH ajustado para 5,9. A solução de vitaminas é composta por uma mistura dos seguintes vitaminas para 1 litro de solução: biotina (2 mg), ácido fólico (2 mg), piridoxina-HCl (10 mg), tiamina-HCl·2H₂O (5 mg), riboflavina (5 mg), ácido nicotínico (5 mg), d-(+)-pantotenato de cálcio (5 mg), vitamina B12 (0,1 mg), ácido p-aminobenzoico (5 mg) e ácido lipóico (5 mg). A solução de elementos traços é composta por uma mistura dos seguintes compostos para 1 litro de solução: ácido nitriloacético (1,5 g), MgSO₄·7H₂O (3 g), MnSO₄·H₂O (0,5 g), NaCl (1 g), Fe(SO₄)₂·7H₂O (0,1 g), CoSO₄·7H₂O (0,18 g), CaCl₂·2H₂O (0,1 g), ZnSO₄·7H₂O (0,18 g), CuSO₄·5H₂O (0,01 g), KAl(SO₄)₂·12H₂O (0,02 g), H₃BO₃ (0,01 g), Na₂MoO₄·2H₂O (0,01 g), NiCl₂·6 H₂O (0,03 g), Na₂SeO₃·5H₂O (0,3 mg).

Meio ATCC 2713: Para 1 litro de solução foram utilizados os seguintes reagentes: triptona (10,0 g), peptona de gelatina (10,0 g), extrato de levedura (5,0 g), glicose (1,0 g), cloreto de sódio (5,0 g), L-Arginina (1,0 g), piruvato de sódio (1,0 g), menadiona (0,0005 g), Hemina (0,005 g), após o preparo da solução o pH do meio foi ajustado para 7,1.

Produção de etanol: O pré-inóculo foi preparado em meio de cultivo ATCC 2713 e com adição de gás de síntese. Estes foram inoculados com células conservadas na geladeira (4°C) em meio ATCC 2713 em frascos de soro, incubados em shaker a 150 rpm e 37°C por 24 horas.

Os experimentos foram realizados em frascos de soro de 65 ml, com 50 ml de meio de cultivo. Cinco mL de pré-inóculo era transferido para os frascos contendo o meio de cultivo e a cada 12 h eram um frasco era retirado para amostragem da fase líquida para análise de etanol, co-produtos e pH. Nos experimentos utilizando frascos Schott, todo o conteúdo dos frascos do pré-inóculo após 24 horas, foram centrifugados e as células foram transferidas para o frasco, contendo 200 mL de meio, com pH ajustado para 5,0 e em seguida o frasco era então incubado em agitador rotatório a 150 rpm e 37°C com amostragem a cada 12 h. Realizava-se purga de gás de síntese pela entrada do frasco a cada 12 h.

Quantificação celular: A concentração celular foi medida através de densidade óptica a 600 nm e esses valores foram convertidos para mg de peso seco de células/ mL utilizando-se o fator de conversão obtido pela curva de peso seco.

Quantificação de etanol e co-produtos: As análises para quantificar a produção de etanol e alguns possíveis co-produtos, foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters®) em coluna Aminex® HPX- 87H, 300 x 7,8mm (Bio-Rad Laboratories Ltd) e detector de índice de refração.

Análise de pH: O pH dos meios de cultivos foram analisados em pHmetro Marte MB10.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para os experimentos utilizando frascos de soro e frascos Schott com os meios ATCC 2713 e DSMZ 879.

A Tabela 1 - Resultados obtidos para os experimentos realizados em frasco de soro e em frasco SCHOTT em frasco de soro e frasco Schott.

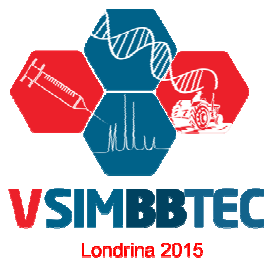
Gás	Meio	pH inicial	pH final	ΔX (g p.s. cél/L)	P_{ETANOL} (g/L)	Q_{ETANOL} (g/L.h)	P_{AC} (g/L)	Q_{AC} (g/L.h)
Batelada Simples								
GS	ATCC	7,2	6,2	0,55	0,196	0,007	1,02	0,037
N ₂	ATCC	7,3	6,2	0,24	0,347	0,007	1,363	0,074
GS	DSMZ	6,6	4,0	0,30	0,12	0,003	0,09	0,009
N ₂	DSMZ	6,8	4,4	0,42	0,098	0,005	0,727	0,011
GS	Simples	6,5	5,7	0,15	0	0	0,374	0,007
Batelada Alimentada (alimentação de gás) – Frasco Schott								
GS	ATCC	5,4	6,8	0,55	0,164	0,009	1,9	0,042
GS	DSMZ	6,1	3,8	0,93	0,054	0,002	1,657	0,008

GS: Gás de síntese

Meios: ATCC 2713; DSMZ 879; Simples: peptona 10 g/L; ΔX : variação máxima da concentração de células ($X_{max} - X_{inicial}$); P_{ETANOL} ; P_{AC} ; P_{AB} : concentração máxima de produto ou subproduto (Etanol, AC: ácido acético; AB: ácido butírico); Q_{ETANOL} Q_{AC} Q_{AB} : produtividade volumétrica máxima para o produto ou subproduto (Etanol, AC: ácido acético; AB: ácido butírico);

No experimento realizado com meio ATCC 2713 e N₂, a produção de biomassa foi menor (ΔX , Tabela 1) comparada ao experimento com gás de síntese, provavelmente devido a menor oferta de fonte de carbono. *C. carboxidivorans* apresenta uma fase acidogênica que culmina com uma redução do pH, seguida por uma fase solventogênica, quando é possível se observar o aumento do pH (Ukpong et al., 2012).

A peptona, presente no meio ATCC, quando degradada pode gerar amônia, o que pode estar relacionado a pequena variação de pH nos experimentos de batelada simples em meio ATCC 2713 ($\Delta pH \approx 1,0$). Contudo em meio DSMZ, a produção de ácidos orgânicos permitiu uma redução maior do pH ($\Delta pH \approx 2,4$), que pode ter influenciado o crescimento celular em comparação com o meio ATCC com gás de síntese (Tabela 1). No meio DSMZ foi possível produzir etanol e ácido acético. Entretanto a produção e produtividade desses metabólitos foram inferiores comparados ao meio ATCC 2713. Mohammadi *et al.* (2011) utilizaram o meio DSMZ e gás de síntese para o cultivo de *C. ljundghalii* e os ensaios produziram etanol em uma faixa



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

de 2 a 4 mg/L. No presente trabalho foi possível obter uma produção de etanol mais elevada utilizando *C. carboxidivorans* em meio não pressurizado (Tabela 1).

Verifica-se de acordo com a Tabela 1 que o micro-organismo cresceu na ausência de gás de síntese, indicando que os micro-organismos utilizaram como fonte de carbono o meio de residual do inoculo (ATCC 2713). Comparando-se os meios DSMZ e ATCC na ausência de gás de síntese, verifica-se que o meio DSMZ foi mais eficiente para o crescimento celular da cepa utilizada no presente trabalho. Isso provavelmente se deve à maior quantidade de vitaminas do meio DSMZ.

No meio contendo 10 g/L de peptona e gás de síntese, a redução do pH ($\Delta\text{pH} = 0,8$) foi similar à encontrada no meio ATCC e inferior ao meio DSMZ, entretanto não houve produção de etanol e a produção de células foi menor (ΔX , Tabela 1) quando comparada com os cultivos em meio ATCC ou DSMZ. Isso provavelmente se deve a falta de algumas vitaminas e substâncias redutoras dos meios mais complexos.

Nos experimentos de batelada alimentada em meio ATCC 2713 o crescimento celular foi crescente ao longo das 200 h de cultivo, atingindo uma produção de células de 0,55 g/L, similar ao obtido no experimento de batelada simples. Entretanto a alimentação de gás de síntese na batelada alimentada viabilizou a produção de ácido butírico (0,283 g/L). Além disso, a produção de ácido acético foi a maior encontrada, como apresentada na Tabela 1. Na batelada alimentada em meio DSMZ 879 o crescimento celular foi aproximadamente 2 vezes maior comparado ao meio ATCC e o crescimento celular foi acompanhado pela redução do pH, chegando a valores próximos aos encontrados nos demais experimentos realizados com meio DSMZ. Contudo, a produção de etanol foi 3 vezes menor que em meio ATCC 2713 (Tabela 1).

CONCLUSÕES

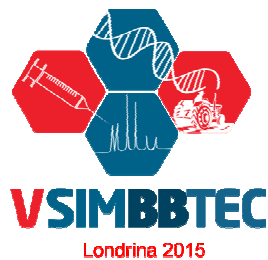
A cepa *Clostridium carboxidivorans* DSM 15243 apresentou crescimento celular em meio ATCC 2713 e DSMZ 979 na presença ou ausência de gás de síntese e na ausência de gás de síntese houve melhor crescimento celular em meio ATCC do que em meio DSMZ. As produções de etanol e de ácido acético foram maiores em meio ATCC (0,196 e 1,363 g/L) respectivamente.

O metabolismo de *C. carboxidivorans* está ativo em um meio simples, contendo apenas peptona e gás de síntese, mas outros componentes são necessários para que a produção de etanol seja possível. A alimentação intermitente de gás de síntese ao longo do cultivo aumentou a produção de ácido acético e também viabilizou a via de produção de ácido butírico.

Agência de Fomento: Capes, CNPq e FAPERJ.

REFERÊNCIAS

- Munasinghe, P.C., Khanal, S.K. **Syngas fermentation to biofuel: evaluation of monoxide mass transfer coefficient (K_{La}) in different reactor configurations.** Biotechnol. V.26, 1616-1621, 2010.
- Mohammadi, M., Najafpour, G.D., Younesi, H., Lahijani, P., Uzir, M.H., Mohamed, A.R. **Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: a review.** Renew. Sust. Energ. Rev., v.15, 4255-4273, 2011.
- Ukpong, M.N.; Atiyedh, H.K.; De Lorme, J.M.; Liu, K.; Zhu, X.; Tanner, R.S.; Wilkins, M.K.; Stevenson, B.S. **Physiological response of Clostridium carboxidivorans during conversion of synthesis gas to solvents in a gas-fed bioreactor.** Biotechnology and Bioengineering, V. 109, Nº11, 2012.
- Wilkins, M.R.; Atiyeh, H. K., **Microbial production of ethanol from carbon monoxide.** Current Opinion in Biotechnology, v.22, 326-330, 2011.



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR