

ESTUDO CINÉTICO DO CRESCIMENTO DO *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM* ATCC 4259 UTILIZANDO GLICEROL P.A. COMO SUBSTRATO

C. E. de O. LACERDA¹, G. M. VINHAS¹, Y. M. B. de ALMEIDA¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: carlos.olacerda@hotmail.com

RESUMO – A glicerina, subproduto da produção de biodiesel, vem sendo investigada como fonte de carbono em processos microbianos para a obtenção de bioprodutos com alto valor agregado. A avaliação do crescimento do micro-organismo responsável por essa bioconversão é uma importante etapa desse processo. O presente trabalho consistiu em avaliar a cinética de crescimento do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 através de uma fermentação em batelada utilizando glicerol P.A. como fonte de carbono. A técnica de peso seco foi utilizada para o cálculo da concentração do micro-organismo presente no meio de cultura após a fermentação. A cinética microbiana mostrou que, para as condições experimentais da pesquisa, a fase exponencial de crescimento ocorreu até o tempo de 14 horas, e uma produtividade celular (P) de 0,0405 g/L.h, uma velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de 0,0403 h⁻¹ e um tempo de geração (G) de 15,7 h foram alcançados.

1. INTRODUÇÃO

O biodiesel é um combustível renovável, biodegradável e não tóxico. Pode ser definido como sendo um mono-álquil éster de ácidos graxos derivados de fontes renováveis (óleos vegetais e gordura animal) com álcool na presença de um catalisador, obtido através de um processo de transesterificação, no qual ocorre a transformação de triglicerídeos em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos e tendo como subproduto principal, a glicerina (glicerol mais impurezas) (Fukuda *et al.*, 2009; Leoneti *et al.*, 2012).

Nos primeiros anos de produção do biodiesel, a alta percentagem de glicerina obtida era considerada como um aspecto positivo, e com sua venda, o aumento da competitividade econômica global da fabricação de biodiesel parecia seguro, uma vez que a glicerina gerada na produção corresponde a aproximadamente 10 % do volume total de biodiesel produzido (Yazdani & Gonzalez, 2007). Em 2010, a produção de biodiesel no Brasil foi de aproximadamente 2,4 bilhões de litros, o que gerou aproximadamente 240 milhões de litros de glicerina (Leoneti *et al.*, 2012).

O acúmulo da oferta ocasionado pelo crescimento das indústrias de biocombustíveis e a quantidade de impurezas encontradas na glicerina bruta, fizeram com que seu preço diminuísse com o passar dos anos (Yazdani & Gonzalez, 2007; Asad-Ur-Rehman *et al.*, 2008). Desta forma, essa glicerina oriunda da produção de biodiesel passou de um produto apreciado a um problema de eliminação de resíduo, e existe um grande interesse em sua

purificação ou no seu reaproveitamento direto sem tratamento, proporcionando ao processo de produção de biodiesel maior competitividade e valorização crescente no mercado de biocombustíveis (Kaur *et al.*, 2012; Clomburg *et al.*, 2013).

Sendo assim, a glicerina bruta não purificada ou com purificação parcial vem sendo investigada como fonte de carbono em processos microbianos para obtenção de bioprodutos de alto valor agregado como 1,3-propanodiol, etanol, butanol, acetona, ácido acético, ácido butírico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido lático, ácido succínico, CO₂ e H₂. (Anand *et al.*, 2011; Clomburg *et al.*, 2013).

O estudo cinético do crescimento do micro-organismo responsável por essa bioconversão é uma importante etapa para compreender todo o mecanismo e otimizar o processo de fermentação. (Sun *et al.*, 2008). A formação de biomassa no processo fermentativo depende de duas moléculas transportadoras de energia, o NAD⁺ (dinucleotídeo de adenina nicotinamida) e o ATP (adenosina trifosfato) (Kaur *et al.*, 2012).

O crescimento de um micro-organismo está dividido em quatro fases: a fase lag, conhecida também como fase de adaptação, em que nenhum crescimento aparente ocorre, uma vez que as células estão se adaptando ao meio de cultivo; tem-se a fase exponencial, também conhecida como fase logarítmica ou fase log, em que ocorre um aumento exponencial do número de células, atingindo a sua velocidade máxima; a fase estacionária, onde a população atinge seu máximo e constante crescimento; e a fase da morte, onde, devido ao acúmulo de metabólitos e limitação de nutrientes, eventualmente poderá ocorrer um declínio do número de células, característico dessa fase (Bastos, 2010).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a cinética de crescimento do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 através de uma fermentação em batelada utilizando glicerol P.A. como fonte de carbono.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Micro-organismo: O micro-organismo utilizado no trabalho foi o *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259. Essa linhagem foi cedida pela coleção de micro-organismos UFPEDA do Departamento de Antibióticos da UFPE. Foi adquirida em tubos contendo meio RCM (Caldo Clostridial Reforçado) semissólido, e foi mantida em estufa a 37 °C até ser inoculada e/ou repicada.

Soluções Utilizadas: Meio de tioglicolato fluido (marca DIFCO), utilizado para manutenção e crescimento do micro-organismo e solução salina para diluição (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição da solução salina para diluição

Solução A	
KH ₂ PO ₄	34,0 g
Água destilada	1000,0 mL
Solução B	
MgSO ₄ .7H ₂ O	50,0 g
Água destilada	1000,0 mL
Solução Salina	
Solução A	1,25 mL
Solução B	5,0 mL
Água destilada	1000,0 mL

A pré-cultura utilizada para adaptar o micro-organismo aos componentes do meio de cultura para fermentação tem a seguinte composição (Günzel *et al.*, 1991): K₂HPO₄ (3,4 g/L), KH₂PO₄ (1,3 g/L), (NH₄)₂SO₄ (2,0 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,2 g/L), CaCl₂.2H₂O (0,02 g/L), CaCO₃ (2,0 g/L), extrato de levedura (1,0 g/L), glicerol P.A. (20 g/L), solução de elementos traços (1,0 mL/L) (Tabela 2) e solução de ferro (2,0 mL/L) (Tabela 3).

Tabela 2 – Composição da solução de elementos traços

Componentes	
ZnCl ₂	0,070 g/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,100 g/L
H ₃ BO ₃	0,060 g/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,200 g/L
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,020 g/L
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,025 g/L
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,035 g/L
HCl 37%	0,900 mL/L

Tabela 3 – Composição da solução de Ferro

Componentes	
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0 g/L
HCl 37%	4,0 mL/L

A concentração dos nutrientes do meio de cultura para fermentação é igual à concentração dos nutrientes da pré-cultura, com exceção de: K_2HPO_4 (1,0 g/L), KH_2PO_4 (0,5 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (1,0 g/L) e solução de ferro (1,0 mL/L).

2.2. Metodologia Experimental

Preparação dos meios de cultura: Os meios de cultura foram preparados de acordo com as seguintes etapas: os nutrientes de cada meio foram pesados e diluídos em água destilada; após diluição, foram insuflados com gás nitrogênio e aquecidos a $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos; os meios de cultura então foram transferidos para tubos de penicilina e para o frasco biorreator, selados e lacrados; seguiram então para a esterilização em autoclave, a $121\text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Preparo da cinética: Utilizando uma seringa (c/ agulha) estéril, o *C. acetobutylicum* ATCC 4259 foi inoculado em um tubo de penicilina de 100 mL contendo 90 mL de meio de tioglicolato fluido na proporção de 10 % v/v e incubado a $35\text{ }^\circ\text{C}$. Após 24 horas de crescimento o micro-organismo foi inoculado, também na proporção de 10 % v/v, em outro tubo de penicilina de 100 mL contendo 90 mL de pré-cultura. Após as 24 horas, o micro-organismo adaptado na pré-cultura foi inoculado no meio de fermentação para realização da cinética. A cinética foi conduzida em um frasco biorreator de 500 mL, sem controle de pH, temperatura e agitação, contendo 300 mL de meio de cultura para fermentação que foi inoculado com 34 mL de inóculo vindo da pré-cultura (correspondendo a 10 % v/v). O frasco seguiu para a incubadora a $T = 35\text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 h, tempo que durou a fermentação.

Avaliação da biomassa: Para avaliar o crescimento do micro-organismo foi utilizada a técnica do peso seco. Em intervalos de 1 hora, amostras de 10 mL foram retiradas do frasco biorreator e filtradas com o auxílio de um conjunto para filtração em membranas de $2\text{ }\mu\text{m}$ previamente taradas, utilizando água de diluição (Tabela 1) para lavagem. Antes de cada filtração, o frasco foi levemente agitado para homogeneizar o meio e a retirada das amostras foi realizada de maneira estéril, com o auxílio da chama do bico de Bunsen. As membranas permaneceram 2 horas na estufa a $T = 80\text{ }^\circ\text{C}$ para secar o filtrado. A diferença entre o peso inicial da membrana e o peso após a secagem determina a biomassa que cresceu durante a fermentação.

Cálculo dos parâmetros cinéticos: Para calcular os parâmetros importantes da cinética microbiana, têm-se as Equações 1, 2 e 3. A Equação 1 determina a produtividade celular (P) que é a relação entre a variação da concentração celular pela variação do tempo de cultivo englobando todas as fases de crescimento microbiano (Borzani *et al.*, 2001).

$$P = \frac{(X - X_0)}{(t - t_0)} \quad (1)$$

A Equação 2 mostra a velocidade máxima de crescimento do micro-organismo ($\mu_{\text{máx}}$). O intervalo de tempo $t-t_0$ corresponde apenas à fase exponencial de crescimento; X_0 é a

concentração celular no início da fase exponencial de crescimento, enquanto X é a concentração celular no final dessa fase (Bastos, 2010).

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{\ln(X/X_0)}{t-t_0} \quad (2)$$

A Equação 3 mostra o tempo de geração (G), ou seja, o tempo que o micro-organismo leva para duplicar a sua biomassa. O tempo de geração também é calculado apenas na fase exponencial de crescimento. Esse parâmetro é importante na interpretação do crescimento celular, uma vez que dá uma ideia mais prática de quão rápido ocorre o crescimento do micro-organismo (Bastos, 2010).

$$G = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (3)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Resultados da cinética microbiana

Os resultados da cinética microbiana encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Construção da curva de crescimento por peso seco

Tempo (h)	Concentração (g/L)	Tempo (h)	Concentração (g/L)
1	0,92	11	1,37
2	0,88	12	0,20
3	1,18	13	1,22
4	0,16	14	1,60
5	1,25	15	1,49
6	1,37	16	1,45
7	0,14	17	1,43
8	1,31	18	1,61
9	1,51	19	1,66
10	1,18	20	1,69

Com os valores encontrados na Tabela 4, foi calculada a produtividade celular $P = 0,0405$ g/L.h. Esse valor representa diretamente o crescimento celular em g/L a cada hora de experimento. Na Figura 1 encontra-se a regressão quadrática do crescimento celular em função do tempo.

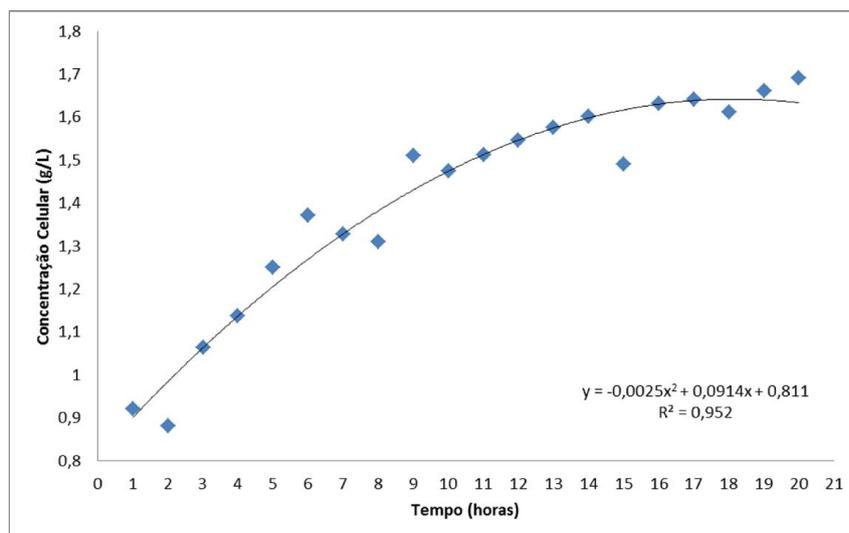


Figura 1 – Crescimento celular ajustado

Inicialmente observa-se através da Figura 1 que a fase lag de crescimento não é visualizada, o que mostra que o *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 se adaptou bem ao meio de cultura. Pode-se identificar a fase de crescimento exponencial para as nossas condições experimentais. Essa fase exponencial ocorre até o ponto de 14 horas. Além disso, temos a fase estacionária de crescimento a partir de 14 horas.

Podemos encontrar a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) através da Equação 2, calculando o logaritmo neperiano de X/X_0 e construindo o gráfico da Figura 2. Na Tabela 5 encontram-se os resultados desses cálculos.

Tabela 5 – Valores de $\ln(X/X_0)$ para cálculo da velocidade máxima de crescimento

Tempo (h)	X (g/L)	$\ln(X/X_0)$	Tempo (h)	X (g/L)	$\ln(X/X_0)$
1	0,92	0	8	1,31	0,353409
2	0,88	-0,04445	9	1,51	0,495491
3	1,06	0,141651	10	1,47	0,468644
4	1,14	0,21441	11	1,51	0,495491
5	1,25	0,306525	12	1,55	0,521637
6	1,37	0,398192	13	1,57	0,534457
7	1,33	0,368561	14	1,60	0,553385

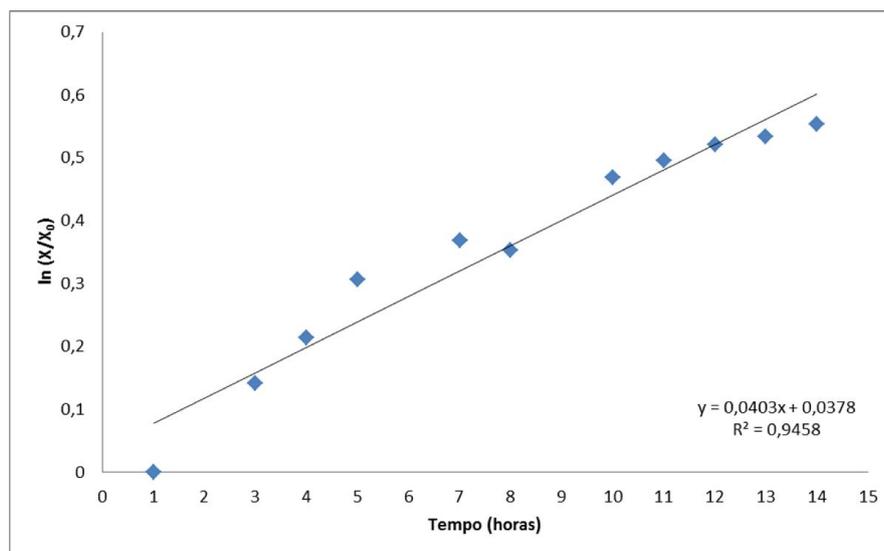


Figura 2 – Caracterização do $\mu_{\text{máx}}$ para o experimento

O coeficiente angular da equação da reta do gráfico da Figura 2 representa a velocidade máxima de crescimento celular, portanto $\mu_{\text{máx}} = 0,0403 \text{ h}^{-1}$.

De posse do valor da velocidade máxima, podemos calcular G, o tempo de geração, através da Equação 3. Então, temos que $G = 15,7 \text{ h}$. Esse valor representa o tempo necessário para que o micro-organismo duplique a sua biomassa. Então, quanto menor o valor de G, mais rápido é o crescimento.

4. CONCLUSÕES

As condições operacionais para manutenção e crescimento do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 foram alcançadas, produzindo inóculos com boa viabilidade e respostas satisfatórias para o crescimento do micro-organismo utilizando glicerol P.A. como principal fonte de carbono em um processo descontínuo.

Foi possível observar que o *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 alcançou o fim da fase exponencial de crescimento em 14 horas de fermentação. Então, estudando apenas essa fase, dados cinéticos que caracterizam o crescimento do micro-organismo foram coletados. Os dados serviram para compreender o seu comportamento diante do meio de cultura próprio para a produção de 1,3-propanodiol.

O primeiro dado importante foi o tempo de geração ($G = 15,7 \text{ horas}$). Através desse valor conclui-se que o *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 leva aproximadamente toda a fase exponencial de crescimento para duplicar a sua biomassa. Fato esse que pôde ser observado também pela baixa velocidade de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}} = 0,0403 \text{ h}^{-1}$), característica do gênero *Clostridium*.

5. REFERÊNCIAS

- ANAND, P.; SAXENA, R. K.; MARWAH, R. G. A novel downstream process for 1,3-propanediol from glycerol-based fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 90, n. 4, p. 1267-1276, 2011.
- ASAD-UR-REHMAN; MATSUMURA, M.; NOMURA, N.; SATO, S. Growth and 1,3-propanediol production on pre-treated sunflower oil biodiesel raw glycerol using a strict anaerobe *Clostridium butyricum*. *Curr. Res. Bacteriol.*, v. 1, n. 1, p. 7-16, 2008.
- BASTOS, R. G. *Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos*. São Carlos: EdUFSCar, 2010.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial*. Volume 2, São Paulo: Edgar Bülcher, 2001.
- CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. *Trends Biotechnol.*, v. 31, p. 20-28, 2013.
- FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. *Biochem. Eng. J.*, v. 44, p. 2-12, 2009.
- GÜNZEL B.; YONSEL, S.; DECKWER, W. D. Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2m³. *Appl. Microbiol.*, v. 36, p. 289-294, 1991.
- KAUR, G.; SRIVASTAVA, A. K.; CHAND, S. Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. *Biochem. Eng. J.*, v. 64, p.106-118, 2012.
- LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; DE OLIVEIRA, S. V. W. B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renew. Energ.*, v. 45, p. 138-145, 2012.
- SUN, Q. Y.; QI, T. W.; TENG, H.; XIU, L. Z.; ZENG, P. A. Mathematical modeling of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumonia*: concerning enzyme-catalytic reductive pathway and transport of glycerol and 1,3-propanediol across cell membrane. *Biochem. Eng. J.*, v. 38, p. 22-32, 2008.
- YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotech.*, v. 18, p. 213-219, 2007.