

PRODUÇÃO DE ÁCIDO BUTÍRICO POR *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* A PARTIR DE GLICERINA

A. S. TAVARES¹, F. F. MARTINS², M. A. Z. COELHO³, T. F. FERREIRA⁴

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica

² Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica

³ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica

⁴ Instituto Federal do Rio de Janeiro, Campus Rio de Janeiro

E-mail para contato: tatiana.ferreira@ifrj.edu.br

RESUMO – O ácido butírico, de suma importância para a indústria química e alimentícia, é produzido pela oxidação de butiraldeído por oxossíntese. A bactéria *Clostridium butyricum* é anaeróbica e metaboliza matéria orgânica, como a glicerina, que é produzida como um subproduto do biodiesel. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar a síntese de ácido butírico por *C. butyricum* a partir glicerina bruta. As células foram inoculadas em frascos de vidro do tipo SCHOOT®, com 200 mL de meio de cultivo, em agitador rotatório a 37°C e 250 rpm por 16 horas. Seguiu-se, então para um biorreator, em condições anaeróbicas, a 200 rpm e 30 horas com controle de temperatura e pH. A análise do consumo de glicerol e dos produtos formados foi realizada através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Praticamente todo glicerol (15,65 g.L⁻¹) foi consumido em 6 horas, ocorrendo produção de 1,3-propanodiol (PDO) (16,18 g.L⁻¹) e de ácido butírico (4,69 g.L⁻¹). Assim, a glicerina mostrou-se um substrato promissor para produção de ácido butírico.

1. INTRODUÇÃO

O elevado consumo de combustíveis fósseis aliado à crise energética mundial reforçam a procura por alternativas que pudessem suprir a alta demanda do mercado e que estejam dentro dos padrões exigidos pelos órgãos ambientais. Nesse sentido, os bioprocessos encontram-se em destaque, pois utilizam-se de matéria-prima renovável para a obtenção de produtos que já são sintetizados por via química, com pouca formação de co-produtos indesejáveis.

As bactérias do gênero *Clostridium* são anaeróbicas, metabolizam desde fontes simples de carbono, como CO e CO₂, fontes mais complexas, como carboidratos e gorduras, produzindo intermediários importantes industrialmente, como o 1,3-propanodiol (PDO), dihidróxiacetona, ácido succínico, ácido propiônico, ácido cítrico, etanol e biosurfactantes (Jang *et al.*, 2012). As cepas de *C. butyricum* são geralmente reportadas pela produção de PDO a partir de glicerol como substrato. Além disso, o micro-organismo apresenta-se como promissor na síntese de ácido butírico.

O ácido butírico, ou ácido butanóico, está presente na manteiga rançosa e, por isso, é

responsável pelo odor e sabor característico. Dessa forma, suas aplicações são bastante abrangentes na indústria de laticínios e alimentos em geral. Além disso, exerce um papel importante em materiais plásticos, fibras têxteis e na indústria farmacêutica. Comercialmente, é sintetizado pela oxidação do n-butiraldeído, o qual pode ser obtido pela oxosíntese de olefinas, como o propileno, por exemplo. Entretanto, a rota biotecnológica obtém produtos mais específicos e com maior pureza (Zigová e Sturdik, 2000).

A glicerina, produto industrial que contém pelo menos 95% de glicerol puro, pode ser utilizada para a síntese de produtos químicos intermediários, por via química ou fermentativa, enquanto que a glicerina bruta, isto é, coproduzida ao biodiesel, contém cerca de 80% de glicerol puro. A alta produção de biodiesel nos últimos anos gerou uma quantidade elevada de glicerina que o mercado não consegue absorver em sua totalidade. Para cada quilo do biocombustível produzido sobram 100 quilos de glicerol. Somente para este ano estima-se uma produção de 0,5 bilhões de litros e para 2020 1,4 bilhões de litros de glicerol (Vasconcelos, 2012). Desse modo, novos estudos focam no aproveitamento desse resíduo, agregando-o valor a partir de novas aplicações, principalmente, por rotas sustentáveis.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de ácido butírico pela bactéria *Clostridium butyricum* NCIMB 8082, utilizando glicerina bruta como substrato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Micro Organismo

A bactéria utilizada para estes ensaios foi a *Clostridium butyricum* NCIMB 8082. Esta cepa foi obtida do National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB), cuja ativação foi feita utilizando Meio Fluido de Tioglicolato e Reinforced Clostridia Medium.

3.2. Preparo do Inóculo

A cultura de células foi mantida em frascos de penicilina a 4 °C contendo 50 mL de Reinforced Clostridia Medium. Estes frascos, contendo células crescidas, foram incubados em agitador rotatório a 37°C e 250 rpm por 30 minutos. Em seguida, as células foram inoculadas em frascos de vidro do tipo SCHOTT®, contendo 200 mL do meio de cultivo, a 37 °C por 16 horas em agitador rotatório a 250 rpm. O meio de cultivo utilizado tanto para esta etapa quanto para a fermentação é descrito na Tabela 1.

3.3. Fermentação

O meio de cultura contido nos frascos SCHOTT foram totalmente transferidos para um biorreator contendo 800 mL do meio de cultivo, purgando N₂. O glicerol bruto, utilizado como substrato, foi obtido a partir de uma planta piloto de biodiesel de Petróleo Brasileiro S.A.

(PETROBRAS).

Tabela 1. Meio de Cultivo (*Chatzifragkou et al.*, 2011)

Composto	Concentração (g.L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	3,4
KH ₂ PO ₄	1,3
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02
CaCO ₃	2,0
Extrato de Levedura	1,0
Glicerina	20,0
Solução Traço ¹	2,0 (mL.L ⁻¹)
Solução de Fe	1,0 (mL.L ⁻¹)
pH	7,0

O ensaio foi desenvolvido em condições anaeróbicas em biorreator com capacidade útil de 1 L a 37 °C, 200 rpm por 30 horas com controle de temperatura e pH durante o dia. O meio de alimentação foi composto de glicerol (200 g.L⁻¹) e extrato de levedura (10 g.L⁻¹).

3.4. Análises

A partir do biorreator de 1 L foram retiradas amostras em diferentes tempos para a análise do consumo de glicerol, dos produtos formados e do crescimento celular. Para quantificar o consumo de glicerol foram realizadas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters®), utilizando coluna Aminex[®] HPX-87H Ion Exclusion de dimensões 300 nm x 7,8 nm (Bio-Rad Laboratories), detector de índice de refração RID-10A (Shimadzu), bomba LC-20ADSP (Shimadzu) e software cromatográfico: LabSolutions (Shimadzu). A fase móvel utilizada foi H₂SO₄ 5 mM com vazão de 0,8 mL/min, o volume de injeção foi 20 µL e a temperatura da corrida 60°C. Os padrões (Sigma-Aldrich) de todos os analitos estudados foram diluídos em água Mili-Q e injetados em triplicata para preparação da curva padrão, que relaciona a área obtida no cromatograma com a concentração do composto. As amostras foram filtradas em membrana (CHROMAFIL[®]) com diâmetro de 0,45 µm e injetadas em duplicata para a quantificação através do uso da curva padrão.

¹ Solução Traço: 70 mg ZnCl₂, 0,1 g MnCl₂.4H₂O, 60 mg H₃BO₃, 0,2 g CoCl₂.2H₂O, 20 mg CuCl₂.2H₂O, 25 mg NiCl₂.6H₂O, 35 mg Na₂MoO₄.2H₂O, 0,9 mL HCl (37 %).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 são mostradas as concentrações dos produtos obtidos a partir dos resultados gerados pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A fase em batelada seguiu até 7 (sete) horas de experimento. Em seguida, realizou-se a alimentação em 7 (sete) horas e meia de fermentação.

Pode-se observar que houve consumo de praticamente todo o glicerol inicial em 6 (seis) horas de fermentação, mostrando que a glicerina bruta é um substrato de fácil assimilação para cepa que está sendo estudada. Ao mesmo tempo, houve produção de ácido butírico e de 1,3-propanodiol (PDO), sendo este último o mais produzido.

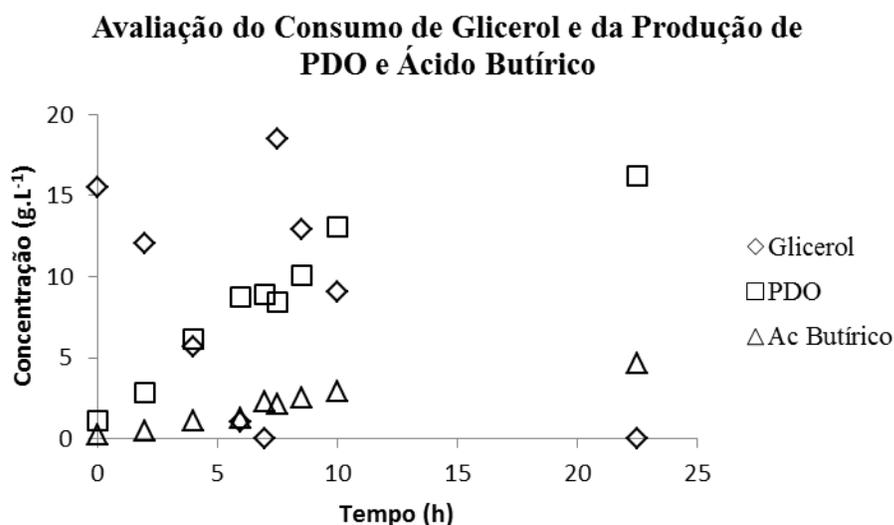


Figura 1. Concentração de Glicerol, Ácido Butírico e de PDO na fermentação de glicerina bruta utilizando *Clostridium butyricum* NCIMB 8082.

Nas 10 primeiras horas de fermentação, o pH foi mantido entre 6,0 e 7,0, o que favoreceu a produção de PDO, atingindo $13,03 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto obteve-se $2,90 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido butírico. Todavia, após às 10 horas desligou-se o controle de pH, sendo assim o pH foi reduzindo e ficou entre 5,5 e 6,0, o que deslocou a via para a produção de ácido butírico, atingindo a produção máxima de $4,69 \text{ g.L}^{-1}$.

A Tabela 3 mostra o rendimento e a produtividade de ácido butírico e de PDO obtidos na fermentação realizada. Os cálculos de rendimento e produtividade foram realizados separadamente para as duas fases: a fase com controle de pH, que corresponde as 10 primeiras horas de fermentação, e a fase sem controle de pH, após 10 horas de fermentação. Nota-se uma diferença significativa de rendimento e produtividade quando o pH é alterado. Ao se mantê-lo a concentração de PDO é bem mais alta que a do ácido, entretanto, ao reduzi-lo, é obtido um aumento relevante em apenas 3 horas

de diferença, apesar de o ganho de diol ter se mantido. É possível que a redução do pH tenha favorecido a produção rápida do ácido, embora de valor ainda baixo.

Tabela 3. Rendimento de glicerol em ácido butírico e PDO ($Y_{P/S}$) e produtividade (Q) dos principais produtos obtidos para as duas fases: com controle de pH e sem controle de pH.

	Com controle de pH		Sem controle de pH	
	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	Q (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	Q (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
Ácido Butírico	0,12	0,29	0,20	0,60
PDO	0,52	1,30	0,35	1,05

Resultados semelhantes são observados na literatura para a fermentação de *Clostridium butyricum*. Zigová *et al.* (1999) reportaram que foram encontrados 0.19 g butirato/g açúcar e 0.23 g.L⁻¹.h⁻¹ de ácido butírico quando sacarose foi usada como fonte de carbono em batelada, com pH 5,2 e ajustado apenas no início. No mesmo trabalho, foram encontrados 0,30 g butirato/g açúcar e 0,21 g.L⁻¹.h⁻¹ com o mesmo substrato, porém com alimentação e pH mantido em 5,2. Isso porque, de acordo com os autores, em baixos valores de pH a fase solventogênica da via metabólica é favorecida e, com isso, pois aumentou a quantidade deste ácido produzida. Por outro lado, quando em fermentação contínua, com 30 g.L⁻¹ de glicerol e pH mantido em 7,0, 4,4 g.L⁻¹ de ácido butanóico e 0.15 g butirato/g glicerol foram reportados por Papanikolaou *et al.* (2000), além de 16,5 g.L⁻¹ de PDO e 0,55 g PDO/g glicerol. Esses resultados foram explicados pelo fato de o pH neutro favorecer a via de produção de 1,3-propanodiol, enquanto que taxas de diluição crescentes do meio direcionam para um aumento da produção de ácido butírico.

Esses dados mostram que a cepa utilizada é promissora, uma vez que são bem próximos aos relatados de ácido butírico e de PDO. Este glicol é de suma importância para a síntese de poliésteres, poliuretanos e para a indústria farmacêutica (Papanikolaou *et al.*, 2000). Os resultados obtidos são bastante atrativos, já que o 1,3-propanodiol não é mais produzido por via sintética e sim por rota biotecnológica. Dessa forma, é evidenciado o potencial da glicerina como substrato para as bactérias do gênero *Clostridium*.

5. CONCLUSÃO

O uso da glicerina como fonte de carbono na fermentação de *C. butyricum* mostrou ser muito promissora. As concentrações, os rendimentos e as produtividades obtidos para o 1,3-propanodiol e o ácido butírico são relevantes e competitivos quando comparados com os dados relatados na literatura, principalmente, quando se leva em consideração a influência do pH.

Com isso, a produção de ácido butírico por essa cepa agrega valor não somente à via metabólica de sua produção, como também à de PDO e, principalmente, por utilizar uma matéria-prima de baixo custo em relação aos produtos gerados.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, pelo fomento à pesquisa.

7. REFERÊNCIAS

- CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S.; DIETZ, D; DOULGERAKI, A.I.; NYCHAS, G.-J; ZANG, A.-P. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. 91 (1), 101-112, 2011.
- Jang, Yu-Sin; Malaviya, A.; Cho, C.; Lee, J.; Lee, S.Y. Butanol production from renewable biomass by clostridia. *Biores. Tech.*, 123, 653-633, 2012.
- MOTA, C.J.A.; SILVA, C.X.A.; GONÇALVES, V.L.C. Gliceroquímica: Novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Quím. Nova*, 32, 639-648, 2009.
- PAPANIKOLAOU, S.; RUIZ-SANCHEZ, P.; PARISSET, B.; BLANCHARD, F.; FICK, M. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *J. Biotech.*, 77, 191-208, 2000.
- VASCONCELOS, Y. Glicerina, resíduo bem-vindo do biodiesel e as pesquisas em destaque. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/usinas/glicerina/glicerina-residuo-biodiesel-pesquisas-040712.htm>>. Acesso em: 28 de Abr. 2014.
- ZIGOVA, J; STURDIK, E. Advances in biotechnological production of butyric acid. *J. Ind. Microb. Biotech.*, 24, 153-160, 2000.
- ZIGOVA, J; STURDIK, E; VANDAK, D; SCHLOSSER, S. Butyric acid production by *Clostridium butyricum* with integrated extraction and pertraction. *Proc. Biochem.*, 34, 835-843, 1999.