

PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE 3ª GERAÇÃO A PARTIR DE XILOSE

C. NEVES¹, L.G. RAMIREZ¹, T.T. FRANCO², E.C. FRANCISCO², L.Q. ZEPKA¹,
E. JACOB-LOPES¹

¹Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) - Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. Email: jacoblopes@pq.cnpq.br

²Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Faculdade de Engenharia Química, 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

RESUMO – O objetivo do estudo foi avaliar a produção de biodiesel de terceira geração a partir de cultivos heterotróficos de *Phormidium* sp. em xilose. Os experimentos foram conduzidos em um biorreator de coluna de bolhas com relação altura/diâmetro (L/D) igual a 1,28 e volume de trabalho de 2L. As condições experimentais foram razão carbono/nitrogênio de 68, concentração inicial de inóculo de 100mg/L, pH de 7,6, temperatura de 30°C, aeração constante de 1VVM (volume de ar por volume de meio por minuto) e ausência de luminosidade. A concentração celular e o consumo de carbono orgânico foram avaliadas a cada 24 horas, durante as fases de crescimento do microrganismo e, ao final do cultivo, realizou-se a análise lipídica e a avaliação da qualidade do biodiesel. Os resultados demonstraram uma produtividade de biomassa de 952,1 mg/L.d em paralelo a uma produtividade lipídica de 5,0 mg/L.d. Os ácidos graxos de maior representatividade foram os ácidos cáprico, caprílico e palmítico com 53,70%, 28,65% e 10,50%, respectivamente. As propriedades de combustão do biodiesel 3G indicaram adequacidade em relação às normas internacionais para biodiesel.

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias são microrganismos fotossintetizantes, que possuem a capacidade de crescer em condições heterotróficas. Segundo Queiroz *et al.* (2011), o cultivo heterotrófico é uma rota tecnológica potencial para a produção de bioprodutos de baixo valor agregado, como os biocombustíveis.

O crescimento heterotrófico no escuro, suportado por fonte de carbono exógeno, é uma capacidade importante de algumas espécies fotossintéticas de microalgas. Sendo assim, o cultivo heterotrófico oferece várias vantagens sobre o cultivo fototrófico incluindo a eliminação da exigência de luz, um bom controle do processo de cultivo e de baixo custo para a separação da biomassa devido a maior densidade de células obtidas (Chen e Johns, 1991).

Um fator predominante no desenvolvimento do meio sintético, em cultivos heterotróficos, é a escolha da fonte de carbono orgânico. O substrato orgânico é estimado em cerca de 80% do custo total do processo, podendo muitas vezes inviabilizar os processos de produção. Com isso, uma alternativa para a mitigação dos custos é a substituição de determinadas fontes de carbono orgânico por substratos de baixo custo, capazes de reduzir os custos em até 40% (Li *et al.*, 2007).

Segundo Chisti (2007), apesar do bom desenvolvimento do biodiesel a partir de oleaginosas em grande escala, a produção não é satisfatória para suprir a demanda global. Por essa razão, o biodiesel microalgal tem emergido como uma grande promessa, devido principalmente a fatores como teor e

produtividade em lipídeos além da possibilidade de indução do acúmulo intracelular de lipídeos (Pratoomyot, 2005).

Neste sentido, o objetivo deste estudo é avaliar a produção de biodiesel de terceira geração a partir de cultivos heterotróficos de *Phormidium* sp. em xilose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo e meio de cultura

A cianobactéria utilizada foi a *Phormidium* sp., isolada do Deserto Cuatro Cienegas no México (26°59'N 102°03'W). Após purificação, as culturas estoque foram mantidas em tubos de ensaio com meio sintético BG11 (Rippka *et al.*, 1979) solidificado com agar-agar (20g/L) com a seguinte composição (g/L): K₂HPO₄ (0.03 g/L), MgSO₄ (0.075 g/L), CaCl₂.2H₂O (0.036 g/L), citrato de ferro amoniacal (0.0006 g/L), Na₂EDTA (0.001 g/L), NaCl (0.00072 g/L), NaNO₃ (0.015 g/L), ácido cítrico (0.0006 g/L), Na₂CO₃ (1.5 g/L), metais traços [H₃BO₃ (0.0028 g/L), MnCl₂.4H₂O (0.0018 g/L), ZnSO₄.7H₂O (0.00022 g/L), Na₂MoO₄.2H₂O (0.00039 g/L), CoSO₄.6H₂O (0.00004 g/L)]. As condições de incubação utilizadas foram: temperatura de 25°C, densidade de fluxo de fótons de 15 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12/12 horas. Para obter os inóculos em forma líquida, 1 mL de meio sintético foi esterilizado, transferido para tubos e as colônias foram raspadas e depois homogeneizadas com o auxílio de tubos de misturadores. Todo o procedimento foi realizado assepticamente.

2.2 Biorreator e dados cinéticos

As medições foram feitas em um reator coluna de bolhas. O sistema foi construído em vidro borossilicato com diâmetro de 12.5 cm e altura de 16 cm, resultando em uma altura/diâmetro (h/D) de 1,28 e volume de trabalho nominal de 2,0 L. O sistema de dispersão do reator consistiu em um difusor de ar de 2,5 cm de diâmetro, localizado no centro do reator. O fluxo de ar foi controlado por um medidor de fluxo (KI-Key Instruments®, Treveose-PA, USA), e a entrada e saída de ar foram filtradas através de filtros de polipropileno com o diâmetro do poro de 0,22 μm (Millex FG®, Billerica-MA, USA).

O biorreator, incluindo as unidades de filtragem, foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 40 minutos, em seguida contendo meio sintético por 30 minutos.

Os experimentos foram realizados a partir da operação descontínua, nas condições de concentração inicial do inóculo de 100 mg/L, temperatura de 26°C, pH ajustado em 7,6, aeração de 1 VVM (volume de ar por volume de cultura por minuto) e ausência de luz. O meio de cultura consistiu em meio sintético BG11 modificado e suplementado com xilose (12,5 g/L).

2.3 Parâmetros Cinéticos

Os dados de concentração de biomassa foram utilizados para calcular a produtividade de biomassa [$P_X = (X_i - X_{i-1})(t_i - t_{i-1})^{-1}$, mg/L/d], taxa máxima de crescimento específico [$\ln(X_i/X_0) = \mu_{\text{max}} \cdot t$, 1/d], tempo de geração [$t_g = 0.693/\mu_{\text{max}}$, d] e produtividade lipídica [$PL = P_X \cdot LC$, mg/L/d], em que X_0 é a concentração de biomassa inicial, X_i é a concentração de biomassa no tempo t_i , X_{i-1} é a concentração de biomassa no tempo t_{i-1} , t é o tempo de residência celular, μ_{max} representa a taxa de crescimento específico máximo e LC é o teor de lipídeos da biomassa (%). Os dados de consumo de carbono

orgânico foram utilizados para calcular a taxa de consumo de substrato ($r_s = dS/dt$, mg/L/d), a eficiência de conversão ($CE = S_0 - S/S_0$, %), e o coeficiente de rendimento estequiométrico ($Y_{X/S} = dX/dS$, mg_{biomassa}/mg_{substrato}), onde S_0 é a concentração inicial de carbono orgânico (mg/L), S é a concentração final de carbono orgânico (mg/L) e t é o tempo (d).

2.4 Amostragem e métodos analíticos

As amostras foram coletadas de forma asséptica em uma câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada. Os materiais utilizados para a coleta das amostras foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. A biomassa celular, a dinâmica do pH e o consumo de carbono orgânico foram monitorados a cada 24 horas durante a fase de crescimento do microrganismo. O experimento foi realizado duas vezes e em duplicata. Portanto, os dados cinéticos referem-se ao valor médio de quatro repetições.

Os valores de pH foram determinados por potenciômetro (Mettler-Toledo, São Paulo-SP, Brazil). A biomassa celular foi determinada gravimetricamente, onde filtrou-se um volume conhecido do meio de cultura com o filtro de membrana de 0.45 µm (Millex FG®, Billerica-MA, USA), seco a 60°C por 24h. A concentração de carbono orgânico foi expressa em termos da demanda química de oxigênio (DQO) e analisado de acordo com o método colorimétrico de refluxo fechado (APHA, 2005).

A fração lipídica da biomassa foi extraída pelo método de Bligh & Dyer (1959). O método de Hartman e Lago (1976) foi utilizado para saponificar e esterificar o extrato seco de lipídeos para obtermos os ésteres metílicos de ácidos graxos (biodiesel). A composição de ácidos graxos foi determinada usando o cromatógrafo a gás VARIAN 3400CX (Varian, Palo Alto-CA, USA). Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os tempos padrão (Supelco, Louis-MO, USA) e quantificados por normalização de área. As propriedades de combustão do biodiesel foram analisadas segundo a metodologia proposta por Francisco *et al.* (2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os parâmetros cinéticos para o cultivo de *Phormidium* sp., a partir de xilose como fonte de carbono orgânico. Observa-se a partir da análise dos dados taxas de consumo de xilose de 952,1 mg/L.d, o que resultou em uma eficiência global de conversão de xilose de 34,95%. Deste valor 55% foi convertido em biomassa microalgal, conforme evidenciado pelos fatores de conversão ($Y_{X/S} = 0,55 \text{ mg}_{\text{célula}}/\text{mg}_{\text{xilose}}$). Adicionalmente, nestas condições, produtividades em biomassa de 66,20 mg/L.d foram obtidas. Os teores de lipídeos da biomassa foram de 7,9%, resultando em produtividades lipídicas de 5,0 mg/L.d. Estes resultados demonstram que a xilose pode ser considerada como uma fonte de carbono orgânico exógena alternativa para o cultivo heterotrófico de *Phormidium* sp.

Tabela 1 – Parâmetros cinéticos para o cultivo de *Phormidium* sp., a partir de xilose como fonte de carbono orgânico

Parâmetros Cinéticos	Valores
r_s (mg/L.d)	952,1
EC (%)	34,95
$Y_{X/S}$ (mg _{célula} /mg _{xilose})	0,55
PX (mg/L.d)	66,20
Lipídeos (%)	7,90
P_L (mg/L.d)	5,00

r_s : taxa de consumo do substrato, EC: eficiência de conversão do carbono orgânico, $Y_{X/S}$: coeficiente de conversão do substrato em célula, P_x : produtividade em biomassa, P_L : produtividade lipídica.

Independente dos aspectos quantitativos, a qualidade dos óleos unicelulares é um fator decisivo na escolha e definição de rotas tecnológicas de produção de biodiesel 3G. Neste sentido, a Tabela 2, apresenta o perfil de ácidos graxos da microalga *Phormidium* sp, cultivada em xilose.

Tabela 2: Perfil de ácidos graxos da *Phormidium* sp. cultivada em xilose

Ácidos Graxos	Percentual
C6:0	1,98
C8:0	28,65
C10:0	53,70
C12:0	0,97
C13:0	2,25
C16:0	10,50
C18:0	1,94
SFAs	99,99
MUFAs	ND
PUFAs	ND

ND: não detectado, SFAs: ácidos graxos saturados, MUFAs: ácidos graxos monoinsaturados e PUFAs: ácidos graxos poliinsaturados.

A análise dos dados indica que os ácidos graxos de maior representatividade foram os ácidos cáprico, caprílico e palmítico com percentuais de 53,70%, 28,65% e 10,50%, respectivamente. A composição em ácidos graxos é o fator de maior representatividade nas propriedades de combustão do biodiesel (Tabela 3).

Tabela 3 – Propriedades de combustão do biodiesel obtido a partir da microalga *Phormidium* sp., a partir de xilose como fonte de carbono

Propriedades do biodiesel	Biodiesel 3G	ASTM 6751	EN 14214
CE (%)	99,98	-	min. 96,5
CN	50,47	min. 47	min. 51
IS	219,34	-	-
II ($\text{gI}_2 100\text{g}^{-1}$)	92,04	-	max. 120
GI (%)	47,8	-	-
FCC (%)	33,59	-	-
PEFF ($^{\circ}\text{C}$)	89,06	-	-

CE: conteúdo de ésteres, CN: número de cetano, IS: índice de saponificação, II: índice de iodo, GI: grau de insaturação, FCC: fator de comprimento da cadeia, PEFF: ponto de entupimento de filtro a frio.

A análise da Tabela 3, indica que as propriedades de combustão obtidas (conteúdo de ésteres de 99,98%, número de cetano de 50,47, índice de iodo de 92,04 $\text{gI}_2 100\text{g}^{-1}$, grau de insaturação de 47,8% e ponto de entupimento de filtro a frio de 89,06 $^{\circ}\text{C}$) estão de acordo com as normas ASTM 6751 e EN 14214 demonstrando a adequacidade e o potencial de exploração do biodiesel 3G obtido por *Phormidium* sp. a partir de xilose.

4. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram a possibilidade de obter produtividades lipídicas na ordem de 5,0 mg/L.d a partir de cultivos heterotróficos de *Phormidium* sp. em xilose como fonte orgânica de carbono.

Os ácidos graxos de maior representatividade na biomassa foram os ácidos cáprico (53,70%), caprílico (28,65%) e palmítico (10,50%).

As propriedades de combustão do biodiesel 3G (conteúdo de ésteres de 99,98%, número de cetano de 50,47, índice de iodo de 92,04 $\text{gI}_2 100\text{g}^{-1}$, grau de insaturação de 47,8% e ponto de entupimento de filtro a frio de 89,06 $^{\circ}\text{C}$) estão de acordo com as normas ASTM 6751 e EN 14214.

5. REFERÊNCIAS

APHA; AWWA; WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st edn. Prot City Press, *Baltimore*, 2005

ASTM 6751. Standard Specification for Biodiesel Fuel (B100). Blend Stock for Distillate Fuels, 2002.

BLIGH, EG; DYER, JW. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917, 1959.

CHISTI, Y. "Biodiesel from microalgae." *Biotechnol Adv* 25(3): 294-306, 2007.

CHISTI, Y.; YAN, J. "Energy from algae: Current status and future trends: Algal biofuels – A status report." *Applied Energy* 88(10): 3277-3279, 2011.

DAY A. G.; BRINKMANN D.; FRANKLIN S.; ESPINA K.; RUDENKO G.; ROBERTS A.; HOWSE K.S. "Safety evaluation of a high-lipid algal biomass from *Chlorella protothecoides*." *Regul Toxicol Pharmacol* 55(2): 166-180, 2009.

CHEN, F.; JOHNS, MR. Efeito da relação C / N e aeração sobre a composição de ácidos graxos dos heterotróficos sorokiniana *Chlorella* Appl Phycol, v.3, p. 203-209, 1991.

FRANCISCO, E. C.; NEVES, D. B.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T.T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.85, p.395-403, 2010.

HARTMAN, L.; LAGO, RCA. A rapid determination of fatty acid methyl esters from lipids. Lab Prat. v. 22, p.475–476, 1976.

KANOTHE; GERHARD. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy & Environmental Science*, (s.i). v.2. p. 759-766, 2009.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, v.86, p.1050-1070, 2005.

LI, Y.; WANG, B.; WU, N.; LAN, CQ. Efeitos de fontes de nitrogênio sobre o crescimento celular e produção de lipídios de oleoabundans *Neochloris*. *Microbiologia Aplicada e Biotecnologia*, v.81(4), p. 629-636, 2008.

PRATOOMYOT, J.; SRIVILAS, P.; NOIRAKSAR, T. Composição em ácidos graxos de 10 espécies de microalgas. Songklanakarin *Jornal da Ciência e Tecnologia*, v.27 (6), p. 1179-1187, 2005.

QUEIROZ, MI; HORNES, MO; SILVA-MANETTI, AG; JACOB-LOPES, E. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Na⁺geli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. *Appl Energy* v. 88, p. 3438–3443, 2011.

RIPPKA, R.; DERUELES, J.; WATERBURY, JB.; HERDMAN, M.; STANIER, RY. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* v. 111, p. 1–61, 1979.

SHEEHAN, J.; DUNAHAY, T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. Um olhar para trás, o Departamento de programa de espécies aquáticas de Energia dos EUA: o biodiesel a partir de algas. *National Renewable Energy Laboratory*, EUA; NREL/TP-580-24190, 1998.

SMITH, V. H.; STURM, B. S. M.; NOVELLES, F. J.; BILLINGS, S.A. "The ecology of algal biodiesel production." *Trends in Ecology & Evolution*, v. 25(5), p. 301-309, 2010.

UNE-EN 14214. Automotive Fuels, Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines, Requirements and Test Methods, 2003.