

## PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICERINA BRUTA POR *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM*

V. da S. SAAB<sup>1</sup>, T. F. FERREIRA<sup>2</sup>, F. F. MARTINS<sup>3</sup>, C. M. S. RIBEIRO<sup>4</sup>, M. A. Z. COELHO<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Instituto Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Processos Químicos

<sup>2</sup> Instituto Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Processos Químicos

<sup>3</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica

<sup>4</sup> Centro de Pesquisa Leopoldo Américo Miguez de Mello, Gerência de Biotecnologia

<sup>5</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica

E-mail para contato: nessa.saab@gmail.com

**RESUMO** – Com a crescente produção de biodiesel, grandes quantidades de glicerina estão sendo injetadas no mercado, baixando expressivamente seus preços. Em geral, a glicerina tem se mostrado uma matéria-prima importante no setor biotecnológico, pois vem sendo empregada como a principal fonte de carbono em alguns processos fermentativos. Dessa forma, é possível utilizar a glicerina bruta na obtenção de um produto de interesse industrial, o 1,3-propanodiol (1,3-PDO), utilizando o micro-organismo *Clostridium butyricum*. O 1,3-propanodiol é uma molécula orgânica bifuncional que possui grande aplicação nas reações de síntese de poliuretanos, poliésteres e poliéteres. O presente trabalho visou a produção de 1,3-PDO a partir de glicerina bruta por *Clostridium butyricum*. A cepa estudada apresentou grande capacidade de conversão de glicerina em 1,3-PDO, atingindo o rendimento de 0,56 g.g<sup>-1</sup> com a produtividade de 1,37 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de 1,3-PDO.

### 1. INTRODUÇÃO

O 1,3-propanodiol (1,3-PDO) é um composto orgânico de caráter bifuncional que possui grande potencial de ser utilizado em várias reações de síntese como monômero. É comumente usado em policondensações para produzir poliésteres, poliuretanos e poliéteres. Ele também apresenta uma vasta gama de aplicações já que oferece propriedades melhoradas para solventes, adesivos, laminados, resinas, detergentes e cosméticos (Ferreira *et al.*, 2012).

Os principais micro-organismos normalmente utilizados para produção de 1,3-PDO são *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium pasteurianum* e *Clostridium butyricum* (Saxena *et al.*, 2009). O principal substrato que é utilizado nesta rota biotecnológica de produção de 1,3-PDO é o glicerol. Durante o processo o glicerol é desidratado para 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA) pelo glicerol desidratase. O produto da reação de desidratação, 3-HPA é reduzido a 1,3-PDO através da ação de uma oxidoreductase dependente de NADH.H<sup>+</sup> (Papanikolaou *et al.*, 2000).

O aumento da produção de biodiesel propiciou uma maior oferta de glicerol no mercado, pois o glicerol também é obtido através da transesterificação alcalina que dá origem ao biodiesel. Dessa forma, a conversão microbiana de glicerol em 1,3-PDO é uma alternativa que permite agregar valor ao subproduto da produção de biodiesel, arcando de certa forma com o custo desse óleo tão importante atualmente no cenário mundial.

A literatura relata a produção de 1,3-PDO usando *Clostridium butyricum*, mas não há relatos sobre a utilização da estirpe *Clostridium butyricum* NCIMB 8082 para a produção de 1,3-PDO. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de crescimento da estirpe *Clostridium butyricum* NCIMB 8082 em glicerol bruto e a produção de 1,3-PDO.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Cepa e Condições de Cultivo

Foi utilizada a cepa *Clostridium butyricum* NCIMB 8082 através da *National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria* (NCIMB). O meio utilizado para reativação da cultura foi o Reinforced Clostridia Medium e o Meio Fluido de Tioglicolato. O glicerol bruto foi obtido a partir de uma planta piloto de geração de biodiesel da Petróleo Brasileiro S/A (Petrobras).

### 2.2. Metodologia Experimental

Experimentos em frascos de vidro do tipo SCHOTT®: A cepa crescida foi mantida em frascos de penicilina, a 4° C contendo 50 mL do Reinforced Clostridia Medium. Para inoculação, os frascos de penicilina contendo as células cultivadas foram incubadas a 37° C durante 30 minutos em agitador rotatório a 250 rpm. Depois disso, as células foram inoculadas em frascos de vidro do tipo SCHOTT® contendo 200 mL de meio. Foram utilizados dois diferentes meios que se encontram descritos na Tabela 1. Em ambos os meios foi purgado N<sub>2</sub> antes e depois da inoculação. As amostras foram obtidas ao longo do tempo para analisar o consumo de glicerol, os produtos formados e o crescimento das células.

Tabela 1 – Composição dos diferentes meios utilizados.

Meio 1 (Chatzifragkou et al., 2011)	Meio 2 (Wilkens et al., 2012)
3,4 g.L <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-
1,3 g.L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,71 g.L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2,0 g.L <sup>-1</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,69 g.L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl -
0,2 g.L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,186 g.L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
0,02 g.L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025 g.L <sup>-1</sup> CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O
1,0 mL.L <sup>-1</sup> Fe solution <sup>2</sup>	0,015 g.L <sup>-1</sup> FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O

1,0 g.L <sup>-1</sup> extrato de levedura	5,0 g.L <sup>-1</sup> extrato de levedura
20,0 g.L <sup>-1</sup> glicerina	20,0 g.L <sup>-1</sup> glicerina
2,0 mL.L <sup>-1</sup> solução traço <sup>1</sup>	3,0 mL.L <sup>-1</sup> solução traço <sup>3</sup>
2,0 g.L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>	pH = 7,0
pH = 7,0	

<sup>1</sup>70 mg.L<sup>-1</sup> ZnCl<sub>2</sub>; 0,1 g.L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 60 mg.L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,2 g.L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 20 mg.L<sup>-1</sup> CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 25 mg.L<sup>-1</sup> NiCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 35 mg.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,9 mL.L<sup>-1</sup> HCl 37%.

<sup>2</sup>5,0 g.L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,9 mL.L<sup>-1</sup> HCl 37%.

<sup>3</sup>1,0 g.L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>.4H<sub>2</sub>O; 0,5 g.L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 0,85 g.L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 0,5 g.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,5 g.L<sup>-1</sup> ZnCl<sub>2</sub>; 0,1 g.L<sup>-1</sup> CuCl<sub>2</sub>; 0,05 g.L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,05 g.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,13 g.L<sup>-1</sup> NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 5,0 g.L<sup>-1</sup> NaCl; 0,1 g.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O

**Experimentos em Biorreator:** A cepa crescida foi mantida em frascos de penicilina, a 4° C contendo 50 mL de ReinforcedClostridiaMedium. Os frascos de penicilina contendo as células cultivadas foram incubadas a 37 °C durante 30 minutos em agitador rotatório a 250 rpm e depois inoculados num frascoSCHOTT® contendo 200 mL do Meio 1. Após 18 horas, todo o meio de cultivo contido nos frascos foi transferido para um biorreator contendo 800 mL do Meio 1. Este procedimento foi realizado com purga de N<sub>2</sub>. Amostras foram obtidas ao longo do tempo para analisar o consumo de glicerol, os produtos formados e o crescimento celular.

O experimento foi realizado sob condições anaeróbias em biorreator com capacidade útil de 1 L, a 37 °C e agitação de 200 rpm durante 30 horas, com controle de temperatura e de pH. O meio de alimentação foi composto por glicerol (200 g.L<sup>-1</sup>) e extrato de levedura (10 g.L<sup>-1</sup>).

## 2.3. Métodos Analíticos

**Determinação do Crescimento Celular:** O crescimento foi acompanhado através da leitura de densidade ótica (D.O.) a 600 nm.

**Análise:** Para quantificar 1,3-propanodiol e os subprodutos da fermentação: butanol, 2,3-butanodiol, etanol e alguns ácidos orgânicos (butírico, succínico, cítrico, pirúvico, láctico e acético) foram realizadas análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para tal análise utilizou-se os seguintes itens: coluna Aminex® HPX-87H IonExclusion de dimensões 300 nm x 7,8 nm (Bio-RadLaboratories), detector de índice de refração RID-10A (Shimadzu), bomba LC-20ADSP (Shimadzu) e software cromatográfico: LabSolutions (Shimadzu). A fase móvel utilizada foi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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.  
**Determinação do pH:** O pH inicial e final dos experimentos realizados em frascos do tipo SCHOTT® foram analisados em um modelo de pH Digimed DM-22.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaio foi utilizado glicerol bruto contendo 80% de pureza e mesmo com as impurezas presentes no meio, a cepa foi capaz de consumir o substrato e crescer. A maior parte do glicerol foi consumido após 30 horas de fermentação, mesmo com o baixo inóculo utilizado, como mostra a Tabela 2. Os dados coletados mostram uma variação da concentração inicial do glicerol, este fato se dá pela dificuldade de amostragem causada por sua viscosidade.

Tabela 2 – Resultados obtidos nos experimentos em frascos SCHOTT® utilizando-se os meios 1 e 2.

Tempo (h)	Meio 1					Meio 2				
	D.O. 600nm	Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	PDO (g.L <sup>-1</sup> )	Acetato (g.L <sup>-1</sup> )	Succinato (g.L <sup>-1</sup> )	D.O. 600nm	Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	PDO (g.L <sup>-1</sup> )	Acetato (g.L <sup>-1</sup> )	Succinato (g.L <sup>-1</sup> )
0	0,367	16,3	0,00	0,00	0,00	0,261	19,0	0,00	0,00	0,00
4	0,298	16,1	0,00	0,24	0,05	0,244	18,9	0,00	0,07	0,07
8	0,275	11,3	1,05	1,40	0,43	0,198	17,9	0,41	0,26	0,26
24	3,900	6,0	5,25	1,23	0,36	0,800	16,7	0,65	0,11	0,11
28	3,960	5,6	5,37	1,21	0,37	1,300	15,2	2,57	0,06	0,06
30	3,960	4,7	5,45	1,38	0,34	1,300	10,8	4,56	0,07	0,07

Como observado na Tabela 2, o crescimento das células foi maior no Meio 1 do que no Meio 2 e o consumo do glicerol e a produção do 1,3-PDO também foram mais elevadas no Meio 1. É possível notar que, após 24 horas de fermentação, permaneceram 5,6 g.L<sup>-1</sup> do glicerol no Meio 1 e 16,7 g.L<sup>-1</sup> no Meio 2. Ao mesmo tempo, a concentração de 1,3-PDO foi de 5,25 g.L<sup>-1</sup> no Meio 1 e apenas 0,65 g.L<sup>-1</sup> no Meio 2. E ainda, após 30 horas de fermentação, a concentração de glicerol permanece em quantidade significativa. É provável que este fato ocorra devido a redução do pH que, possivelmente, inibe o metabolismo celular. O pH final dos meios foi de 4,66 e 4,69 para os meios 1 e 2, respectivamente, sendo menor no meio que apresentou a maior produção de acetato e succinato.

Apesar do Meio 2 ter fornecido um maior rendimento de glicerol em 1,3-PDO (56 % g.g<sup>-1</sup>) em comparação com o Meio 1 (50 % g.g<sup>-1</sup>), este último mostrou uma maior produtividade de 1,3-PDO (0,33 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). A produtividade no Meio 2 foi de 0,21 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de 1,3-PDO. Assim, o Meio 1 foi escolhido para realizar o experimento em biorreator com controle de pH de modo a avaliar a capacidade da cepa de produzir o produto de interesse.

A Figura 1 apresenta os dados de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO e pH do experimento realizado em biorreator. Mesmo iniciando o experimento com uma baixa densidade ótica, observa-se que, em poucas horas de experimento, foi obtida uma elevada produção de 1,3-PDO. É possível notar também que todo glicerol foi consumido em 6 horas, produzindo 9,40 g.L<sup>-1</sup> de 1,3-PDO.

Através de uma análise visual, observou que as células começaram a se aglomerar perto de seis horas

de fermentação, formando grandes *pelets*. Provavelmente este fato ocorreu por causa da escassez de nutrientes. Depois disso, o biorreator foi alimentado com solução contendo glicerina e extrato de levedura e, em seguida, verificou-se o desaparecimento dos *pelets*, pois as células voltaram a se dispersar no meio.

Observa-se na Figura 1 que após a alimentação, o *Clostridium butyrium* NCIMB 8082 foi capaz de continuar a consumir rapidamente o glicerol. Depois de um total de 10 horas de fermentação, a concentração de 1,3-propanodiol atingiu aproximadamente  $14,0 \text{ g.L}^{-1}$ . A produtividade do experimento em biorreator foi de cerca de  $1,4 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  de 1,3-PDO e o rendimento de glicerol em 1,3-PDO foi de  $0,56 \text{ g.g}^{-1}$ .

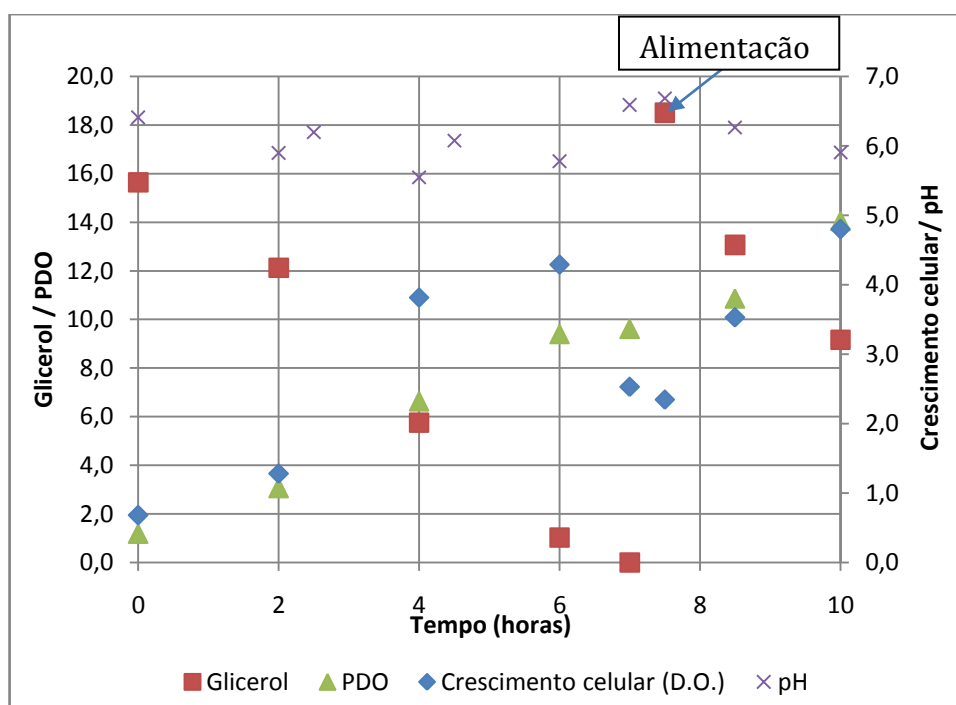


Figura 1 – Crescimento celular (D.O.), consumo de glicerol, produção de PDO e pH observados no experimento em biorreator com a cepa *Clostridium butyricum*.

O controle do pH é muito importante para melhorar a produção do 1,3-PDO. Biebl et al. (1999) produziu 1,3-PDO a partir de glicerol por *Klebsiella pneumonia* e observou o maior aumento de 1,3-PDO em pH 7,0.

Chatzifragkou et al. (2011) realizaram a fermentação em batelada alimentada utilizando uma cepa de *Clostridium butyricum*. A concentração final de 1,3-PDO foi de  $67,9 \text{ g.L}^{-1}$  e o rendimento foi de  $0,55 \text{ g.g}^{-1}$ . No entanto, estes resultados foram obtidos após 96 horas de fermentação, de modo que a produtividade foi de  $0,70 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , inferior a obtida no presente trabalho usando a mesma composição

de meio.

Wilkenset *al.* (2012) também realizaram batelada alimentada em biorreator de 1 L e obtiveram 76,2 g.L<sup>-1</sup> de 1,3-PDO com uma produtividade de 2,3 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> após 32,5 horas de fermentação. No entanto, neste estudo os pesquisadores utilizaram que uma cepa de *Clostridium butyricum* geneticamente modificada e um meio de cultura com mais nutrientes do que o usado no presente trabalho.

## 4. CONCLUSÕES

A cepa estudada se mostrou altamente eficaz na produção de 1,3-PDO, por se tratar de uma estirpe sem modificação genética, com boa produtividade e rendimento. Além disso, a mesma foi capaz de utilizar um resíduo industrial gerado em excesso no mercado brasileiro, o glicerol bruto, como fonte de carbono para seu crescimento. Na literatura podemos encontrar resultados satisfatórios de produção de 1,3 PDO por *Clostridium butyricum* como os obtidos no presente trabalho, porém tratam-se de estirpes geneticamente modificadas, fato que dificulta a sua utilização em escala industrial, aumentando seus custos. Em contrapartida, a estirpe *Clostridium butyricum* NCIMB 8082 apresentou uma produtividade de 1,4 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e rendimento de 0,56 g.g<sup>-1</sup> sem qualquer alteração genética e sem otimização das condições de produção. Vale ressaltar que a alimentação de glicerol foi realizada com 7,5 horas de fermentação e nesse momento o glicerol presente no meio de cultivo já havia se esgotado, sendo assim a cepa ficou um tempo sem substrato, o que provavelmente diminuiu a produtividade do processo.

Dessa forma, o presente trabalho mostra o potencial de produção de 1,3-PDO a partir de glicerina bruta utilizando o *Clostridium butyricum* NCIMB 8082, demonstrando que se trata de uma cepa potencial a ser estudada para esta finalidade.

## 4. REFERÊNCIAS

- BIEBL, H.; MENZEL, K.; ZENG, A.P.; DECKWER, W.D. Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 52, p. 289-297, 1999.
- CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S.; DIETZ, D.; DOULGERAKI, A.I.; NYCHAS, G.J. E.; ZENG, A.P. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011.
- FERREIRA, T.F.; RIBEIRO, R.R.; RIBEIRO, C.M.S.; FREIRE, D.M.G.; COELHO, M.A.Z. Evaluation of 1,3-Propanediol Production from Crude Glycerol by *Citrobacterfreundii* ATCC 8090. *Chemical Engineering Transactions*, v. 27, p. 157-162, 2012.
- 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. *Journal of Biotechnology*, v. 77, p. 191-208, 2000.

SAXENA, R.K.; ANAND, P.; SARAN, S.; ISAR, J. Microbial production of 1,3-propanediol: recent development and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*, v. 27(6), p. 895-913, 2009.

WILKENS, E.; RINGEL, A.K.; HORTIG, D.; WILLKE, T.; VORLOP, K.D. High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, p. 1057-1063, 2012.