



VIII-Oktoberforum – PPGEQ

20, 21, 22 e 23 de outubro de 2009

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE 1,3-PROPANODIOL E HIDROGÊNIO A PARTIR DO GLICEROL RESIDUAL ORIUNDO DA SÍNTESE QUÍMICA DE BIODIESEL

Daniele Misturini Rossi¹, Marco Antônio Záchia Ayub¹

¹ Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (BIOTECLAB-ICTA).
Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - BRASIL,
E-MAIL: dmisturini@gmail.com, mazayub@ufrgs.br

Resumo: O glicerol é o principal bioproduto obtido durante a síntese de óleos vegetais e gordura animal e é gerado em grandes quantidades durante a produção de biodiesel. Glicerol é um co-produto de muitos processos industriais tornando-se um substrato potencialmente atrativo para a produção bacteriana de produtos de valor agregado. Uma alternativa para utilização do glicerol é a sua conversão em bioprodutos como, 1,3-propanodiol, hidrogênio e outros. A transformação do glicerol por processos biotecnológicos pode ser economicamente viável já que existe uma grande necessidade de buscar alternativas para a utilização deste produto evitando que se torne um problema no futuro devido a sua acumulação. O presente trabalho teve como objetivo utilizar glicerol residual proveniente da produção de biodiesel como fonte de carbono para a produção de subprodutos de valor agregado por via biotecnológica. Nos experimentos foram utilizados bioreatores submersos de volume de 2L com 70g/L de glicerol residual de grau de pureza 80,93%. Os reatores foram inoculados com 10% de consórcio microbiano ambiental, previamente tratado (20 min. a 90°C). A análise dos produtos formados foi determinada por cromatografia de alto desempenho (HPLC). Observou-se que houve consumo total do glicerol residual após 32 horas com uma produção de 19,92 g/l de 1,3 propanodiol.

Palavras-chave: glicerol, 1,3 Propanodiol, hidrogênio, HPLC.

1 Introdução

O desenvolvimento de pesquisas para a produção de bio-combustíveis alternativos tem sido bastante significativo nos últimos anos, devido principalmente à preocupação com a exaustão das reservas de combustíveis fósseis, como por exemplo, o petróleo. Desta forma a produção de biodiesel e bioetanol têm emergido como uma das estratégias mais viáveis no que diz respeito a fontes não convencionais de energia. Dentre os combustíveis renováveis mais promissores destaca-se o biodiesel. Este produto é, em geral, obtido a partir da transesterificação de óleos vegetais com álcoois (metanol e etanol), usando catalise básica ou pela esterificação desses materiais na presença de catalisadores ácidos. A grande produção de biodiesel leva também a formação de bioprodutos secundários, entre eles, o glicerol.

O glicerol é gerado em grandes quantidades durante a produção de biodiesel. Para cada 1000 kg de biodiesel produzidos pela transesterificação de óleos vegetais e gordura animal, 100 kg de glicerol são gerados. Logo, com o aumento evidente da produção deste biocombustível no Brasil e no mundo, o glicerol residual

vai passar a ser um subproduto excedente. Este grande aumento na produção de biodiesel já surgiu efeito no preço do glicerol, o qual caiu drasticamente nos últimos dois anos (Yazdani & Gonzalez, 2007). A composição do glicerol residual varia dependendo do tipo de semente utilizada e do processo de produção do biodiesel. Geralmente, a produção de resíduos contendo altos níveis de glicerol é gerada, na maior parte, de indústrias que usam gordura animal ou óleos vegetais como matéria-prima. Por exemplo, a indústria olequímica gera resíduo contendo de 55 a 90 % de glicerol (Yazdani & Gonzalez, 2007).

A conversão microbiana de glicerol a vários compostos tem sido investigada com foco particular na produção de 1,3 propanodiol, o qual pode ser aplicado como ingrediente na produção de poliésteres. Entretanto, a produção biológica de H₂ e etanol de glicerol são também atrativos porque o H₂ é considerado uma fonte de energia limpa e etanol poderá ser usado como material bruto e como um suplemento para gasolina (Ito et al, 2005).

Há pelos menos 50 anos sabe-se que glicerol é fermentado por bactérias anaeróbias facultativas a 1,3-propanodiol, etanol, 2,3 butanodiol, ácido acético e lático. Destas substâncias 1,3-propanodiol merece destaque como

monômero para produção de poliésteres, poliéteres e poliuretanos, entre eles um novo tipo de poliéster, politrimetileno tereftalato, conhecido como PTT. Pode ser usado também como um extensor de cadeia para a síntese de poliuretanos, lubrificantes, solventes e precursores na indústria química e farmacêutica (Deckwer, 1995). 1,3 propanodiol têm sido principalmente produzido através da conversão química da acroleína, o qual requer altas temperaturas, altas pressões e catalises de alto custo (Biebl et al., 1992, Chen et al., 2003). Com isso, a utilização de microrganismos para a sua produção poderia diminuir grandemente os custos de produção. Somente poucos organismos, a maioria deles bactérias, são capazes de formar o 1,3 propanodiol, entre eles, enterobactérias do gênero *Klebsiella* (*K.pneumoniae*), *Enterobacter* (*E. agglomerans*), e *Citrobacter* (*C.freundii*), lactobacilos (*L. brevis* e *L. buchneri*) e clostrídiums dos grupos *C. butyricum* e *C. parteurianum* (Chen et al., 2003, Cheng et al., 2005, Barbirato et al., 1998, Biebl et al., 1992).

O hidrogênio é uma fonte de combustível ideal, pois quando queimado no ar, produz energia limpa sem poluição e sem produção de gases do efeito estufa (Cheong & Hansen, 2007). Para a produção de hidrogênio e etanol, poucos estudos têm sido realizados utilizando glicerol residual como fonte de carbono. O trabalho desenvolvido por Ito et al (2005), é um dos únicos artigos voltados especificamente para a produção de etanol e H₂ a partir do glicerol residual proveniente da produção de biodiesel. Neste trabalho, os autores utilizaram o microrganismo *Enterobacter aerogenes* HU-101, isolado de um lodo metanogênico. Os resultados com fermentações batelada mostraram bons rendimentos de etanol e H₂ com glicerol residual (0,67 mol/mol glicerol e 0,71 mol/mol glicerol, respectivamente), quando comparados com ensaios com glicerol puro (0,89 mol/mol glicerol e 0,86 mol/mol glicerol, respectivamente).

Vários trabalhos publicados citam a utilização de lodo de tratamentos domésticos ou industriais como substrato para a produção fermentativa de hidrogênio e subprodutos, como etanol e ácidos. O lodo oferece várias vantagens sobre o uso de outras fontes de biomassa, pois é disponível a pouco ou nenhum custo e é produzido em grandes quantidades (Massanet-Nicolau et al., 2008, Cheong & Hansen, 2006). Um grande número de espécies de bactérias (isto é, anaeróbios obrigatórios e facultativos, aeróbios, cinobactérias e bactérias fotossintéticas) têm se mostrado produtores de hidrogênio (Cheong & Hansen, 2006).

O presente trabalho teve como objetivo utilizar glicerol comercial e glicerol residual, proveniente da produção de biodiesel, como fonte de carbono para a produção de subprodutos como 1,3 Propanodiol e hidrogênio utilizando consórcio microbiano ambiental.

2- Materiais e Métodos

2.1- Obtenções do lodo e do glicerol residual

O lodo foi obtido de um reator UASB proveniente de uma empresa local (Solae Company, Brazil). O glicerol residual foi obtido da empresa BsBios (Passo Fundo, RS,

Brazil). O glicerol residual continha: 80,93% de glicerol, 6,65% NaCl e o restante era composto de umidade e cinzas. O pH é de 7,26.

2.2- Cultivos em bioreatores

Nos experimentos foram utilizados bioreatores submersos de volume 2L com 70g/L de glicerol residual de grau de pureza 80,93%. Um experimento controle com glicerol comercial foi realizado nas mesmas condições. Os reatores foram inoculados com 10% de consórcio microbiano ambiental, previamente tratado (20 min. a 90°C). As condições de operação foram: T: 35°C, pH 7,0, 250 rpm. O meio de cultivo utilizado continha: 4 g (NH₄)₂SO₄; 0,125 g K₂HPO₄; 0,12 g MgSO₄. 7H₂O; 0,025g FeSO₄. 7H₂O; 0,005 g CuSO₄. 5H₂O; 0,125 g CoCl₂.6H₂O. Os reatores operaram em anaerobiose com adição inicial de nitrogênio.

2.3 – Análises cromatográficas

A análise dos produtos formados foi determinada por cromatografia de alto desempenho (HPLC), equipamento Shimadzu equipado com uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) e detector de índice de refração, fase móvel ácido sulfúrico 0,005 M (0,8 mL/min) na temperatura de 65°C. Análises de hidrogênio foram realizadas por cromatografia gasosa utilizando uma coluna Poropaq Q.

3- Resultados e discussão

Os ensaios realizados em bioreator com consórcio microbiano ambiental tiveram bons resultados com relação à utilização do glicerol. Ambos os cultivos, com glicerol residual e comercial, consumiram a quantidade total de glicerol em 48 horas. As figuras 1 e 2, mostram os cultivos realizados com glicerol comercial e glicerol residual, respectivamente.

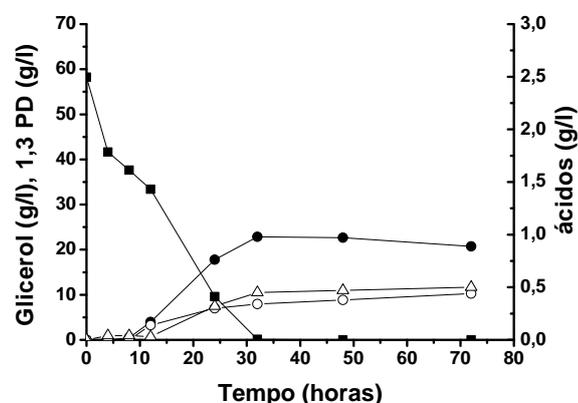


Figura 1. Cultivo anaeróbico com glicerol comercial. Os símbolos indicam: (- ■ -) glicerol residual, (-●-) 1,3 propanodiol, (-○-) ácido acético, (-△-) ácido butírico.

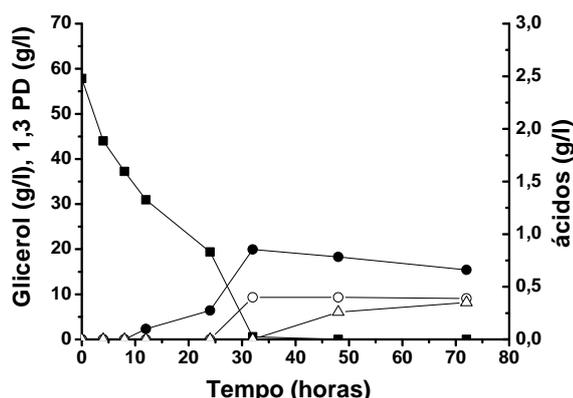


Figura 2. Cultivo anaeróbico com glicerol residual. Os símbolos indicam: (- ■ -) glicerol residual, (-●-) 1,3 propanodiol, (-○-) ácido acético, (-△-) ácido butírico.

De acordo com a figura 1, pode-se observar o total consumo do glicerol comercial em 32 horas com uma produção de 1,3 Propanodiol máxima de 22,84 g/l. A produção com glicerol residual foi um pouco menor, 19,92 g/l, mas houve um consumo total de glicerol após 32 horas de cultivo. As tabelas 1 e 2 mostram os resultados dos cultivos em bioreatores.

Tabela 1: Cultivo com glicerol comercial.

Tempo (h)	Glicerol (g/l)	1,3propanodiol (g/l)	Acido Acético (g/l)	Acido butírico (g/l)
0	58,24	0	0	0
4	41,65	0	0	0,04
8	37,65	0,46	0	0,04
12	33,4	3,99	0,14	0,03
24	9,6	17,77	0,3	0,32
32	0,1	22,84	0,34	0,45
48	0	22,66	0,38	0,47
72	0	20,73	0,44	0,5

Tabela 2: Cultivo com glicerol residual.

Tempo (h)	Glicerol (g/l)	1,3propanodiol (g/l)	Acido Acético (g/l)	Acido butírico (g/l)
0	57,83	0	0	0
4	44	0	0	0
8	37,24	0	0	0
12	30,94	2,33	0	0
24	19,4	6,4	0	0
32	0,6	19,92	0,4	0
48	0	18,29	0,4	0,26
72	0	15,4	0,39	0,35

Os rendimentos foram de 0,40 mol/mol com glicerol comercial e 0,44 mol/mol com glicerol residual mostrando-se próximos aos resultados obtidos por outros autores (Zeng et al., 1997). Houve a produção de ácidos em pequenas quantidades durante a fermentação, como mostrado nas figuras 1 e 2. Estes ácidos estão relacionados com os bioprodutos de fermentação das bactérias existentes no consórcio microbiano. Enterobactérias, como *klebsiella*

pneumoniae e *Citrobacter freundii* tem como principais bioprodutos ácido acético e etanol. Já espécies de *Clostridium* são conhecidas por formar somente ácido butírico como bioproduto. Isto indica que o consórcio microbiano utilizado neste trabalho continha ambas as espécies citadas.

A produção de hidrogênio foi realizada em apenas uma coleta de amostra do bioreator com glicerol residual, em 24 horas de cultivo. Foi observado um rendimento de 0,3 mol/mol de hidrogênio com uma taxa de produtividade volumétrica de 0,62 mmol.l⁻¹.h⁻¹. Os resultados de produtividade para o hidrogênio variam muito na literatura, sendo que a maior parte das publicações utiliza açúcar como fonte de carbono.

4. Conclusão

A degradação do glicerol residual pela ação de microorganismos presente no lodo foi totalmente satisfatória, visto que ocorreram 100% de degradação do mesmo, somado ao fato da produção de 1,3-propanodiol, produto altamente utilizado como precursor na indústria química e farmacêutica. No presente processo o lodo utilizado torna-se uma alternativa viável para diminuir custos de produção e impacto ambiental.

4. Próximas etapas

De acordo com os resultados obtidos nos bioreatores, as etapas seguintes que já foram realizadas foram o isolamento das bactérias do lodo em experimento idêntico ao apresentado neste artigo com glicerol residual e a seleção das bactérias isoladas também já foram realizadas. Cultivos com as bactérias isoladas estão em andamento para identificar as melhores produtoras de 1,3 propanodiol e hidrogênio. As próximas etapas a serem realizadas serão:

- Identificação das bactérias produtoras por técnica de 16S rRNA e testes bioquímicos;
- Estratégias em bioreatores batelada e batelada alimentada com controle de parâmetros como pH, temperatura e aeração;
- Planejamento experimental para otimizar as condições de cultivo;

6. Agradecimentos

À CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

7. Referências

1. BARBIRATO, F., HIMMI, E.H., CONTE, T., BORIES, A. 1,3 propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Industrial Crops and Products*, v.7, p.281-289, 1998.

2. BIEBL, H., MARTEN, S., HIPPE, H., DECKWER, W.D. Glycerol conversion to 1,3 propanediol by newly isolated clostridia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.36, p.592-597, 1992.
3. CHEN, X., XIU, Z., WANG, J., ZHANG, D., XU, P. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol bioconversion to 1,3 propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. *Enzyme and Microbial Biotechnology*, v. 33, p.386-394, 2003.
4. CHEONG, D & HANSEN, C.L. Feasibility of hydrogen production in thermophilic mixed fermentation by natural anaerobes. *Bioresource Technology*, v.98, p.2229-2239, 2007.
5. DECKWER, W.D. Microbial conversion of glycerol to 1,3 propanediol. *FEMS Microbiology Reviews*, v.16, p.143-149, 1995.
6. ITO, T., NAKASHIMADA, Y., SENBA, K., MATSUI, T., NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 100, p.260-265, 2005.
7. MASSANET-NICOLAU, J., DINSDALE, R., GUWY, A. Hydrogen production from sewage sludge using mixed microflora inoculums: Effect of pH and enzymatic pretreatment. *Bioresource Technology*, v.99, p.6325-6331, 2008.
8. YAZDANI, S.S & GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion Biotechnology*, v.18, p. 213-219, 2007.
9. ZENG, A.P., BIEBL, H., DECKWER, W.D. Microbial conversion of glycerol to 1,3 Propanediol: Recent progress. American chemical Society, 1997.