

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a produção de bio-combustíveis alternativos têm sido bastante significativa, em vista de haver um limite das reservas de combustíveis fósseis, tais como petróleo e carvão. Dentre as fontes alternativas, a produção de biodiesel se apresenta com alto potencial. O problema na produção deste combustível, através de reação de transesterificação, é a grande geração do co-produto glicerol (glicerina), uma vez que ele representa 10% da produção. Logo em breve, no Brasil e no mundo, o glicerol vai passar a ser um subproduto excedente, acarretando a sua desvalorização no mercado. Uma alternativa para a valorização do mesmo, é a sua conversão em bioprodutos de grande procura comercial, como 1,3-PD (monômero básico na indústria de polímeros), PHAs (polihidroxialcanoatos), ácido cítrico, bioplásticos, produção de enzimas como lipases, hidrogênio e etanol.

## OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi selecionar bactérias capazes de utilizar o glicerol residual proveniente da produção de biodiesel como fonte de carbono para obtenção de hidrogênio e etanol.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados experimentos anaeróbicos em agitador orbital (Marconi, MA 830) com 32 bactérias isoladas de um consórcio microbiano obtido da parte inferior de um reator UASB proveniente da empresa Solae Company, Brasil. Este consórcio foi coletado em frascos “Duran” de 2L e mantido refrigerado a 4 °C por no máximo 30 dias.

O meio utilizado para a fermentação em agitador orbital continha (g.L<sup>-1</sup>): 4 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,52 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,5 g extrato de levedura, 1g peptona bacteriológica, 1 mL de elemento traço, 30 glicerol residual. A solução traço foi composta por (g.L<sup>-1</sup>): 0,1 MnCl<sub>2</sub>. 4 H<sub>2</sub>O; 0,06 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,0037 CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O; 0,2 CoCl<sub>2</sub>. 6 H<sub>2</sub>O; 0,025 NiCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O; 0,035 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. 2 H<sub>2</sub>O; 0,14 ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O; 0,9 mL HCl 37 %, esta que foi a mesma em todos os experimentos.

O pré-inóculo foi preparado em frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio, os quais foram inoculados e incubados a 35 °C e 150 rpm, overnight, para preparo dos inóculos. Os cultivos anaeróbicos foram realizados em frascos de penicilina hermeticamente lacrados de 60 mL de volume com 30 mL de meio de cultura. As bactérias foram inoculadas a 5 % (v/v) com uma seringa hipodérmica nos frascos lacrados com tampas de borracha e selos de alumínio. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

Para garantir as condições anaeróbicas, o meio utilizado foi pré-aquecido durante 20 minutos, esfriado a temperatura ambiente e borbilhado com nitrogênio.

A identificação e quantificação dos produtos formados, bem como do glicerol consumido, foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG).

**CLAE:** Shimadzu, equipado com uma coluna Aminex HPX-87H da Bio-Rad (300 mm X 7,8 mm e 9 micra de tamanho de partícula) e detector de índice de refração. Ácido sulfúrico 0,005 M (0,8 mL.min<sup>-1</sup>) na temperatura de 65°C foi usado como fase móvel. A aquisição dos dados foi feita com o programa LC Solution.

**CG:** [H<sub>2</sub>] determinado em um cromatógrafo Agilent modelo 6890N, com detector de condutividade térmica e válvula de injeção para gases de 10 vias, configurada com reversão de fluxo. Coluna empacotada Poropak Q, 80 a 100 mesh, (6 pés X 1/8” de Φ externo). Condições de análise: temperatura do forno de 80° C (isotérmico); temperatura da válvula (valve Box) 60° C; temperatura do detector de 150 ° C; gás de arraste N<sub>2</sub> com fluxo de 18 mL.min<sup>-1</sup>. O sistema de aquisição de dados foi o “TotalChrom Client/Server”.

## RESULTADOS

Das 32 bactérias selecionadas, quatro apresentaram capacidade de degradação do glicerol e produção de hidrogênio e etanol. As outras bactérias não apresentaram capacidade de produzir produtos de valor agregado nem degradar o glicerol.

A Figura 1 apresenta os resultados referentes ao cultivo anaeróbio, onde foi observado a maior produção de hidrogênio para o isolado 1 com uma produção de 31,16% mol de hidrogênio seguido pela isolado número 5 com 18,95 % mol de hidrogênio.

O glicerol do meio foi quase totalmente consumido pelo isolado 1, apresentando uma degradação de em torno de 98%.

No cultivo anaeróbio juntamente com o hidrogênio formado foi observada a formação de 6,88 g.L<sup>-1</sup> de 1,3-propanodiol, uma produção de 2,52 g.L<sup>-1</sup> de etanol e pequenas quantidades de ácido acético e ácido láctico.

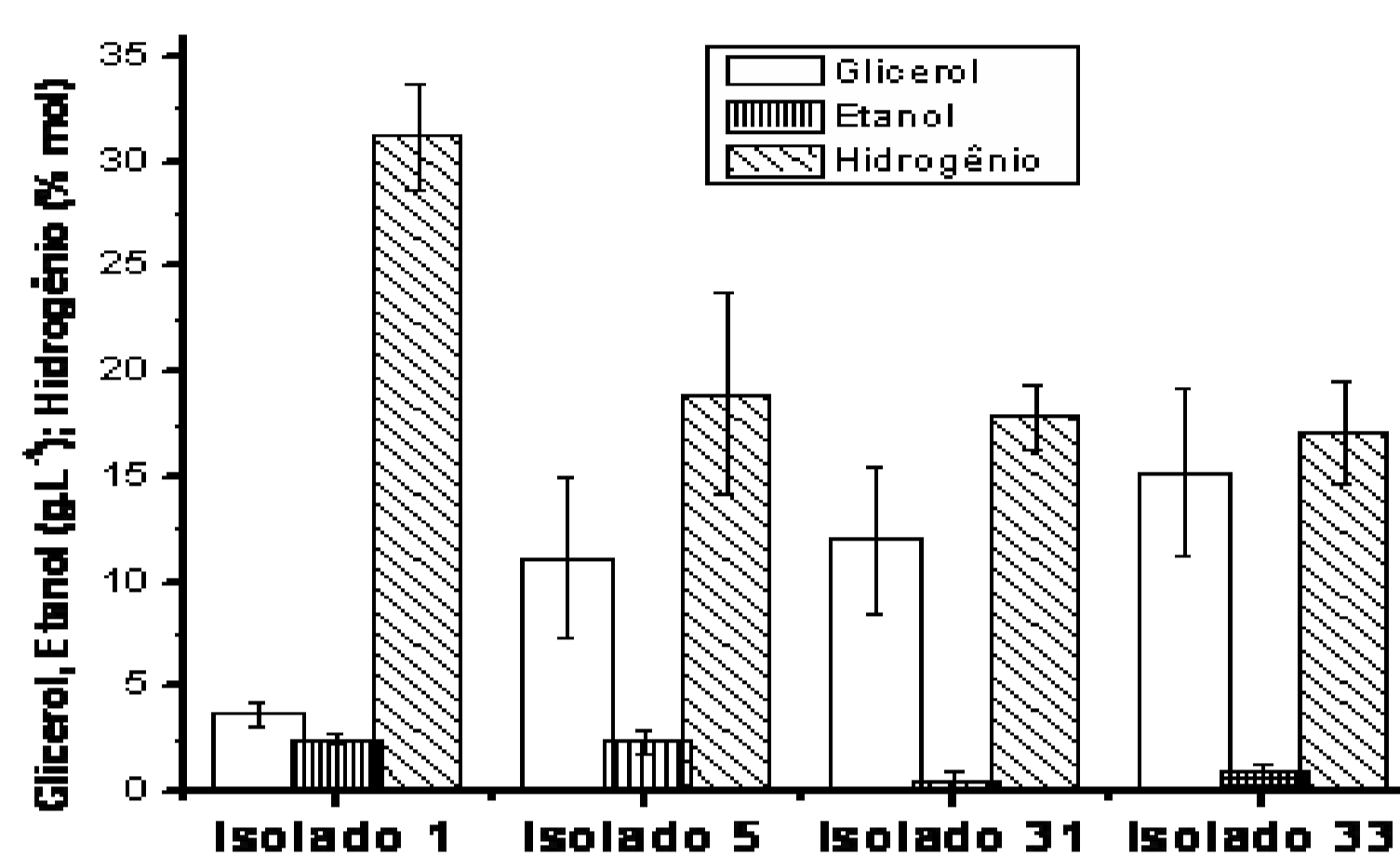


Figura 1 : Ensaio anaeróbio. Quantidade de glicerol não degradado (g.L<sup>-1</sup>), etanol (g.L<sup>-1</sup>) e hidrogênio (% mol) produzidos

A Figura 2 apresenta exemplos de dois cromatogramas de CLAE para determinação dos compostos em fase líquida referente ao cultivo anaeróbio da bactéria 1, nos tempos 0 e 24 horas de cultivo. No primeiro cromatograma referente ao início do cultivo, observa-se apenas o pico do glicerol (30 g.L<sup>-1</sup>). Os dois picos nos tempos de retenção 5 e 6 minutos referem-se aos sais do meio de cultivo. (Figura 2A).

Em 24 horas de cultivo, percebe-se a degradação do glicerol, uma vez que há decréscimo da área do pico correspondente a este composto, cuja área correspondeu a concentração de 3,69 g.L<sup>-1</sup>. A formação de etanol foi observada, através do pico cromatográfico em 16 minutos (tempo do padrão de etanol). Como mencionado foi também verificado a presença de outros subprodutos tais como ácido láctico, ácido acético e 1,3-propanodiol, picos correspondentes aos tempos de 9,66; 11,08 e 13,09 minutos, respectivamente (Figura 2B),

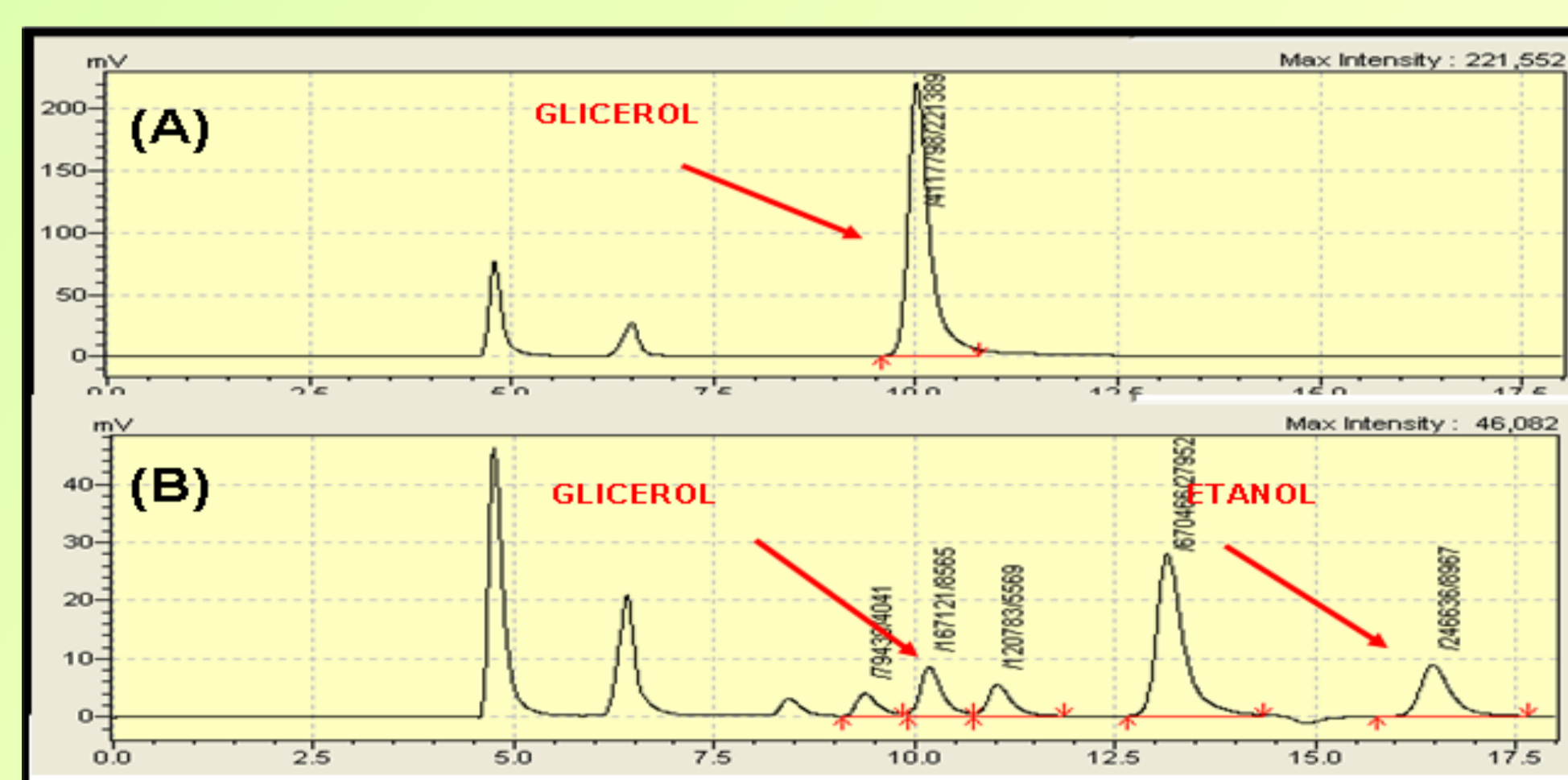


Figura 2: Cromatogramas das análises dos produtos de fermentação bem como degradação do glicerol referente ao cultivo anaeróbio para o isolado 1 realizado em agitador orbital. (A) zero hora de cultivo; (B) 24 horas de cultivo.

## CONCLUSÕES

- A degradação do glicerol pela ação de microorganismos foi totalmente satisfatória, com 98% de degradação;
- Houve produção de produtos de valor comercial tais como hidrogênio, etanol e 1,3 – propanodiol.
- O processo sugere uma alternativa para decréscimo do impacto ambiental bem como custos de destino a um resíduo gerado da produção de biodiesel..