

## Produção de Butanol a partir de Glicose via Processo Biológico Anaeróbico

Alexandre de Araujo Guilherme<sup>1</sup>  
Maria Cristiane Rabelo<sup>2</sup>  
Gustavo Adolfo Saavedra Pinto<sup>3</sup>  
Renato Carrhá Leitão<sup>4</sup>

### Introdução

Diversos estudos têm sido desenvolvidos para produção de combustíveis provenientes de fontes renováveis visando à minimização de impactos ambientais, incluindo a diminuição de emissões de gases de efeito estufa. Nesse sentido, o butanol é uma alternativa promissora, já que pode ser produzido pela via fermentativa de substratos provenientes de biomassa (LIN et al., 2011), podendo, conforme alguns autores, substituir a gasolina sem qualquer modificação nos motores dos veículos atuais (GREEN, 2011; ATSUMI et al., 2008).

Várias linhagens de microrganismos estritamente anaeróbios estão sendo utilizadas em processos fermentativos para produção de butanol. A maioria é dos gêneros *Clostridium*, *Butyrivibrio*,

*Butyribacterium*, *Sarcina*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* e *Megasphera* (NI; SUN, 2009). As principais linhagens utilizadas industrialmente para a produção de acetona-butanol-etanol (ABE) são: *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. Saccharobutylicum* e *C. Saccharoperbutylacetonicum*. A cepa *C. acetobutylicum* ATCC 824 é a mais usada para produção de butanol.

Um dos principais fatores que influenciam o rendimento do processo de produção de butanol é a composição dos meios de cultura. Estes podem ser diferentes para as fases de incubação, de propagação do inóculo e de fermentação, ou ainda podem ser diferentes de acordo com as cepas utilizadas. A maior parte dos meios consiste de extrato de levedura, glicose,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,

<sup>1</sup> Engenheiro de alimentos, doutor em Engenharia Química, bolsista DTI-A (CNPq) na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, alexandredearaujoguilherme@gmail.com

<sup>2</sup> Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia Química, bolsista DTI-C (CNPq) na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, tianerabelo@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Químico, doutor em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, gustavo.saavedra@embrapa.br

<sup>4</sup> Engenheiro civil, doutor em Ciências Ambientais, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, renato.leitao@embrapa.br

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaCl e acetato de amônio, entre alguns microelementos e vitaminas (LI et al., 2014).

Nesta pesquisa, estabeleceram-se as condições nutricionais de processo para produção de butanol a partir de glicose como fonte de carbono e energia via rota biológica anaeróbia, em escala de bancada.

## Microrganismos utilizados, ativação e inóculo

As bactérias estudadas neste processo foram do gênero *Clostridium*: *Clostridium acetobutylicum* CCT 0485, que corresponde à cepa *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA), e *Clostridium acetobutylicum* CCT 0424, que corresponde à cepa *Clostridium acetobutylicum* NRRL B-519 da ARS (*Agricultural Research Service*, NRRL *Culture Collection*, Peoria, IL).

Para a ativação, 500  $\mu\text{L}$  da cultura estoque foram repicados em tubos de ensaios rosqueáveis com volume de 20 mL, contendo 5 mL de meio RCM (*Reinforced Clostridial Medium*), acondicionados em jarra de anaerobiose e incubados em condições estáticas a  $37 \pm 1$  °C por 24 horas. Após o período de incubação, para a propagação do inóculo a ser empregado nos experimentos, 500  $\mu\text{L}$  das culturas crescidas durante a ativação foram novamente repicadas em meio RCM. A propagação ocorreu por 12 horas nas mesmas condições de ativação.

## Produção de butanol em escala de bancada

Para se estabelecer as condições nutricionais para a produção de butanol em escala de bancada, foram realizados ensaios com as duas cepas e dois meios de cultivo, sendo um deles o RCM (Tabela 1) e o outro de acordo com Gungormusler et al. (2010) (Tabelas 2 e 3). A quantidade de glicose foi de 80 g/L em todos os ensaios, de acordo com o recomendado por Monot et al. (1982).

As condições operacionais foram: Frascos Schott de 250 mL como biorreator usando 100 mL de volume reacional, glicose 80 g/L, meio de cultivo RCM como suplemento nutricional, pH 6,5, temperatura de 37,0 °C, agitação de 100 rpm, 10% de inóculo, anaerobiose com purga de nitrogênio por 1 min e 10 dias de processo.

**Tabela 1.** Composição do meio de cultivo RCM.

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	3,0
Extrato de carne	10,0
Peptona	10,0
Amido solúvel	1,0
Glicose	-
Cloreto de cisteína	0,5
Cloreto de sódio	5,0
Acetato de sódio	3,0
Agar	0,5

Fonte: United States Pharmacopeia Convention (2009).

**Tabela 2.** Composição do meio de cultivo para a produção de butanol segundo Gungormusler et al. (2010).

Componente	Concentração (g/L)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,015
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005
Extrato de levedura	1,0
Glicose	-
Solução elemento-traço	2,0 mL/L
Biotina	0,01
Ácido p-aminobenzoico	0,01

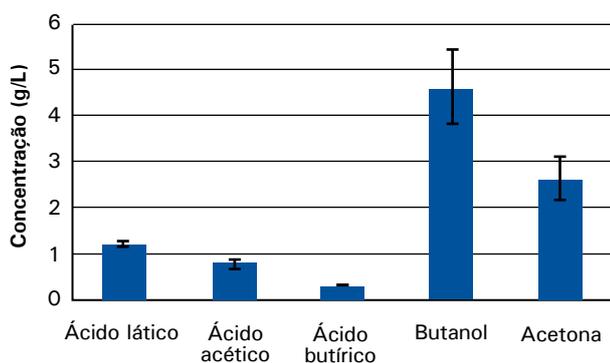
Fonte: Gungormusler et al. (2010).

**Tabela 3.** Composição da solução de elemento-traço do meio de cultivo para a produção de butanol segundo Gungormusler et al. (2010).

Componente	Concentração (g/L)
$\text{ZnCl}_2$	0,07
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,06
$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,035
HCl (37%)	0,9 (mL/L)

Fonte: Gungormusler et al. (2010).

A Figura 1 apresenta os melhores resultados das concentrações dos metabólitos gerados durante o processo de produção de butanol onde se utilizou a cepa *Clostridium acetobutylicum* NRRL B-519 em meio de cultivo RCM. Pode-se observar uma produção de 4,6 g/L de butanol e 2,6 g/L de acetona, não sendo detectada a produção de etanol. Outros metabólitos também foram produzidos (1,3 g/L de ácido láctico, 0,8 g/L de ácido acético e 0,3 g/L de ácido butírico). Tais ácidos são produzidos e assimilados pelo microrganismo para a formação de butanol na fase de solventogênese.



**Figura 1.** Produção de metabólitos durante o processo biológico anaeróbio para produção de butanol com a cepa *Clostridium acetobutylicum* NRRL B-519 em meio de cultivo RCM.

Com base nos resultados obtidos, recomenda-se os seguintes procedimentos para a produção de butanol em escala de bancada, usando glicose como substrato:

- (1) Utilizar cepa *Clostridium acetobutylicum* NRRL B-519.
- (2) Etapa de ativação: usar meio de cultivo RCM com 24 horas de incubação.
- (3) Etapa de propagação de inóculo: usar meio de cultivo RCM com 12 horas de incubação.
- (4) Etapa de produção: usar frascos Schott de 250 mL como biorreator, com 100 mL de volume reacional, 80 g/L de glicose e meio de cultivo RCM como suplemento nutricional. Ajustar pH inicial em 6,5, temperatura de 37,0 °C, agitação de 100 rpm. Utilizar 10% (v/v) da suspensão de biomassa celular obtida na etapa de propagação do inóculo para iniciar o processo. Estabelecer condição de anaerobiose com purga de nitrogênio por 1 min. O tempo de processo deve ser de 10 dias.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Financiadora de Estudos e Projetos (Finep), Edital 0017/11, e ao CNPq pelas bolsas DTI, ambos recursos vinculados ao projeto intitulado “Estratégias genômicas e agregação de valor para a cadeia produtiva do dendê”.

## Referências

- ATSUMI, S.; CANN, A. F.; CONNOR, M. R.; SHEN, C. R.; SMITH, K. M.; BRYNILDSEN, M. P.; CHOU, K. J. Y.; HANAII, T.; LIAO, J. C. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. **Metabolic Engineering**, v.10, p. 305-311, 2008.
- GREEN, E. M. Fermentative production of butanol - the industrial perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p.337-343, 2011.
- GUNGORMUSLER, M.; GONEN, C.; OZDEMIR, G.; AZBAR, N. 1,3-Propanediol production potential of *Clostridium saccharobutylicum* NRRL B-643. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6. 2010.
- LI, J.; BARAL, N. R.; JHA, A. K. Acetone-butanol-ethanol fermentation of corn stover by *Clostridium* species: present status and future perspectives. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 30, p.1145-1157, 2014.
- LIN, Y. S.; WANG, J.; WANG, X. M.; SUN, X. H. Optimization of butanol production from corn straw hydrolysate by *Clostridium acetobutylicum* using response surface method. **Chinese Science Bulletin**, v. 56, p.1422-1428, 2011.
- MONOT, F.; MARTIN, J.; PETITDEMANGE, H.; GAY, R. Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 6, p.1318-1324, 1982.
- NI, Y.; SUN, Z. Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 83, n. 3, p. 415-23. 2009. doi: 10.1007/s00253-009-2003-y. Epub 2009 May 9.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION. **Microbiological Examination of Nonsterile Products: Tests for Specified Microorganisms** 2. ed. Rockville, MD, 2009. Cap. 62, p.166.

**Comunicado  
Técnico, 221**



Unidade responsável pelo conteúdo e edição:  
**Embrapa Agroindústria Tropical**  
**Endereço:** Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici  
CEP 60511-110 Fortaleza, CE  
**Fone:** (85) 3391-7100  
**Fax:** (85) 3391-7109 / 3391-7141  
**E-mail:** [www.embrapa.br/fale-conosco](http://www.embrapa.br/fale-conosco)

1ª edição (2016): disponibilizada on-line no  
formato PDF

**Comitê de  
Publicações**

**Presidente:** *Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*  
**Secretária-executiva:** *Celli Rodrigues Muniz*  
**Secretária-administrativa:** *Eveline de Castro Menezes*  
**Membros:** *Janice Ribeiro Lima, Marlos Alves Bezerra,  
Luiz Augusto Lopes Serrano, Marlon Vagner Valentim  
Martins, Guilherme Julião Zocolo, Rita de Cássia Costa  
Cid, Eliana Sousa Ximendes.*

**Expediente**

**Supervisão editorial:** *Sérgio César de França Fuck Júnior*  
**Revisão de texto:** *Marcos Antônio Nakayama*  
**Normalização bibliográfica:** *Rita de Cassia Costa Cid*  
**Editoração eletrônica:** *Arilo Nobre de Oliveira*