

Foto: Renato Carrhá Leitão



Produção Biológica de Ácido Caproico em um Reator em Escala de Laboratório

Renato Carrhá Leitão¹
Tito Augusto Gehring²
Willame de Araújo Cavalcante³
Isabele Baima Ferreira Freitas⁴
Aldo Souza Colares⁵
Adrianus Cornelius van Haandel⁶
Largus T. Angenent⁷
Sandra Tédde Santaella⁸

Introdução

O ácido caproico é um ácido graxo de cadeia média, com seis átomos de carbono, que é principalmente utilizado como aromatizante (YAN et al., 2015; VAN LAERE et al., 2008). No entanto, ele pode ser empregado como aditivo em rações de suínos e aves, atuando

como controlador de bactérias entéricas ou como matéria-prima para produção de biocombustível (hexanol) (WASEWAR; SHENDE, 2010).

A produção de ácido caproico pode ser realizada a partir da fermentação anaeróbia de etanol e ácido acético, em um processo

¹ Engenheiro civil, doutor em Ciências Ambientais, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, renato.leitao@embrapa.br

² Engenheiro sanitário e ambiental, doutor em Engenharia Civil e Ambiental, pós-doutorando e bolsista BJT na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, titogehring@rub.de

³ Cientista ambiental, mestre em Engenharia Civil pela Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, SP, willdeac@gmail.com

⁴ Cientista ambiental, mestranda no Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, SP, isabelebaima@hotmail.com

⁵ Graduando em Engenharia Química pela Universidade Federal do Ceará, bolsista PIBIC, Fortaleza, CE, aldoscolares@gmail.com

⁶ Engenheiro químico, doutorado em Engenharia Civil, professor-adjunto da Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, adrianusvh@gmail.com

⁷ Cientista ambiental, doutor em Engenharia Ambiental, professor na Universidade de Cornell, Departamento de Engenharia Biológica e Ambiental, EUA, la249@cornell.edu

⁸ Química, doutora em Hidráulica e Saneamento, professora associada da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, sandra@ufc.br

de alongamento de cadeia carboxílica (AGLER et al., 2011). De forma geral, o processo de alongamento de cadeia carboxílica a partir de etanol e ácido acético pode ser descrito em: a) parte do etanol é oxidado formando ácido acético e produzindo ATP; b) outra parte é convertida em acetil-CoA, fazendo o alongamento de cadeia carboxílica de acetato a n-butirato em uma rota cíclica, usando CoA, NADH e FADH₂ para acoplamento de acetil-CoA a butiril-CoA; c) alongamento de cadeia carboxílica a n-caproato a partir de n-butirato e etanol em uma rota cíclica semelhante à anterior, acoplando butiril-CoA a hexanoil-CoA. Resumindo, esse alongamento é um processo redox, no qual o material orgânico mais oxidado (ácido acético, com 2 carbonos) reage com o material orgânico mais reduzido (etanol) formando ácido butírico, com 4 carbonos. Em uma etapa seguinte, o ácido butírico reage com de etanol para formar ácido caproico (com 6 carbonos). Nesse processo, são necessários 12 mols de etanol e 3 mols de ácido acético para formar 5 mols de ácido caproico, ou seja, a relação teórica para formação de ácido caproico é de 4:1 etanol:ácido acético (mol:mol) (SPIRITO et al., 2014).

Os primeiros estudos sobre o processo biológico de alongamento de cadeia carboxílica a partir de ácidos graxos de cadeia curta (com menos que 6 carbonos) foram detalhados por Barker e Taha (1942) e Barker et al. (1945), quando utilizaram uma cultura pura de *Clostridium Kluyveri* para produção de ácido caproico e observaram que esse microrganismo foi capaz de produzir ácido butírico e ácido caproico em um meio contendo ácido acético e etanol.

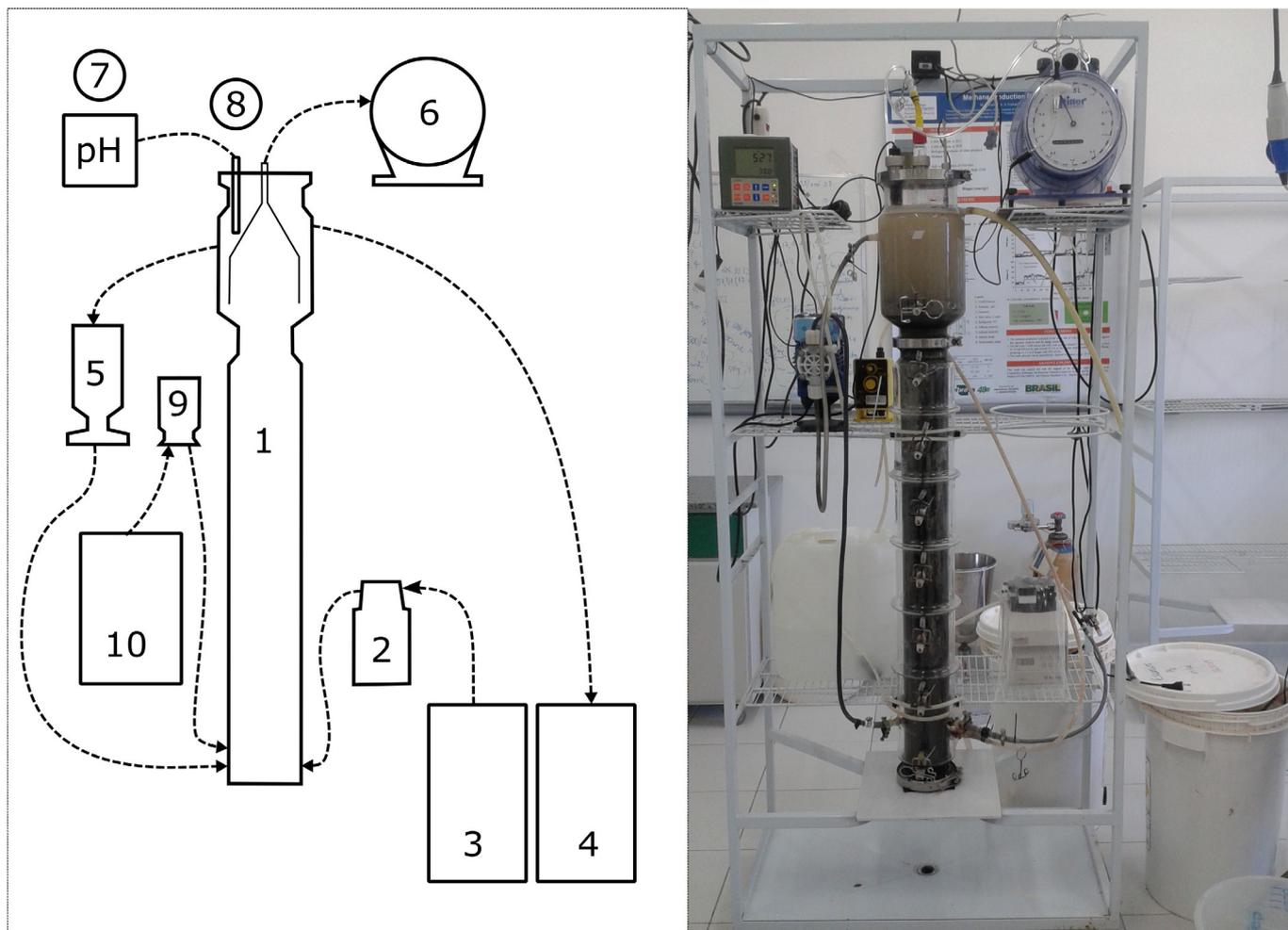
Em certas aplicações, em que é necessária a degradação de substratos complexos como subprodutos agroindustriais, o uso de culturas mistas em processos biotecnológicos anaeróbios oferece vantagens maiores quando comparado ao uso de cultura pura,

como: sintrofismo, facilidade de controle e uso de substratos orgânicos diversos. Por essa razão, a produção de ácido caproico em culturas mistas anaeróbias está sendo estudada mais intensamente (DING et al., 2010; STEINBUSCH et al., 2011; ARSLAN et al., 2012; GROOTSCHOLTEN et al., 2013; WEIMER, 2015).

No presente comunicado, descrevem-se os procedimentos para produção biológica de ácido caproico em reator anaeróbio contínuo, em escala de laboratório, inoculado com cultura mista (lodo anaeróbio de estação de tratamento de efluentes de uma indústria cervejeira) e usando etanol e ácido acético como substratos.

Operação do reator anaeróbio em escala de laboratório

No experimento realizado na Embrapa Agroindústria Tropical, utilizou-se um reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente – *Upflow anaerobic sludge blanket* (UASB), em escala de laboratório, instalado no Laboratório de Tecnologia da Biomassa (Figura 1). Esse reator foi construído em vidro borossilicato, com diâmetro de 0,10 m, altura de 1,35 m e volume útil de 13,8 L. O pH foi controlado automaticamente usando-se solução de hidróxido de sódio 1,0 N (NaOH). O biogás produzido no reator foi monitorado por um gasômetro marca Ritter e analisado por cromatografia gasosa para determinação da concentração de CO₂, CH₄ e H₂. Utilizou-se lodo granular de um reator UASB de estação de tratamento de efluentes de indústria cervejeira como inóculo. O reator foi operado durante 165 dias, com carga orgânica volumétrica (COV) de até 5 kgDQO/(m³.d). A alimentação foi realizada com substratos simples (etanol e ácido acético), na relação 4:1 (mol:mol). A taxa de produção de ácido caproico atingiu valores de, aproximadamente, 1,0 kgC₆/(m³_{reator}.d).

**Legenda:**

- (1) Reator UASB.
- (2) Bomba de alimentação.
- (3) Reservatório com substrato.
- (4) Reservatório de efluente.
- (5) Bomba de recirculação.
- (6) Medidor de biogás.
- (7) Medidor/controlador de pH.
- (8) Sensor de pH.
- (9) Bomba dosadora de solução NaOH para controle de pH.
- (10) Reservatório com solução de NaOH.

Figura 1. Esquema (esquerda) e fotografia (direita) do reator UASB para produção de ácido caproico.

Figura adaptada de Cavalcante (2016).

Recomendações para produção de ácido caproico em um reator anaeróbio em escala de laboratório

A produção de ácido caproico pode ser realizada em reator de fluxo contínuo, tipo UASB, operado com carga orgânica volumétrica de $5 \text{ kgDQO}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$, alimentado

com uma solução contendo $6,9 \text{ g/L}$ de etanol e $2,2 \text{ g/L}$ ácido acético (relação 4:1 mol:mol). Para suplementação nutricional, é necessário adicionar ao afluente a solução nutritiva e os elementos traço descritos na Tabela 1, adaptada de Ding et al. (2010), Steinbruch et al. (2011), Grootscholten et al. (2013) e Thomas (2015).

Tabela 1. Concentração de nutrientes a ser mantida no afluente de sistema produtor de ácido caproico.

Solução nutritiva	Concentração (mg L ⁻¹)	Elementos traço	Concentração (mg L ⁻¹)
MgCl ₂ .6H ₂ O	100	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,03
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.080	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,03
MgSO ₄ .7H ₂ O	60	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,06
CaCl ₂ .2H ₂ O	60	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,09
KCl	45	NaMo ₄ .2H ₂ O	0,09
FeCl ₂ .4H ₂ O	4,50	H ₃ BO ₃	0,90
Extrato de levedura	600	CoCl ₂	0,03
		Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O	0,03

O reator deve ser inoculado com lodo proveniente de um reator anaeróbio de indústria cervejeira ou de amido, com elevada atividade metanogênica. Toda a região de digestão do reator deve ser preenchida com esse lodo. O excesso de inóculo sairá com o efluente ao longo da operação. A partida do reator deve ser realizada por meio do aumento gradativo da *COV*.

A alimentação do reator deverá ser feita por bomba dosadora, ajustada para operar com vazão de 4,1 L/d. Para melhorar a mistura interna, deve-se utilizar uma bomba dosadora que coletará o líquido no separador de fases do reator UASB e bombeará para a base do reator, realizando uma recirculação. A vazão da bomba de recirculação deve ser ajustada de forma a promover velocidade interna ascendente (*V_{up}*) de 0,6 m/h.

A *COV* e *V_{up}* são calculadas pelas equações 1 e 2.

$$COV = \frac{DQO \times Q}{v} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$V_{up} = \frac{Q}{24000 \times A} \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que:

COV é a carga orgânica volumétrica (g/(L.d)).

DQO é a concentração de matéria orgânica no afluente em termos de demanda química de oxigênio (gDQO/L).

Q é a vazão afluente (L/d).

V_{up} é a velocidade ascendente interna no reator (m/h).

A é a área transversal do reator na região de digestão (m²).

A atividade metanogênica do lodo anaeróbio deve ser inibida a partir do primeiro dia de operação, impondo-se pH na faixa de 5,0 a 5,3 pela adição de HCl ou NaOH (1 N). Isso é necessário para evitar que as arqueas metanogênicas consumam o ácido acético para formar metano, reduzindo a disponibilidade desse substrato para o alongamento de cadeia e produção de ácido caproico (AGLER et al., 2012; ANGENENT; AGLER, 2014). A adição da solução de HCl ou NaOH deve ser feita automaticamente por meio de bombas peristálticas acionadas por

um controlador de pH. O sensor de pH deve ficar localizado na linha de recirculação.

O monitoramento do reator deve ser feito com medições de ácidos orgânicos usando cromatografia gasosa (CG) ou líquida (HPLC). O biogás produzido deve ser analisado por cromatografia gasosa para verificar a formação de metano, hidrogênio e gás carbono.

Para aumentar a produção de ácido caproico e evitar inibição que ocorre devido ao próprio ácido (GE et al., 2015; WEIMER et al., 2015), faz-se necessária a extração seletiva concomitantemente à sua geração. Essa extração pode ser realizada com um sistema de membranas de contato de fibra oca, produzida em polipropileno e com características hidrofóbicas. O sistema de membranas permite a obtenção direta de uma solução concentrada de ácido caproico (AGLER et al., 2012; ZHANG et al., 2013; GE et al., 2015), suprimindo assim a necessidade de uma etapa de destilação. As membranas são dimensionadas baseando-se na sua taxa de extração e na produtividade do reator. A relação de 100 m² de membrana por m³ de reator é suficiente para manter o reator com baixa concentração de ácido caproico e evitar a inibição por produto, o que resultou em uma elevação da taxa de produção de ácido caproico de 1,0 kgC6/(m³_{reator}·d), quando o reator é operado sem extração do ácido caproico, para 2,0 kgC6/(m³_{reator}·d).

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Embrapa, Edital 11/2012 – Macroprograma 3 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): Edital Universal – MCTI/CNPq Nº 14/2013, Processo n. 472420/2013-5; Edital BJT 2014, Processo n. 401394/2014-0; Bolsa de Mestrado Processo n. 130672/2014-9.

Referências

- AGLER, M. T.; WRENN, B. a; ZINDER, S. H.; ANGENENT, L. T. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 70-78, 2011.
- AGLER, M. T.; SPIRITO, C. M.; USACK, J. G.; WERNER, J. J.; ANGENENT, L. T. Chain elongation with reactor microbiomes: upgrading dilute ethanol to medium-chain carboxylates. **Energy & Environmental Science**, v. 5, n. 8, p. 8189-8192, 2012.
- ANGENENT, L. T.; AGLER, M. T. **Production of carboxylate and methane from biomass waste**. Patente n. US2014/0322772 A1. 2014.
- ARSLAN, D.; STEINBUSCH, K. J. J.; DIELS, L.; DE WEVER, H.; BUISMAN, C. J. N.; HAMELERS, H. V. M. Effect of hydrogen and carbon dioxide on carboxylic acids patterns in mixed culture fermentation. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 227-234, 2012.
- BARKER, H. A.; KAMEN, M. D.; BORNSTEIN, B. T. The synthesis of butyric and caproic acids from ethanol and acetic acid by *Clostridium Kluuyveri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 31, n. 12, p. 373-381, 1945.
- BARKER, H. A.; TAHA, S. M. *Clostridium kluuyverii*, an organism concerned in the formation of caproic acid from ethyl alcohol. **Journal of Bacteriology**, v. 43, n. 3, p. 347-363, 1942.
- CAVALCANTE, W. A. **Fermentação anaeróbia para formação de ácido caproico a partir de produtos e subprodutos da cadeia produtiva da cana-de-açúcar**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- DING, H.-B.; TAN, G.-Y. A.; WANG, J.-Y. Caproate formation in mixed-culture fermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9550-9559, 2010.
- GE, S.; USACK, J.; SPIRITO, C. M.; ANGENENT, L. T. Long-term n-caproic acid production from yeast-fermentation beer in an anaerobic bioreactor with continuous product extraction. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 13, p. 8012-8021, 2015.
- GROOTSCHOLTEN, T. I. M.; KINSKY DAL BORGIO, F.; HAMELERS, H. V. M.; BUISMAN, C. J. N. Promoting chain elongation in mixed culture acidification reactors by addition of ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 48, p. 10-16, 2013.
- SPIRITO, C. M.; RICHTER, H.; RABAEY, K.; STAMS, A. J. M.; ANGENENT, L. T. Chain elongation in anaerobic

reactor microbiomes to recover resources from waste. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 115-22, 2014.

STEINBUSCH, K. J. J.; HAMELERS, H. V. M.; PLUGGE, C. M.; BUISMAN, C. J. N. Biological formation of caproate and caprylate from acetate: fuel and chemical production from low grade biomass. **Energy & Environmental Science**, v. 4, n. 1, p. 216-224, 2011.

THOMAS, E. Microbial growth and physiology: A call for better craftsmanship. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-12, 2015.

VAN LAERE, S. D. M.; SAERENS, S. M. G.; VERSTREPEN, K. J.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M.; DELVAUX, F. R. Flavor formation in fungi: characterisation of K1Atf, the *Kluyveromyces lactis* orthologue of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferases Atf1 and Atf2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 783-792, 2008.

WASEWAR, K. L.; SHENDE, D. Z. Extraction of Caproic Acid Using Tri-n-butyl Phosphate in Benzene and Toluene at 301 K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 55, n. 9, p. 4121-4125, 2010.

WEIMER, P. J. Production of medium-chain volatile fatty acids by mixed ruminal microorganisms is enhanced by ethanol in co-culture with *Clostridium Kluyveri*. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 97-101, 2015.

WEIMER, P. J.; NERDAHL, M.; BRANDL, D. J. Production of medium-chain volatile fatty acids by mixed ruminal microorganisms is enhanced by ethanol in co-culture with *Clostridium kluyveri*. **Bioresource Technology**, v. 175, n. 2015, p. 97-101, 2015.

YAN, S.; WANG, S.; QIU, Z.; WEI, G.; ZHANG, K. Optimization of Caproic Acid Production from *Clostridium kluyveri* H588 and its application in Chinese luzhou-flavor liquor brewing. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 7, n. 8, p. 614-626, 2015.

ZHANG, F.; DING, J.; ZHANG, Y.; CHEN, M.; DING, Z.-W.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; ZENG, R. J. Fatty acids production from hydrogen and carbon dioxide by mixed culture in the membrane biofilm reactor. **Water Research**, v. 47, n. 16, p. 6122-6129, 2013.

Comunicado Técnico, 229



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

1ª edição (2017): 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: Ana Elisa Galvão Sidrim
Revisão de texto: Marcos Antônio Nakayama
Normalização bibliográfica: Rita de Cassia Costa Cid
Editoração eletrônica: Arilo Nobre de Oliveira