

**II-559 - AVALIAÇÃO DA CONVERSÃO MICROBIOLÓGICA DE GLICEROL
PROVENIENTE DO PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DE BIODIESEL****Nádhia E.C.F. Stival** ⁽¹⁾

Engenheira Química pela Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). Mestre em Tecnologia Ambiental pela Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

Luciano F. Novaes ⁽²⁾

Engenheiro Civil pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Mestre em Recursos Hídricos e Ambientais pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Doutor em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo (USP). Professor do curso de graduação em Engenharia Química na Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). Professor do curso de pós-graduação em Tecnologia Ambiental na Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

Murilo D.M. Innocentini ⁽³⁾

Engenheiro Químico pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Mestre em Engenharia Química pela UFSCar. Doutor em Engenharia Química pela UFSCar. Professor do curso de graduação em Engenharia Química na Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). Professor do curso de pós-graduação em Tecnologia Ambiental na Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

Endereço ⁽¹⁻³⁾: Av. Costábile Romano, 2201 - Ribeirânia – Ribeirão Preto - SP - CEP: 14096-900 - Brasil - Tel: (16) 3603-6784 - e-mail: minnocentini@unaerp.br

RESUMO

Neste trabalho analisou-se a viabilidade do processo para conversão de glicerol residual do processamento de biodiesel em sacarídeos, polissacarídeos e outros compostos de valor agregado pela ação microbiológica de grãos de Kefir, um aglomerado simbiótico de diferentes espécies de microrganismos com composição mássica de cerca de 82% de bactérias e 18% de leveduras. Glicerol bidestilado e também proveniente de indústria de biodiesel foi utilizado como fonte primária de carbono, enquanto que uréia foi usada como fonte de nitrogênio. Ensaios de conversão foram realizados em ambientes aeróbios e anaeróbios durante 7 dias, com relação carbono/nitrogênio de 25:1 e concentração de kefir de 10% em relação à massa de substrato. Os resultados indicaram oscilação nos valores de pH e de DQO. Houve consumo de glicerol em todos os ensaios, resultando em crescimento de massa celular (6 a 9%) e em geração de gases nos ensaios anaeróbios. A análise de cromatografia gasosa não indicou a presença de metano, enquanto observou-se a conversão do glicerol em diversos produtos orgânicos minoritários, incluindo etanol.

PALAVRAS-CHAVE: Conversão de Glicerol, Grãos de Kefir, Produção de Biodiesel, Produção de Sacarídeos, Conversão Microbiológica.

INTRODUÇÃO

Uma das alternativas para o aproveitamento energético de matérias-primas oleaginosas envolve a quebra das moléculas de triglicerídeos em moléculas menores através da reação entre os óleos vegetais e um álcool, normalmente metanol ou etanol. O produto dessa reação, denominada de transesterificação, é uma combinação de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, denominados genericamente de biodiesel ^[1-2]. O outro produto da reação é o glicerol, um composto de alto valor agregado que pode ser empregado como matéria-prima em uma ampla variedade de produtos, como cosméticos, químicos, alimentícios e farmacêuticos ^[3]. Dada a essa abundância crescente (o volume de glicerol produzido na transesterificação corresponde a 10% do volume de biodiesel sintetizado), novos métodos de destinação e utilização comercial do glicerol têm sido investigados, incluindo sua conversão química em outros produtos ou mesmo queima direta em caldeira.

A literatura tem apresentado inúmeras possibilidades de conversão de química e bioquímica de glicerol em outros produtos de valor agregado. A conversão microbiológica de glicerol em 1-2 propanodiol com o uso de *Klebsiella pneumoniae* ou *Clostridium butyricum* e fermentação anaeróbia do glicerol por *Escherichia coli* são algumas opções ^[4-5]. A ação de bactérias termofílicas sobre a decomposição de óleos, a bioconversão de glicerol para dihidroxiacetona com *Gluconobacter oxydans* imobilizada e a fermentação anaeróbia por *Streptococci faecalis* foram também relatadas ^[4-5]. A conversão biológica de glicerol em 1,3-propanodiol foi

demonstrada para várias espécies de bactérias, como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchnerii*, *Bacillus welchii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum* e *Clostridium butyricum* [4-5]. No entanto, essas conversões requerem condições de processo estritamente controladas (temperatura, pH, etc.), bem como culturas puras, para garantir a produtividade da reação.

A alternativa proposta neste trabalho é a utilização de grãos de Kefir, um aglomerado simbiótico com diferentes espécies de microrganismos identificadas, como lactobacilos, streptococos/lactococos, acetobacter e leveduras, em uma composição mássica de cerca de 82% de bactérias e 18% de leveduras. Os microrganismos mantêm um relacionamento simbiótico, ou seja, sobrevivem pela divisão de seus bioprodutos como energias ou fonte de crescimento [6]. Os microrganismos presentes no grão de Kefir podem ser cultivados a partir de vários tipos de substrato, com consumo de matéria orgânica e produção de compostos líquidos e gasosos. Estudo prévio mostrou que o Kefir pode também ser cultivado com efluentes industriais, permitindo a redução da carga orgânica e do potencial tóxico do efluente, ao mesmo tempo em que produz uma cápsula de polissacarídeos, conhecido como Kefiran, útil na fixação da colônia e também como reserva energética [7]. O kefiran pode representar cerca de 45% de cada grão e é um exopolissacarídeo solúvel em água, produzido no centro do grão, composto de unidades repetitivas de monossacarídeos (D-galactose e D-glicose), na proporção de 1:1 [8]. A Figura 1 mostra a estrutura química proposta para o kefiran.

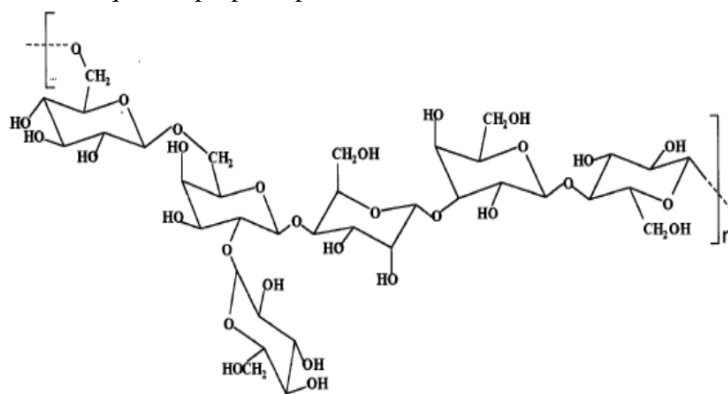


Figura 1. Estrutura química do Kefiran [8].

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho, foram realizados ensaios de conversão microbiológica do glicerol utilizando grãos de Kefir crescidos em laboratório. A fonte de carbono no substrato para os ensaios fermentativos foi glicerol bidestilado e glicerol bruto proveniente de indústria de biodiesel do Estado de São Paulo. Uréia foi utilizada como fonte de nitrogênio com relação C/N (carbono:nitrogênio) de 25:1. Nutrientes foram adicionados aos sistemas reacionais. Os ensaios foram realizados em meios aeróbios e anaeróbios. Os parâmetros de fermentação são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Dados dos ensaios realizados em ambientes aeróbios e anaeróbios.

Relação mássica Carbono:Nitrogênio	25
Massa de glicerol (g)	28,72
Massa de uréia (g)	1,28
Massa de Kefir (g)	30,00
Concentração de substrato (% em massa)	10
Volume de solução (mL)	300
Concentração Glicerol (g/L)	95,73

Para a realização dos ensaios fermentativos, preparou-se em uma proveta uma solução de glicerol e uréia diluídos em 300 mL de água destilada. Esta solução foi então transferida para um frasco de vidro contendo 30 g de grãos de Kefir. Os cultivos aeróbios foram obtidos através de borbulhamento de ar a uma taxa de 2 Lpm (litros de ar por minuto). O ambiente aeróbio foi mantido por um período de 7 dias, em temperatura ambiente e alíquotas diárias da mistura reacional foram retiradas para a análise de pH e DQO. Os cultivos anaeróbios foram feitos em garrafinhas PET, mantidos por um período de 7 dias, em temperatura ambiente e retiradas alíquotas

no início e final para análises de pH e DQO. O ar atmosférico foi expulso completamente apertando as garrafinhas PET até o gargalo e fechando-as rapidamente. Ao término dos cultivos, as soluções resultantes foram submetidas à liofilização para posterior ensaio de espectrometria de massa, obtendo uma relação qualitativa do glicerol inicial e final e a presença de outros compostos.

A caracterização química do glicerol bruto residual, proveniente do processo industrial de produção de biodiesel é apresentada na Tabela 2, enquanto a Figura 2 ilustra os sistemas reacionais para os ensaios aeróbios e anaeróbios.

Tabela 2. Características das amostras de glicerol bruto proveniente de indústria de biodiesel.

Parâmetros	Industrial 1 (% em massa)	Industrial 2 (% em massa)
Glicerol	81,00	74,7
Sais	6,98	8,64
Água	6,95	10,58
Metanol	0,02	0,05
Cinzas	-	-



Figura 2. Detalhes dos reatores fermentativos aeróbios e anaeróbios.

Foram realizadas análises de pH, DQO, consumo de glicerol, volume de gases, tipo de gás (cromatografia), crescimento de biomassa dos grãos e produção de etanol na fase líquida.

RESULTADOS

As Figuras 3 e 4 mostram os resultados de variação de DQO e de pH em função do tempo para os ensaios com glicerol bidestilado e industrial em ambientes aeróbio e anaeróbio.

Observa-se na Figura 3 que houve declínio máximo de DQO nas primeiras 24 h de ensaio aeróbio para os 3 gliceróis testados, o que pode significar geração de novos produtos no meio e consumo de matéria orgânica. A alteração de DQO a partir desse tempo implicaria assim na formação de outros produtos. Não houve tendência clara em relação à variação de pH. Na Figura 4 os ensaios anaeróbios indicaram após o período de 170 h apenas uma pequena redução de DQO. Nenhum valor intermediário foi medido.

A diminuição de concentração de glicerol no meio reacional anaeróbio foi confirmada em ensaio realizado na indústria de biodiesel. Os teores iniciais e finais de glicerol são mostrados na Tabela 3.

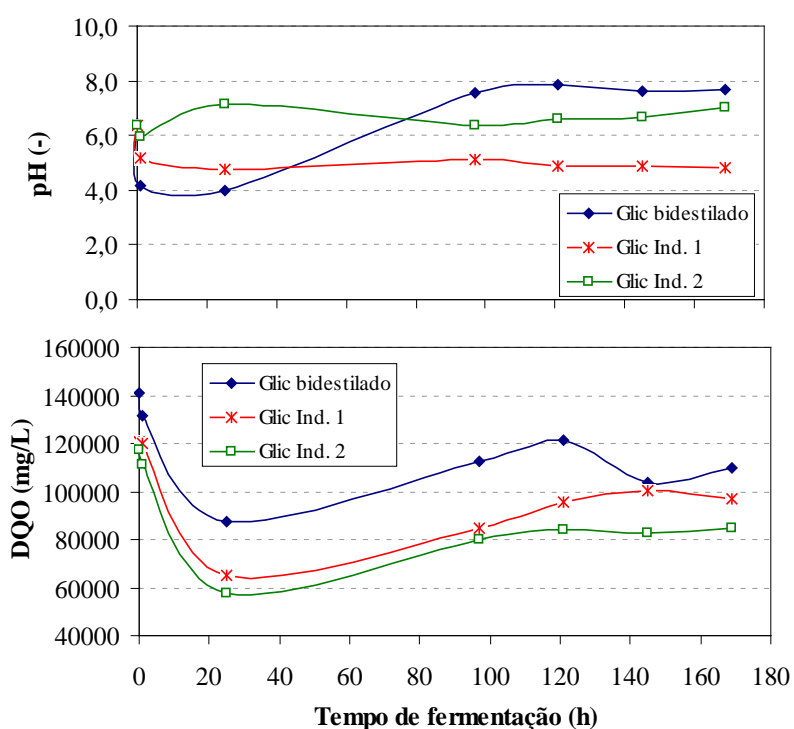


Figura 3. Comparação da variação de pH, DQO com diferentes gliceróis em ambiente aeróbio.

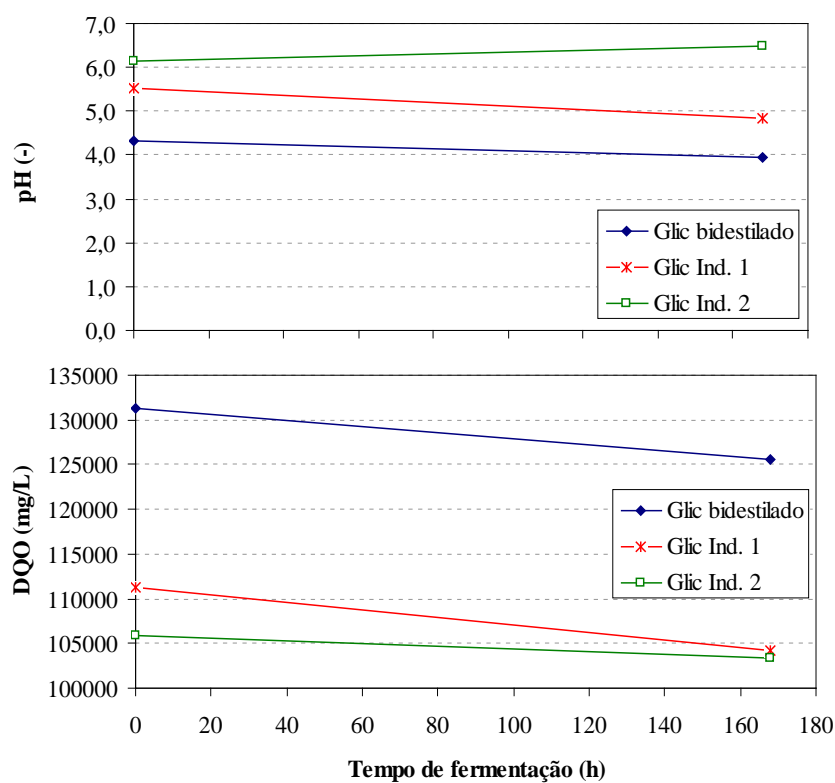


Figura 4. Comparação da variação de pH e DQO com diferentes gliceróis em ambiente anaeróbio.

Tabela 3. Teores de glicerol antes e depois do ensaio fermentativo em ambiente anaeróbio.

Glicerol	Teor inicial (%)	Teor final (%)
Industrial 1	81,00	17,6
Industrial 2	74,7	41,9

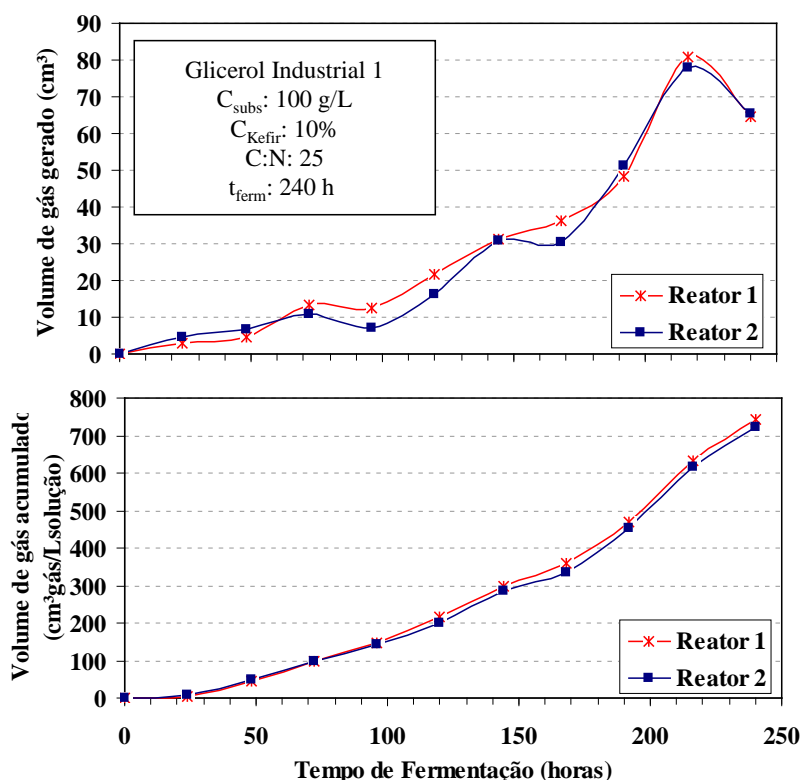
A diferença no consumo dos diferentes tipos de glicerol está associada à presença de impurezas, como ácidos graxos, sabões e catalisador. Pode ser que os ácidos graxos influenciaram ou dificultaram o processo fermentativo do glicerol com o microrganismo em questão.

A efetividade de crescimento de massa dos grãos de Kefir em meios aeróbios e anaeróbios e em diferentes substratos também foi investigada. Em todos os experimentos fixou-se a concentração de substrato em 10% em massa e a concentração de Kefir na solução em 10% em massa. A Tabela 4 mostra o crescimento de massa em cada ensaio.

Tabela 4. Efeito de vários substratos e condições do ambiente para o crescimento de massa do Kefir.

Ensaio	Substrato	Condição Ambiente	Relação C:N	Crescimento de Massa (%)
1	Glicerol bidestilado	Aeróbio	25	7,8
2	Glicerol Industrial 1			8,9
3	Glicerol Industrial 2			6,0
4	Glicerol bidestilado	Anaeróbio	25	8,9
5	Glicerol Industrial 1			7,8
5	Glicerol Industrial 2			6,3

As Figuras 5 e 6 mostram a geração de gases nos experimentos anaeróbios. Os experimentos foram realizados no tempo de aproximadamente 240 horas e teve volume acumulado de gás durante o tempo de fermentação de 741 cm³/L_{solução}. O pico de geração de gás ocorreu no tempo de 216 horas, com cerca de 80 cm³ e após diminuiu, como mostra a Figura 5.

**Figura 5. Volume de gás gerado e acumulado nos experimentos anaeróbios.**

Para simular retiradas de alíquotas durante os 7 dias de fermentação no sistema anaeróbio foram realizados 7 experimentos um em cada dia. Sendo assim, as análises de cromatografia gasosa para quantificar a geração de metano e CO₂ foram realizadas no último dia de preparo. A calibração do equipamento foi feita com concentrações conhecidas de padrões de metano e dióxido de carbono (CO₂).

Os experimentos foram com o glicerol Industrial 1 com concentração de substrato de 10% em massa, relação de carbono:nitrogênio 25 e concentração de Kefir na solução de 10% em massa. A evolução do teor de dióxido de carbono (CO₂) está mostrada na Figura 6. Não foi detectada geração de metano durante 27 dias de fermentação.

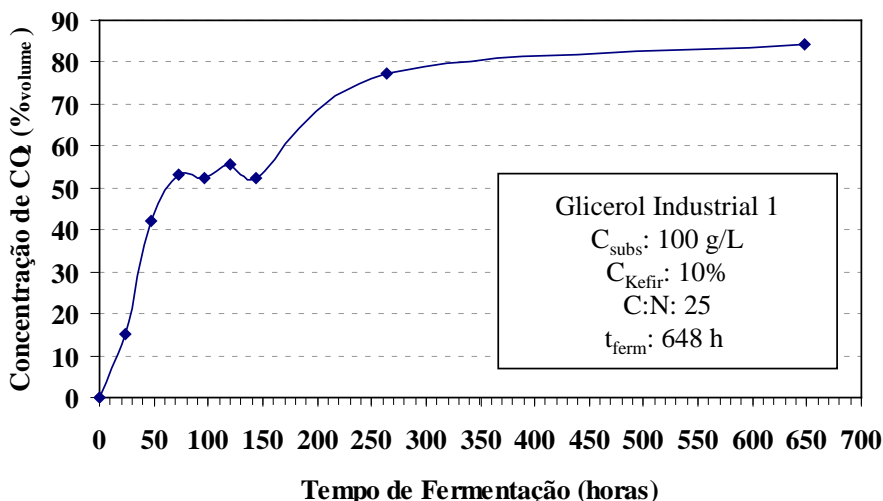


Figura 6. Concentração de CO₂ durante a fermentação.

A Figura 7 mostra a evolução do teor de etanol nas amostras que foram mantidas em ambiente aeróbio e anaeróbio, utilizando como substrato o glicerol industrial.

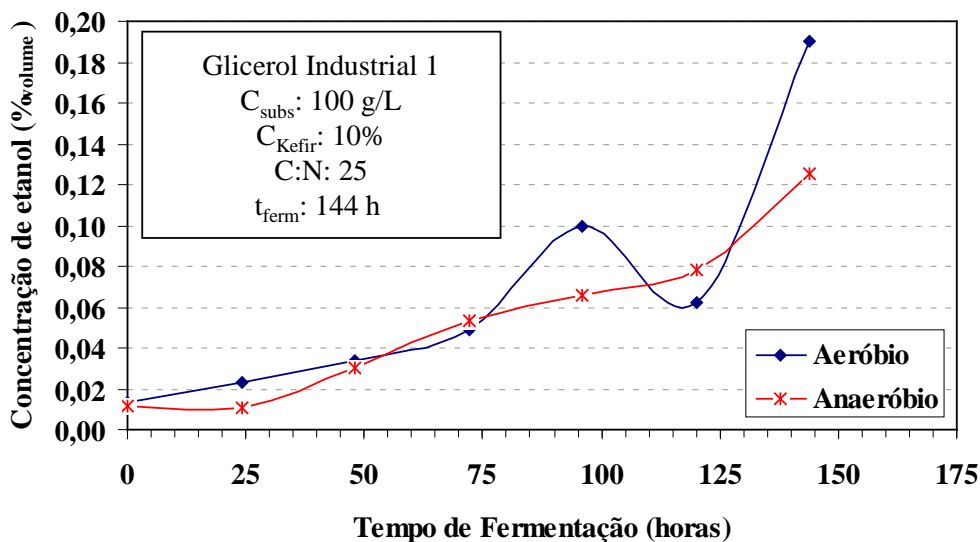


Figura 7. Teor de etanol na solução fermentada.

Até o tempo de fermentação de 75 horas, os experimentos em sistemas aeróbios e anaeróbios tiveram o mesmo comportamento. Após este período, o sistema aeróbio apresentou oscilações atingindo o máximo de 0,190% de etanol na solução, enquanto o sistema anaeróbio teve 0,125%. Esses valores foram considerados baixos e aquém do desejado do ponto de vista de tratamento do glicerol.

CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho foram:

A redução de glicerol nas amostras de gliceróis industriais não está diretamente associada com a diminuição de DQO;

Os experimentos em ambiente aeróbio resultaram em maior redução de DQO em relação aos valores iniciais, comparados com os experimentos em ambiente anaeróbio;

Quando a fermentação foi realizada com glicerol bidestilado como substrato, ocorreu um aumento de massa dos grãos, principalmente em ambiente anaeróbio em relação aos ensaios aeróbios;

Quando a fermentação foi utilizada gliceróis industriais como substratos, ocorreu um maior crescimento dos grãos de Kefir tanto em ambientes aeróbios quanto anaeróbios.

O glicerol pôde ser convertido pelo Kefir em produtos sem exigência de condições estéreis;

Não foi detectada após 7 dias de fermentação a presença de glicerol nas amostras de glicerol bidestilado em ambiente aeróbio pela análise de espectrometria de massa;

A geração de gás perceptiva em ambientes anaeróbios só ocorreu nos experimentos com os gliceróis industriais do processo de fabricação de biodiesel com 741 cm³ de gás por litro de solução durante 240 horas;

Não houve geração de metano durante 27 dias analisados e a concentração de CO₂ aumentou com o passar dos dias de fermentação e supostamente o oxigênio diminuiu;

A concentração de etanol aumentou durante a fermentação atingindo 0,190% volume no sistema aeróbio e 0,125% volume no sistema anaeróbio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MA, F., HANNA, M., Biodiesel production – a review, *Bioresource Technology* 70, 1-15 (1999).
2. SCHUCHARDT, U. SERCHELI, R. VARGAS, R.M., “Transesterification of vegetable oils – a review”, *J. Braz. Chem. Soc* 9: 199-210 (1998).
3. ARRUDA, P.V., RODRIGUES, R.C.L.B., FELIPE, M.G.A, Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica, *Revista Analytica*, 26, pp. 56-63, Dezembro 2006/Janeiro 2007.
4. TEMUDO, M.F., POLDERMANS, R., KLEEREBEZEM, VAN LOOSDRECHT, M.C.M, Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: A chemostat study *hompson. Biotechnology and Bioengineering* 100: 1088-1098 (2008).
5. WILLKE, T., VORLOP, K., Biotransformation of glycerol into 1,3-propanodiol. *Journal Lipid Sci. Technol.* 110 831-840 (2008).
6. HARTA, O., ICONOMOPOULOU, M., BEKATOROU, A., NIGAM, P., KONTOMINAS, M., KOUTINAS, A.A. Effect of various carbohydrate substrate on the production of Kefir grains for use as a novel baking starter. *Food Chemistry* 88: 237-242, (2004).
7. INNOCENTINI, M.D.M. SILVA, K.C., BELEBONI, R.O., PISANI JR, R., PASCHOALATO, C.F.P.R., PASOTTO, M.B., Patente PI0800654-7, Processo para o tratamento e redução da carga poluente de vinhaça e destinação econômica alternativa de subprodutos gerados (2008).
8. MICHELI, L., UCCELLETTI, D., PALLESCHI, C., CRESCENZI, V., Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53: 69-74 (1999).