

Seleção de bactérias para produção de ácidos orgânicos a partir de glicerina bruta

Jamille Ribeiro Coelho de Lima (Embrapa Agroenergia, jamillerc@yahoo.com.br), Thályta Fraga Pacheco (Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br), Mônica Caraméz Triches Damaso (Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br), Thaís Fabiana Chan Salum (Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br, Sílvia Belém Gonçalves (Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br)

Palavras Chave: Biodiesel, biorrefinaria do glicerol, bactérias, compostos químicos.

1 - Introdução

A glicerina bruta, proveniente da indústria do biodiesel, pode ser utilizada por uma gama de microrganismos como fonte de carbono, para produção de metabólitos como etanol, 1,3-propanodiol e ácidos orgânicos, dentre os quais ácido acético, ácido láctico e ácido cítrico. O ácido láctico tem um grande potencial de aplicação em diversos setores, tais como: alimentos, cosméticos e farmacêutico, assim como na agricultura (Wojtuski et al., 2015).

Questões econômicas e ambientais motivaram a realização desse trabalho que tem como foco a produção de ácidos orgânicos, a partir de glicerina (glicerol bruto), coproduto da síntese de biodiesel, com uso de linhagens de bactérias isoladas da biodiversidade brasileira. Assim, visa-se agregar valor à glicerina bruta, como oportunidade de aumento da sustentabilidade ambiental e econômica da cadeia produtiva do biodiesel, estratégica para o Brasil no cenário de diversificação da matriz energética e redução do impacto ambiental. O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de ácidos orgânicos por bactérias a partir de glicerina bruta de soja.

2 - Material e Métodos

As bactérias utilizadas nesse estudo foram obtidas em estratégia que objetivava o isolamento de microrganismos com capacidade para metabolizar glicerol. Para o experimento de isolamento, enriqueceu-se pontos do solo, separados por 1 metro de distância, próximo da barragem e da plantação da Fazenda Sucupira-Embrapa, Brasília/DF, com 50 mL de glicerina padrão analítico e de glicerina bruta de soja (52% de pureza), gentilmente cedida por CESBRA Química LTDA, Volta Redonda/RJ.

Amostras desses solos foram coletadas após dois meses e nomeadas como: bruta barragem (bb) e pura barragem (pb). A metodologia de isolamento bacteriano utilizou meio de cultivo TSB (Tryptic soy broth), contendo glicerina bruta como única fonte de carbono (de Oliveira Silva, *et al* modificado). As culturas puras foram devidamente preservadas em método de criopreservação e, posteriormente, utilizadas em experimentos de bioconversão de glicerina bruta em compostos químicos de interesse comercial.

Dez bactérias isoladas foram selecionadas devido à capacidade de crescimento em glicerina, visando à produção de compostos químicos de valor agregado.

Para o pré-inóculo das bactérias foi utilizado meio de cultivo M9, contendo 40 g.L⁻¹ de glicerina bruta de soja, sendo o pH ajustado em 7,0. Oitocentos microlitros de meio de cultivo foram dispersos em cada poço de duas microplacas de 96 poços de 1,1 mL de volume. Dez microlitros de suspensão de cada bactéria criopreservada foram inoculados em poços distintos de cada placa, em duplicata. As microplacas foram incubadas em shaker a 28°C, 200 rpm, por 24 horas.

Após o crescimento do pré-inóculo, os microrganismos foram inoculados novamente em microplacas, nas mesmas condições descritas acima. Após 48 horas, as placas foram centrifugadas a 16.873 x g por 15 min. Os sobrenadantes foram separados para quantificação de ácidos orgânicos por equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent, 1260 infinity) em coluna Aminex HPX-87H de 300 x 7,8 mm e pré-coluna de 30x4,6 mm, marca Bio-Rad. A fase móvel utilizada foi de 0,005 mol/L de H₂SO₄, fluxo de 0,6 mL/min e temperatura da coluna de 45°C. Os padrões utilizados na curva padrão tinham concentração de aproximadamente 5 g.L⁻¹ para glicerol PA, ácido láctico e ácido acético.

A influência de variáveis no meio de cultivo e nas condições de processo para produção de ácido láctico pela bactéria selecionada como elite, *Klebsiella* sp., por bioconversão de glicerina bruta de soja, foi avaliada por planejamento experimental do tipo Plackett-burmann (PB16), acrescido de 3 pontos centrais. (Tabela 1). Para a fase de adaptação, 15 µL da bactéria foram transferidos para frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 20 mL do meio de cultivo M9 contendo 40 g.L⁻¹ de glicerina bruta de soja. Os frascos permaneceram em shaker por 24 horas, a 28±1°C e 180 rpm. Após a adaptação, o caldo foi centrifugado (16.873 x g por 15 min), e, 1 mL do pellet das linhagens foi inoculado em meios contendo a composição conforme estabelecido pelo Planejamento tipo PB 16 (Tabela 1). O cultivo foi realizado por 70 horas.

3 - Resultados e Discussão

A partir do isolamento, dez bactérias morfológicamente distintas e capazes de metabolizar glicerina bruta de soja, foram isoladas. Estas bactérias foram utilizadas em processo de bioconversão da glicerina bruta de soja, em microplaca de 96 poços para produção de ácidos orgânicos de valor agregado. Do número total de bactérias isoladas, cinco linhagens foram capazes de produzir ácido láctico.

A Figura 1 apresenta a concentração de glicerina bruta de soja residual e a produção de ácido láctico e ácido

acético após 48 horas de cultivo. Todas as linhagens consumiram mais de 75% da glicerina bruta de soja disponibilizada inicialmente

As linhagens mais promissoras quanto à produção de ácido láctico consumiram mais de 85% do substrato inicial, produzindo, aproximadamente, 2,6 g.L⁻¹ de ácido láctico. Murakani et al. (2016) estudando a bactéria *Enterococcus faecalis*, utilizando condições semelhantes as do presente trabalho, e, 20 g.L⁻¹ de glicerina bruta obteve 5,9 g.L⁻¹ de ácido láctico em 48 horas de cultivo, enquanto o presente trabalho obteve aproximadamente 2,6 g.L⁻¹ do composto produzido pela linhagem 3gbb (Figura 1).

Tabela 1: Matriz com variáveis e valores reais aplicados no planejamento experimental Plackett-burmann.

Ensaio	pH	Temperatura	Inóculo	Glicerina bruta	Fosfato de sódio	Fosfato de potássio	Cloreto de sódio	Cloreto de amônio	Sulfato de magnésio	Cloreto de cálcio
		°C	microlitro	gramas/Litros	gramas/Litros	gramas/Litros	gramas/Litros	gramas/Litros	milimolar	milimolar
1	7	25	40	20	10	1	0,1	1,5	1,5	0,5
2	7	35	40	20	4	5	0,1	0,5	1,5	1,5
3	7	35	120	20	4	1	0,9	0,5	0,5	1,5
4	7	35	120	60	4	1	0,1	1,5	0,5	0,5
5	5	35	120	60	10	1	0,1	0,5	1,5	0,5
6	7	25	120	60	10	5	0,1	0,5	0,5	1,5
7	5	35	40	60	10	5	0,9	0,5	0,5	0,5
8	7	25	120	20	10	5	0,9	1,5	0,5	0,5
9	7	35	40	60	4	5	0,9	1,5	1,5	0,5
10	5	35	120	20	10	1	0,9	1,5	1,5	1,5
11	5	25	120	60	4	5	0,1	1,5	1,5	1,5
12	7	25	40	60	10	1	0,9	0,5	1,5	1,5
13	5	35	40	20	10	5	0,1	1,5	0,5	1,5
14	5	25	120	20	4	5	0,9	0,5	1,5	0,5
15	5	25	40	60	4	1	0,9	1,5	0,5	1,5
16	5	25	40	20	4	1	0,1	0,5	0,5	0,5
17	6	30	80	40	7	3	0,5	1	1	1
18	6	30	80	40	7	3	0,5	1	1	1
19	6	30	80	40	7	3	0,5	1	1	1

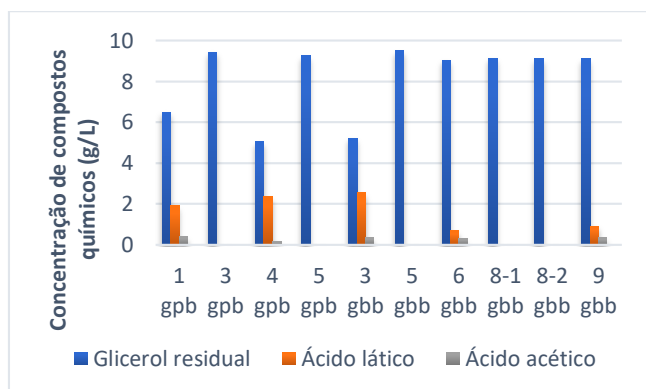


Figura 1: Produção de ácidos orgânicos por bactérias a partir da glicerina bruta de soja.

As bactérias isoladas no presente estudo foram capazes de produzir ácido acético em baixos níveis de concentração, sendo que a maior produção alcançou aproximadamente 0,33 g.L⁻¹ (linhagens 1 gpb, 3 gbb, 6 gbb e 9 gbb). Hong et al. utilizando bactéria *Escherichia coli* ac-127 obteve 1,5 g.L⁻¹ de ácido acético, resultado superior ao obtido no presente trabalho, visto que esse trabalho não utilizou processo de batelada alimentada como o reportado na literatura.

Dentre as bactérias avaliadas, a bactéria 3 gbb identificada como *Klebsiella* sp o melhor resultado para a produção de ácido láctico (Figura 1), e foi selecionada para experimento visando otimização do meio de cultivo para produção desse ácido.

Com base nos resultados obtidos com o planejamento de experimentos, observou-se que no Ensaio

12 da Figura 2, o teor de ácido láctico chegou a 5,0 g.L⁻¹ aumento na produção do ácido em aproximadamente duas vezes, em relação à condição inicial de cultivo 2,6 g.L⁻¹ (Figura 1).

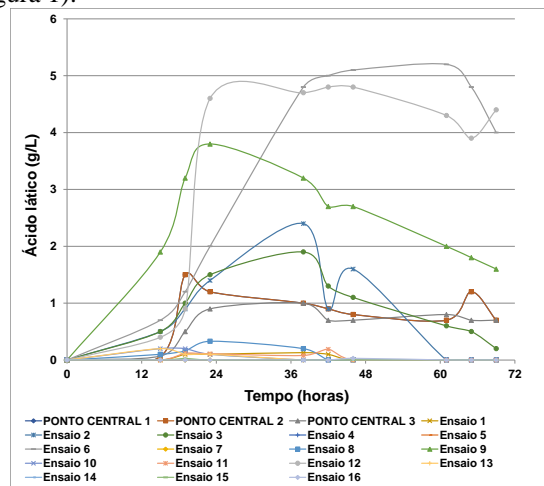


Figura 2: Produção de ácido láctico por *Klebsiella* sp. utilizando planejamento estatístico de Plackett-Burmann.

Em meio de cultivo comercial M9, contendo 40 g.L⁻¹ de glicerina bruta, pH 7, temperatura de 28° C, durante 48 horas, a produção de ácido láctico foi de aproximadamente 2,3 g.L⁻¹. Com modificações na composição do meio de cultivo (Ensaio 12 - Tabela 1), utilizando-se 60 g.L⁻¹ de glicerina bruta, temperatura de 28° C, em mesmo pH durante 23 horas, a produção de ácido láctico foi de aproximadamente 5,0 g.L⁻¹ (Figura 2), quantidade comparável ao obtido por Murakani et al. (2016), com a vantagem de menor tempo de cultivo. Outros compostos foram produzidos pela bactéria, porém estão em processo de identificação.

4 – Conclusões

As bactérias isoladas da biodiversidade brasileira foram capazes de converter glicerina bruta de soja em ácidos orgânicos de valor agregado. Dentre as isoladas, a bactéria *Klebsiella* sp foi considerada elite para produção de ácido láctico, uma molécula de valor econômico agregado e de mercado estruturado. Utilizando planejamento de experimentos foram realizadas modificações na composição do meio de cultivo, assim como, nas condições de processo que permitiram um aumento (cerca do dobro) da produção de ácido láctico, comparado à produção em meio comercial M9, e ainda diminuindo pela metade o tempo de produção, embora tenha utilizado 20 g.L⁻¹ de glicerina bruta de soja a mais que no experimento utilizando meio de cultivo comercial.

5 – Agradecimento

Embrapa, CNPq e CAPES.

6 - Bibliografia

Wotusik, M; Rodriguez, A; Ripoll, V.; Santos, V. E.; García, J.G.; García-Ochoa, F. *Biotechnol. Rep.* 6, 100, 2015.

de Oliveira Silva, M.; Freire, F. José; Lira Junior, M. A.;
Kuklinsky-Sobral, J.; Paes da Costa, D.; Lira-Cadete, L. *Rev
Br de Ciência do Solo*, 36, 4, 1113-1121, 2012.
Murakami, N.; Oba, M.; Iwamoto, M.; Yukihiro, T.; Noguchi,
T.; Bonkohara, K.; Abdel-Rahman, M.A.; Zendo, T.;
Shimoda, M.; Sakai, K.; Sonomoto, K. *J Biosc Bioeng.*
121, 89, 2016.
Hong, a-a; Cheng, Ke-ke; Peng, F.; Zhou, S; Sun, Y; Liua, C-
M; Liub, D-H. *J Chem Technol Biotechnol.* 84, 1576, 2009.