

Obtenção de compostos químicos de valor agregado pela bioconversão de glicerina bruta por bactéria

Carlos Oliveira de Jesus¹, Jamille Ribeiro Coelho de Lima², Mônica Caraméz Triches Damaso³, Thais Fabiana Chan Salum⁴, Thályta Fraga Pacheco⁵, Sílvia Belém Gonçalves⁶

Resumo

A transesterificação é o processo mais utilizado para a produção industrial de biodiesel. Como resultado dessa reação, obtém-se uma fase glicerínica, que por ser impura possui baixo valor de mercado, porém sendo rica em carbono, surge como uma alternativa para a obtenção de compostos de maior valor agregado por meio da bioconversão por microrganismos. Este trabalho teve como objetivo analisar os biocompostos produzidos pela bactéria 7GBP por bioconversão de glicerina bruta na concentração inicial de glicerol de 40 g/L, em processo de batelada, a 30 °C e 180 rpm. Verificou-se que dentre os sistemas de produção avaliados, o processo em microaerobiose foi o mais promissor, com obtenção de 5,5 g/L de composto químico.

Introdução

Consequências ambientais negativas relacionadas à queima de combustíveis fósseis e às preocupações sobre o aumento da demanda energética mundial têm estimulado a procura de combustíveis obtidos a partir de fontes renováveis.

A produção de biodiesel a partir de óleos e gorduras gera grande quantidade de glicerina bruta, também denominada glicerina “loira”. Uma opção para o aproveitamento da glicerina loira é o refino visando à obtenção da glicerina pura que é destinada para vários ramos da indústria, como os de cosméticos e fármacos. Ocorre que, em virtude do aumento da produção de biodiesel e o

¹ Tecnólogo em Biocombustíveis, mestrando em Bioenergia, Universidade Federal do Paraná, carlos.jesus@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, jamille.lima@colaborador.embrapa.br

³ Engenheira Química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

⁴ Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

⁵ Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

⁶ Engenheira química, doutora em Engenharia Química, pesquisadora Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

desaquecimento do mercado mundial, há sobra de glicerina loira que vem sendo aproveitada em unidades de incineração, em fornos e em outros processos térmicos (WOJTUSKI et al., 2015).

Os processos convencionais atualmente aplicados em escala industrial no Brasil produzem, aproximadamente, 1 tonelada de glicerina loira para cada 10 toneladas de biodiesel. De acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), somente no ano de 2015 foram produzidas 346.839 m³ de glicerina em todo Brasil (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2015).

As questões econômicas e ambientais relacionadas à glicerina motivam a realização deste trabalho, que tem como objetivo a produção de biocompostos por fermentação submersa, a partir de glicerina bruta, utilizando linhagem de bactéria selvagem.

Materiais e Métodos

Isolamento de Microrganismos

A bactéria utilizada neste estudo foi isolada a partir da seleção de microrganismos com capacidade para metabolizar glicerina padrão comercial e bruta de soja. O experimento de isolamento consistiu em derramar 50 mL de amostras de glicerina padrão e bruta de soja (Cesbra) (52% de pureza) em solo pertencente a duas partes distintas da Fazenda Sucupira-Embrapa, Brasília, DF, sendo elas: Plantação de *Amaranthus* ssp. (Caruru) (S: 15° 54'46.3" W: 048° 02'2.1") e Barragem (S: 15° 55' 03.8" W: 048° 01' 19.7"). Em cada localidade, o ponto de derrame de cada glicerina separou-se por aproximadamente 1 m. Os solos contaminados foram coletados após 2 meses, recebendo as seguintes nomenclaturas: Glicerina Padrão Barragem (GPB), Glicerina Padrão Plantação (GPP), Glicerina Bruta Plantação (GBP) e Glicerina Bruta Barragem (GBB). O local onde se realizou o experimento ficou isolado e não se levou em conta as condições ambientais.

Para realizar a triagem, utilizaram-se meios de cultivo TSB (Tryptic soy broth), contendo glicerina bruta como única fonte de carbono.

Os microrganismos selecionados foram inseridos na coleção de trabalho de microrganismos e algas da Embrapa Agroenergia, para posterior uso em

experimentos de bioconversão de glicerina bruta em compostos químicos de interesse comercial.

Seleção de microrganismos isolados capazes de sintetizar biocompostos utilizando glicerina bruta de soja como fonte de carbono

Ao todo, 13 bactérias isoladas de solos contaminados com glicerina padrão e bruta da Fazenda Sucupira foram selecionadas em virtude do crescimento microbiano em glicerina bruta de soja e padrão comercial (P.A.), visando à síntese de químicos de valor agregado.

Para a fase de crescimento das bactérias, foi utilizado o mesmo meio da fase de bioconversão (meio de cultura M9), contendo concentração de 4% de glicerina bruta. Foram dispersos 800 μL de meio de cultivo em cada poço de duas microplacas de 96 poços de 1,1 mL de volume e 10 μL de cada amostra foram inoculados em poços distintos de cada placa, em duplicata. As microplacas contendo as bactérias em meio de cultivo M9 foram incubadas em shaker a 28 °C, 200 rpm, por 24 horas.

Após o crescimento, os microrganismos foram inoculados novamente em microplacas nas mesmas condições descritas acima, por período de 48 horas, para a fase de bioconversão. Após centrifugação das placas a 14.000 rpm por 15 minutos, os sobrenadantes foram separados para quantificação de biocompostos de valor agregado por método de cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent, 1260 infinity), e a bactéria mais promissora na produção de biocompostos foi utilizada nas fases seguintes do trabalho.

Condições de cultivo para bioconversão de glicerina bruta de soja por bactéria selecionada

A bactéria selecionada 7GBP ainda não foi identificada e encontra-se estocada em método de criopreservação.

O pré-inóculo foi produzido a partir da cultura estoque de 7GBP, onde foi utilizado meio de cultivo M9 acrescido de 40 g/L de glicerina bruta. O pH do meio foi mantido em 7,1; esterilizado a 121 °C por 15 minutos. A biomassa transferida com auxílio de uma alça de platina calibrada em 10 μL , 0,5 mm x 50 mm (CIAL) de diâmetro para frascos cônicos de 250 ml de volume útil, contendo 50 ml do meio M9 acrescido de 40 g/L de glicerina bruta. O sistema foi mantido em agitador

orbital a 180 rpm, 30 °C por 10 horas. As células bacterianas foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante, descartado. Foi inoculado 1% da biomassa em relação ao substrato inicial na fase de bioconversão (em triplicata), em diferentes frascos com objetivo de analisar a influência da aeração na síntese de biocompostos. O primeiro frasco tipo erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio M9 acrescido de 40 g/L de glicerina bruta e o segundo frasco, tipo penicilina de 60 mL contendo 50 mL de meio de cultura M9 suplementado com 40 g/L de glicerina bruta devidamente vedados e conectados por meio de seringas plásticas graduadas de 20 mL acopladas com agulhas interligadas ao meio de fermentação.

Os sistemas foram novamente mantidos em agitador orbital a 180 rpm, 30 °C por 90 horas. Foram retirados 500 µL de amostra até 48 horas para quantificação de biocompostos.

Determinação da concentração de glicerina residual e de compostos químicos produzidos

Os compostos químicos presentes no sobrenadante das amostras foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (Agilent, 1260 infinity) equipado com coluna Aminex HPX- 87H de 300 mm x 7,8 mm e pré-coluna de 30 mm x 4,6 mm marca Bio-Rad, fase móvel 0,005 mol/L H₂SO₄, pressão de 0,6 mL/ min e temperatura da coluna de 40 °C. Os padrões utilizados seguiram concentração de aproximadamente 5 g/L para os compostos químicos, glicerina padrão PA, ácido láctico, 1,3 propanodiol e 2,4 de butanodiol, diluídos em 50 mL de água mili-Q.

Resultados e discussão

A partir do isolamento de bactérias de solo contaminado com glicerina padrão comercial e bruta de soja, as bactérias morfologicamente distintas e capazes de metabolizar o substrato foram selecionadas para processo de bioconversão do substrato em biocompostos de valor agregado. Todas as linhagens consumiram mais de 77,5% do glicerol inicial (Figura 1). Para 4GPB, 3GBB, 4GBB e 7GBP, o consumo foi de mais de 90%. A bactéria 7GBP foi selecionada para a continuidade do trabalho, visto que consumiu quase todo o

glicerol e teve maior síntese dos compostos químicos, como dióis (7,6 g/L), em 48 horas de processo.

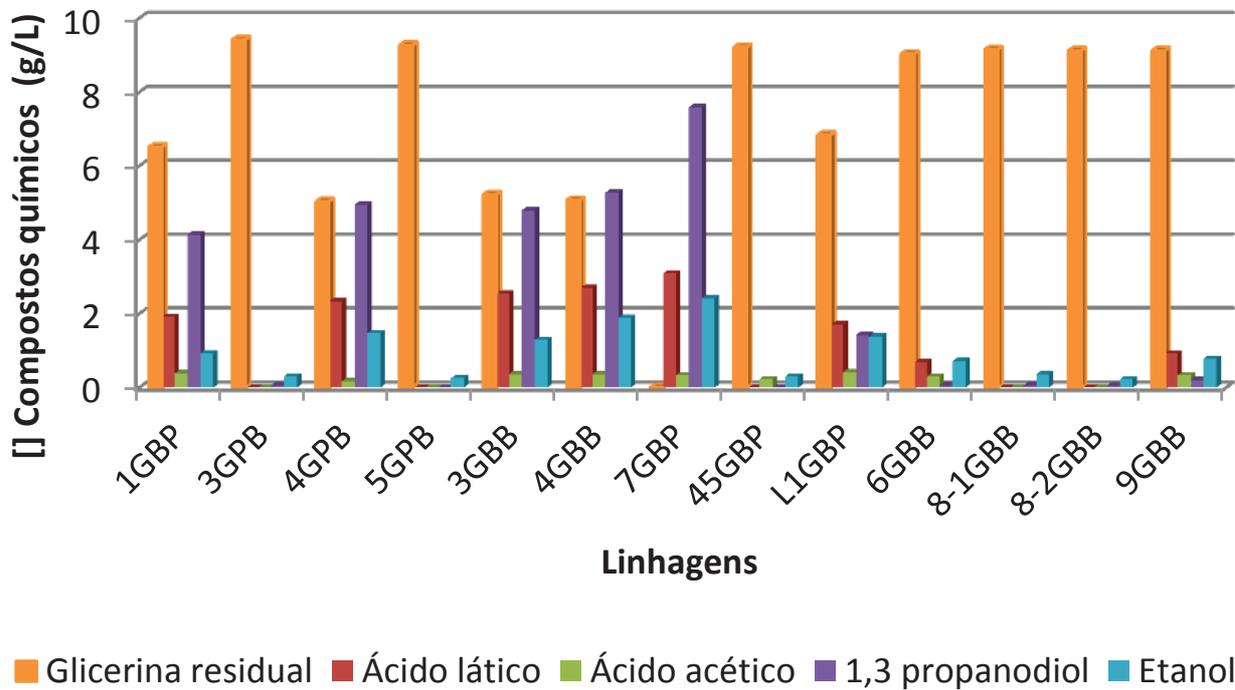


Figura 1. Triagem de bactérias isoladas do solo de cerrado (decomposição de glicerina) capazes de produzir biocompostos a partir de meio de cultivo M9 suplementado com glicerina bruta.

Embora a bactéria 7GBP tenha sido selecionada, ocorre a formação de flocos quando ela é cultivada tanto no sistema em microaerobiose quanto em aerobiose, tornando difícil uma quantificação precisa da biomassa microbiana utilizando espectrofotometria. Essa característica aparenta ser inerente à fisiologia do microrganismo, uma vez que apresentou a mesma característica de floculação em meio mínimo suplementado com glicerina padrão (Figura 2).

A bactéria 7GBP foi capaz de sintetizar um biocomposto, que foi identificado por análises de cromatografia líquida de alta eficiência como sendo 1,3 propanodiol. Porém, esse resultado não foi confirmado em testes adicionais realizados em cromatografia líquida de ultra eficiência (ULPC) (dados não apresentados). Portanto, ainda se faz necessária a confirmação da natureza desses biocompostos por meio de técnicas analíticas ainda mais específicas.

A relação entre o consumo da glicerina bruta e a formação do composto químico pela bactéria 7GBP cultivada nos sistemas em microaerobiose e aerados estão apresentados nas Figuras 3A e 3B, respectivamente.

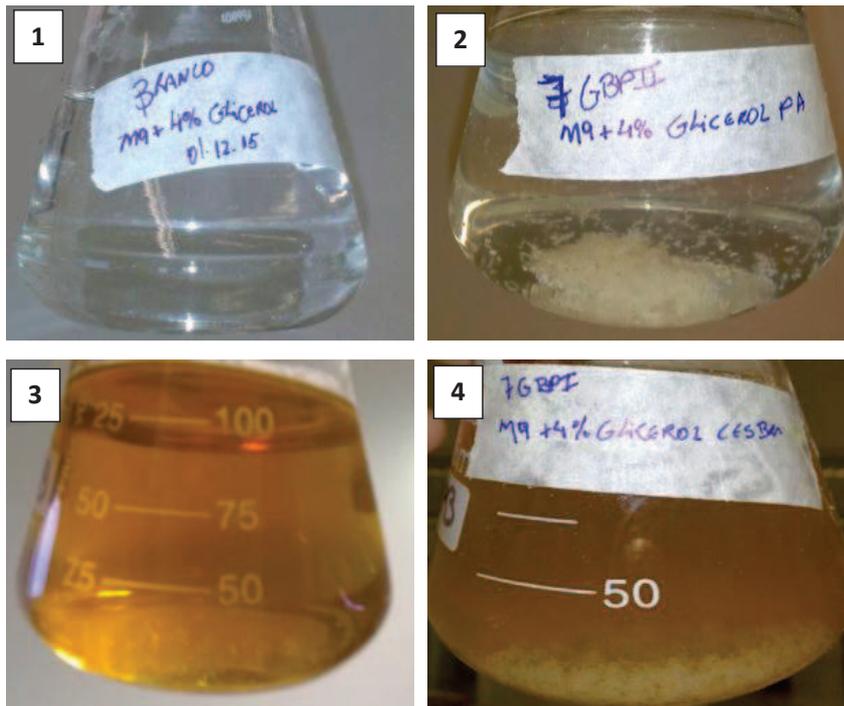
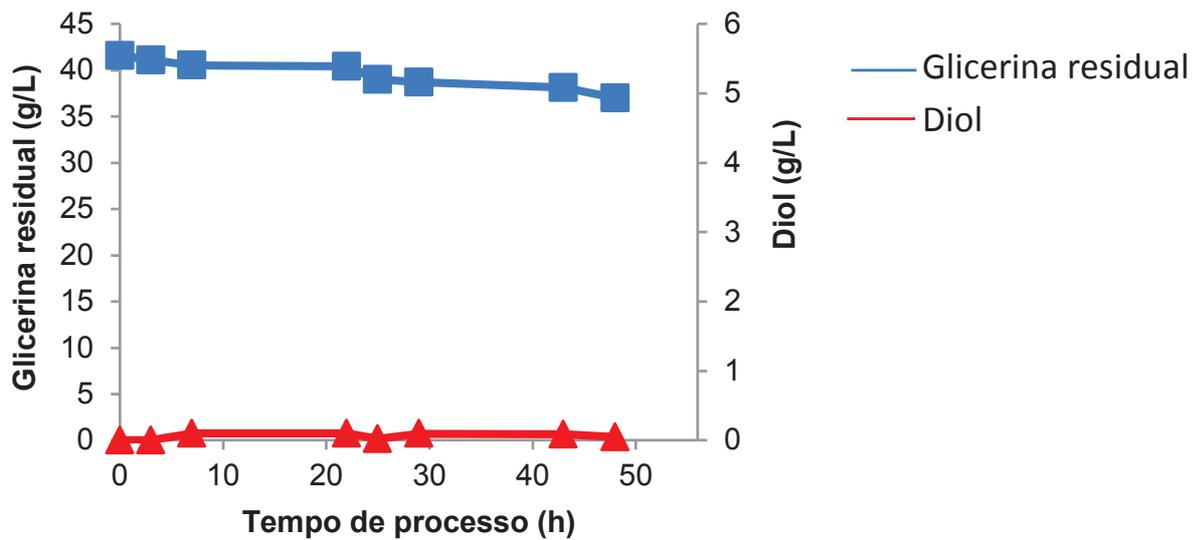
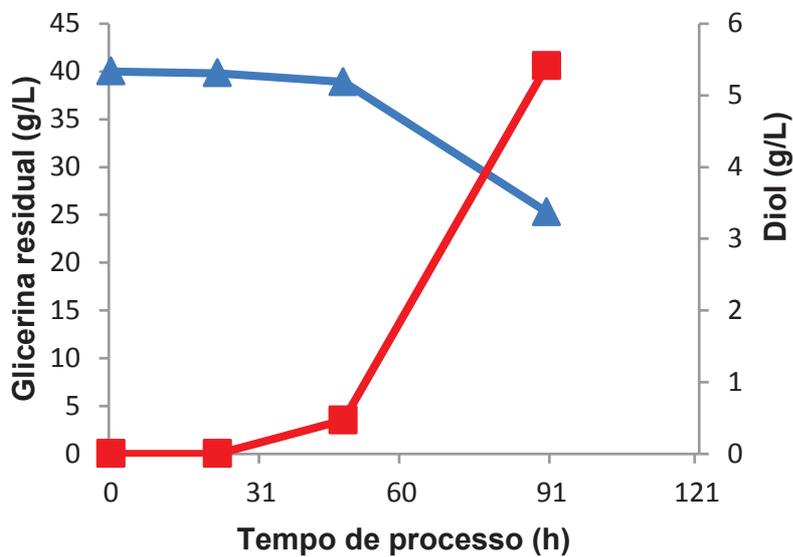


Figura 2. Floculação da biomassa microbiana (bactéria 7GBP) em condição de microaerobiose, onde (1) branco (M9 + 4% glicerol PA); (2) Biomassa de 7GBP em M9 + 4% de glicerol PA; (3) Branco (M9 + 4% de glicerina bruta); (4) Biomassa 7GBP em M9 + 4% de glicerina bruta.

Apesar de aparentemente o crescimento da bactéria 7GBP ter sido melhor na condição aerada em virtude da quantidade de biomassa formada (análise visual, biomassa não calculada em função da floculação), a condição em microaerobiose se apresentou mais eficiente na produção do biocomposto (Figura 3A). A síntese do biocompostos, supostamente um diol, foi crescente entre os tempos de 22 e 90 horas de cultivo, com produção de 5,4 g/L e com diminuição da concentração da glicerina bruta. Na condição aerada, não ocorreu a formação do biocomposto nem o consumo de glicerina bruta de soja (Figura 3B). Metsoviti et al. (2012), utilizando sistema em microaerobiose e a mesma concentração inicial de glicerina bruta com a bactéria *Klebsiella oxytoca* obtiveram uma produção de 9,1 g/L de 1,3 propanodiol no período de 20 horas, enquanto neste estudo a maior concentração do produto que se supõe ser o propanodiol foi de 5,5 g/L obtida em 90 horas. Vale ressaltar que essa etapa foi realizada em escala diferente do processo de triagem (screening) de compostos químicos e, portanto, com base nesses dados, sabe-se que o microrganismo tem potencial para uma maior produção.



(a)



(b)

Figura 3. Consumo de glicerina bruta e síntese de biocompostos pela bactéria 7GBP durante cultivo em sistema em microaerobiose (a) e sistema aerado (b).

Conclusão

A bioconversão de glicerina bruta em produtos de valor agregado tais como dióis por ação bacteriana, pode tornar a cadeia produtiva do biodiesel mais economicamente competitiva, por meio do incremento de mais um ativo econômico. A bactéria 7 GBP foi capaz de sintetizar no sistema de cultivo com baixa concentração de oxigênio um composto químico que acredita-se ser diol (1,3 propanodiol). Métodos analíticos mais específicos ainda precisam ser utilizados para confirmação da natureza do composto. A linhagem 7GBP apresenta potencial para geração desses biocompostos e a otimização da produção, incluindo a de condições de cultivo, pode permitir o escalonamento do processo.

Apoio financeiro

Os autores agradecem ao CNPq, pelo aporte financeiro e concessão de bolsa (404854/2013-3) para o autor Carlos de Jesus; à Capes, pela bolsa de Jamille Lima, e à Embrapa Agroenergia, pela infraestrutura para realização dos experimentos.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (BRASIL). **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**: 2015. Rio de Janeiro: ANP, 2015. Disponível em: <www.anp.gov.br/?dw=78135>. Acessado em: jun. 2016.

METSOVITI, M.; PARASKEVAIDI, K.; KOUTINA, A.; ZENG, A-P.; PAPANIKOLAOU, S. Production of 1,3 propanediol, 2,3 butanediol and ethanol by newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel- derived glycerol based media. **Process Biochemistry**, Oxon, v. 12, p. 1872-1882, 2012.

WOJTUSIK, M.; RODRIGUEZ, A.; RIPOLL, V.; SANTOS, V. E.; GARCÍA, J. G.; GARCÍA-OCHOA, F. 1,3 propanediol production by *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 from glycerol. Medium composition and operation. **Biotechnology Reports**, Amsterdam, v. 6, p. 100-107, 2015.