

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

BRUNO APARECIDO DA SILVA SANTOS

**ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DE GLICERINA EM PROCESSOS
DE COFERMENTAÇÃO COM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO
2016

BRUNO APARECIDO DA SILVA SANTOS

**ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DE GLICERINA EM PROCESSOS
DE COFERMENTAÇÃO COM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Engenharia de Alimentos, do Departamento de Alimentos – DALIM – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro de Alimentos.

Orientador: Dr. Fábio Henrique Polisel
Scopel

CAMPO MOURÃO
2016

TERMO DE APROVAÇÃO

ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DE GLICERINA EM PROCESSOS DE COFERMENTAÇÃO COM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

por

BRUNO APARECIDO DA SILVA SANTOS

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado dia 08 de novembro de 2016 como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Fábio Henrique Polisel Scapel

Prof. Dr. Manuel Salvador Vicente Plata Oviedo

Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini

Nota: O documento original e assinado pela banca examinadora encontra-se no Departamento de Engenharia de Alimentos da UTFPR campus Campo Mourão.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças e me abençoado durante toda minha caminhada para chegar até aqui.

Aos meus pais que sempre foram meu suporte, por não medirem esforços para eu ter uma boa educação, me apoiando e me incentivando sempre nos meus sonhos e nas minhas decisões. Sem vocês eu não estaria aqui, sou eternamente grato a vocês!

As minhas irmãs Bruna, Beatriz e Bárbara por serem as melhores irmãs que eu poderia ter, meu amor por vocês é incondicional!

Aos meus queridos professores por todo o ensinamento ao decorrer desta caminhada, vocês foram essenciais na minha formação como futuro profissional.

Ao Movimento Empresa Júnior, sem dúvidas foi uma grande experiência e sinto orgulho de ter feito parte da família Cyclus Consultoria, na qual pude complementar minha formação como pessoa e como profissional.

Ao Prof. Dr. Miguel por ter me orientado durante quase toda minha vida acadêmica e me proporcionado a experiência de iniciar na pesquisa já no começo da universidade com as bolsas de Iniciação Científica e de Inovação, além da ajuda como orientador do TCC 1 e com as análises para o TCC 2.

Ao Prof. Dr. Fábio por aceitar ser meu orientador de último momento e por toda a ajuda e sugestões para que esse trabalho fosse concluído da melhor forma possível.

A Dr^a Lucimara, pesquisadora da Embrapa e grande amiga, pelos seus ensinamentos durante meu período de estágio e por me motivar a seguir o caminho da pesquisa, além de ser um exemplo de pessoa e de profissional.

Aos meus queridos amigos de Campo Mourão, não irei citá-los pois posso acabar sendo injusto esquecendo alguém. Mas aos que eu tenho consideração e estão do meu lado sabem que estão incluídos aqui, agradeço por todo apoio e companheirismo durante a faculdade.

*“Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow.
The important thing is not to stop questioning.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

SANTOS, Bruno. Estudo da Biodegradação de Glicerina em Processos de Cofermentação com Melaço de Cana de Açúcar. 2016. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Engenharia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2016.

O presente trabalho teve como proposta realizar um estudo sobre a biodegradação do glicerol em processos de cofermentação com o melaço de cana de açúcar, visando produzir compostos de valor comercial utilizando microrganismos selvagens. No primeiro ensaio, cujo o propósito foi isolar microrganismos com capacidade degradativa de glicerol, utilizou-se como fontes destes, amostras de água de duas lagoas de tratamento de efluentes, sendo uma de um laticínio e a outra de uma fecularia. Tais amostras foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio de cultivo sólido e, posteriormente, essas foram incubadas à 37°C por 72 horas. Após o tempo de incubação houve o crescimento de diversos microrganismos, porém escolheu-se isolar somente duas leveduras, cada uma oriunda de uma lagoa de tratamento de efluentes diferente. Para afirmar que eram leveduras foi feita uma análise visual das características das colônias formadas. Também analisou-se a morfologia das células destas duas leveduras através da técnica de coloração de Gram, verificando que ambas eram cocos Gram negativas. No segundo ensaio essas leveduras foram inoculadas em dois caldos fermentativos diferentes (1:1 e 2:1 de glicerol: melaço), com a finalidade de verificar a influência das proporções de glicerol e melaço e, também, do tempo de fermentação na produção dos metabólitos. Por fim realizou-se a identificação de alguns metabólitos através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo eles ácido acético, ácido lático e ácido cítrico, porém, somente foi possível quantificar a concentração de ácido acético. Segundo os dados obtidos, a formulação que produziu uma maior concentração de ácido acético foi a 2:1 (glicerol: melaço), com aproximadamente 0,2 g/L, e o tempo ideal para a produção máximo deste metabólito foi de 48 horas.

Palavras-chave: Biodegradação. Prospecção de Microrganismos. Glicerol. Melaço.

ABSTRACT

SANTOS, Bruno. Estudo da Biodegradação de Glicerina em Processos de Cofermentação com Melaço de Cana de Açúcar. 2016. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Engenharia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2016.

This work proposed to study biodegradation of glycerol in co-fermentation processes with cane molasses, in order to produce compounds of commercial value using wild microorganisms. In the first experiment, whose purpose was to isolate microorganisms with glycerol degradative ability it was used as sources of these microorganisms water samples from two sewage treatment ponds, one of a dairy industry and the other of the starch manufacturer. These samples were inoculated on Petri plates containing a solid culture medium and subsequently these were incubated at 37 ° C for 72 hours. After the incubation time several microorganisms growth, but only two yeast samples were isolated, each one originated from different effluent treatment pond. To confirm they were yeast samples, visual analysis of the colony characteristics were conducted for confirming yeast samples. It was also analyzed the cells morphology of these two yeasts by Gram's Method, showing that both were negative cocci. In the second experiment such yeast were inoculated in two different fermentation broths (1: 1 to 2: 1 glycerol: Molasses) with the purpose of verifying the influence of glycerol and molasses proportions and the fermentation time for the production of metabolites. Finally, high-performance liquid chromatography (HPLC) was applied to identify metabolites being them acetic acid, lactic acid and citric acid. However, only the concentration of acetic acid was possible to quantify . According to the obtained data, the formulation that produced the highest concentration of acetic acid was 2: 1 (glycerol: Molasses) with approximately 0.2 g / L after 48 hours of fermentation process.

Keywords: Biodegradation. Co-Fermentation. Prospection of Microorganisms. Glycerol. Cane Molasses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da molécula de glicerol	13
Figura 2 - Esquema representativo de preparação do meio de cultura	16
Figura 3 - Esquema representativo da triplicata	17
Figura 4 - Esquema representativo do preparo dos meios líquidos fermentativos. ...	19
Figura 5 - Colônia isolada da lagoa de tratamento de efluentes do laticínio (Colônia B).....	21
Figura 6 – Colônia isolada da lagoa de tratamento de efluentes da fecularia (Colônia A).....	22
Figura 7 - Morfologia das células do microrganismo A observada de um microscópio luminoso.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração (média \pm desvio padrão) em g/L de ácido acético utilizando-se caldo fermentativo com diferentes proporções de glicerol: melaço.24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 GLICEROL	13
3.2 MELAÇO	14
3.3 PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS	14
3.4 BIOPRODUTOS OBTIDOS POR FERMENTAÇÃO MICROBIANA DO GLICEROL	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 MATERIAL	16
4.2 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA E INOCULAÇÃO.....	16
4.3 ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS	17
4.4 INOCULAÇÃO DAS COLÔNIAS EM MEIO LÍQUIDO, INCUBAÇÃO E ESTOQUE.....	18
4.5 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS	18
4.6 ESTUDO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE MELAÇO E GLICEROL NA DISTRIBUIÇÃO DE METABÓLITOS	19
4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS.....	20
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS	24
5.2.1 Produção de Ácido acético.....	24
5.2.2 Produção de Outros Metabólitos	25
6. CONCLUSÃO.....	26
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	27
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

A reação de transesterificação transforma o óleo ou gordura em ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, de acordo com o álcool utilizado na reação e estes ésteres constituem o biodiesel. O biodiesel produzido pode ser usado puro ou em mistura de diversas proporções com o diesel mineral. O principal subproduto desta reação é o glicerol, pois para cada tonelada de gordura ou óleo utilizada são gerados aproximadamente cem (100) kg de glicerol (MACEDO e MACEDO, 2004).

No Brasil a Lei 11.097/2005 estabeleceu percentuais mínimos de mistura de biodiesel ao diesel e o monitoramento da inserção do novo combustível no mercado. Assim ficou determinado a adição de 2% obrigatoriamente, para o período de 2008 a 2012, estimando-se numa demanda de um (01) bilhão de litros por ano. Em 2013 o percentual de adição foi elevado para 5%, o que leva a um consumo de 2,4 bilhões de L/ano (CRISTO e DORNELLES, 2006). Conseqüentemente são produzidos aproximadamente 240 milhões de litros de glicerol. Isto é mais do que suficiente para abastecer o consumo do mercado interno americano que gira atualmente em torno de 216 milhões de litros (JOHNSON e TACONI, 2007).

O glicerol bruto obtido na produção de biodiesel contém aproximadamente 50-70% de glicerol, mais água, metanol ou etanol, catalisador, sais, monoglicerídeos e traços de triglicerídeos, diglicerídeos e ésteres. Estas impurezas são comuns no processo de transesterificação química. Glicerol (com 80-88% de pureza) é obtido por evaporação simples, após a separação dos sabões através de um processo de acidificação seguido de centrifugação (SRIVASTAVA e PRASAD, 2000; TYSON *et al.*, 2004; GERPEN, 2005).

Contudo, o glicerol bruto e mesmo o destilado com 80-88% de pureza possuem baixo valor agregado devido às impurezas contidas. Além disso, dependendo da finalidade para que seja utilizado, o glicerol deverá passar ainda por processos, tais como: filtração, destilação fracionada à alto vácuo, branqueamento, desodorização e troca iônica. Assim, o refino do glicerol dentro dos padrões atuais depende de fatores de escala para tornar-se economicamente viável (PACHAURI e HE, 2006).

A maioria dos derivados químicos produzidos hoje a partir de glicerol utiliza como matéria prima glicerol padrão USP (United States Pharmacopeia) com 95% de pureza. Isto significa que métodos simples e de baixo custo para refino de glicerol devem ser desenvolvidos para atingir esse grau de pureza a partir da fase pesada resultante da reação de transesterificação ou novas tecnologias para produção de derivados do glicerol bruto ou destilado (80-88%) devem ser pesquisadas (TYSON *et al.*, 2004).

Assim, buscam-se novas aplicações para os grandes volumes de glicerina que estão sendo produzidas a partir do biodiesel. A maioria dos pesquisadores tem focado seus estudos na produção microbiana de 1,3 propanodiol (DANIEL *et al.*, 1995; ZENG *et al.*, 1994; MALAOUI e MARCZAK, 2001; NÉMETH e SEVELLA, 2008). Este composto apresenta propriedades singulares que conferem ótimas características para a produção de carpetes e fibras têxteis para uso na indústria de roupas (CAMERON *et al.*, 1998; LUERS *et al.*, 1997; NÉMETH e SEVELLA, 2008). Outros estudos têm aplicado o glicerol como substrato de processos fermentativos, como na produção de ácido cítrico por meio da levedura *Yarrowia papanikolaou* (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002), na produção de ácido succínico por meio de *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (LEE *et al.*, 2001), na produção de 3-hidroxiopropanal por meio do *Lactobacillus reuteri* (VOLLENWEIDER e LACROIX, 2004), e na produção de hidrogênio e etanol com o uso de *Enterobacter aerogenes* (ITO *et al.*, 2005).

Neste sentido, o melaço de cana-de-açúcar, um licor resultante da cristalização final do açúcar, pode ser utilizado como substrato na produção de produtos fermentados de interesse econômico uma vez que apresenta altos teores de açúcares como sacarose, glucose e frutose (62% em média). Além do mais é um subproduto da indústria açucareira relativamente barato e disponível em grandes quantidades (RAMBLA *et al.*, 1999).

Visando utilizar microrganismos selvagens, isto é, que habitam ambientes hostis, e por isso podem possuir capacidade degradativa de compostos complexos, além da pouca exigência para cultivo, foram escolhidos como fontes potenciais lagoas de estabilização de um laticínio e de uma fecularia.

Os efluentes líquidos provenientes da indústria de laticínios de acordo com a literatura são os seguintes: Demanda Química de Oxigênio até 60.000 mg/L no caso

da produção de queijos e derivados, proteínas em média 6.300 mg/L, açúcares redutores em média 37.291 mg/L e teores de lipídeos de até 1.500 mg/L (LYBERATOS et al., 1997; GAVALA et al., 1999).

Nos processos de industrialização da mandioca, para fins de obtenção de farinha ou fécula, são gerados resíduos sólidos de descarte, partes lenhosas e deterioradas das raízes, porções fibrosas retidas em peneiras, bagaços e resíduos líquidos da água de lavagem das raízes e manipueira (FERNANDES JÚNIOR & CEREDA, 1996). Dentre esses, destaca-se a manipueira líquida resultante da prensagem da massa ralada utilizada para a produção de farinha e do processo de extração e purificação da fécula (TAKAHASHI, 1987).

A manipueira consiste em um resíduo complexo de aspecto leitoso, contendo apreciável quantidade de amido (em farinheiras) sedimentável e em suspensão coloidal, glicose, resto de fibras, ácido cianídrico, pequenas quantidades de proteínas, bem como outras substâncias orgânicas (SAMPAIO, 1996).

Neste contexto, propõe-se como contribuição, à solução do problema de excedente de glicerina, o estudo dos perfis de degradação deste composto, em um processo de cofermentação com melaço de cana de açúcar, identificando qualitativa e quantitativamente os metabólitos formados por microrganismos selvagens isolados de lagoas de tratamento de efluentes de laticínio e fecularia.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Isolar microrganismos selvagens, oriundos de lagoas de tratamento de efluentes de laticínios e fecularia, com potencial de realizar a biotransformação do glicerol sob condições de cofermentação com melaço de cana-de-açúcar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a composição básica do substrato tendo como norte uma formulação mais simples possível;
- Identificar os metabólitos produzidos pela cofermentação de glicerol e melaço de cana-de-açúcar através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar o efeito das proporções de glicerol e melaço de cana de açúcar como substratos na produção dos metabólitos;
- Identificar o grupo de microrganismos capazes de produzir os metabólitos pela cofermentação de glicerol e melaço de cana-de-açúcar, analisando sua macromorfologia e utilizando a técnica de coloração de gram.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 GLICEROL

O glicerol é o principal coproduto gerado na produção de biodiesel, sendo que aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido corresponde a glicerol (DASARI et al., 2005). Teoricamente, para cada 3 mols de ésteres metílicos (ou etílico) é gerado 1 mol de glicerol (ZHOU *et al.*, 2008).

Quimicamente o glicerol é um tri-álcool com 3 carbonos, ou segundo a IUPAC 1,2,3-propanotriol. Se apresenta como um líquido incolor, com gosto adocicado, sem cheiro e muito viscoso, derivado de fontes naturais ou petroquímica. O nome glicerol deriva da palavra grega “*glykys*”, que significa “doce” (PAGLIARO E ROSSI, 2008).

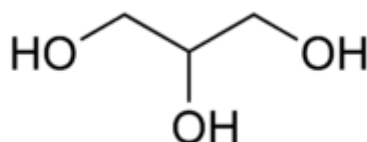


Figura 1 - Estrutura da molécula de glicerol
Fonte: Biowiki (2016)

A presença de três grupos hidroxila na estrutura do glicerol é responsável pela solubilidade em água e sua natureza higroscópica. É uma molécula altamente flexível formando ligações de hidrogênio tanto intra como intermoleculares (CALLAM et al., 2001).

O glicerol é considerado uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas para a obtenção de energia metabólica, como regulador do potencial redox e para a reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula (DILLIS et al., 1980).

Vários estudos foram desenvolvidos visando a utilização de glicerol como fonte de carbono por microrganismos, especialmente por bactérias. Muitos deles apontam principalmente a mecanismos de assimilação de glicerol por estes microrganismos para a produção de compostos intermediários de polímeros, resinas e aditivos para combustíveis (PAPANIKOLAOU et al., 2002; ITO et al., 2005; CHENG et al 2007).

3.2 MELAÇO

O melaço é um líquido obtido a partir do resíduo de fabricação do açúcar cristalizado, do melado ou da refinação do açúcar bruto (ANVISA, 1978). O melaço de cana-de-açúcar é um substrato rico em açúcares fermentescíveis e minerais tais como manganês, magnésio, fósforo, potássio, zinco, sódio e cálcio, sendo considerado um bom substrato para o cultivo de bactérias ácido lácticas (Delgado, 1975).

Suas características sensoriais são: aspecto líquido xaroposo e denso (viscoso), cor amarelo âmbar, com cheiro próprio e gosto doce. Em relação às características físico-químicas, o melaço poderá apresentar um máximo de 25% (p/p) de umidade, acidez em solução normal máxima de 10% (v/p), glicídios totais um mínimo de 50% (p/p) e no máximo 6% (p/p) de resíduo mineral fixo (cinzas). Nas preparações microscópicas, deverá demonstrar ausência de sujidades, parasitas, larvas e insetos e seus fragmentos (CARVALHO, 2007).

3.3 PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS

A bioprospecção de microrganismos tem se mostrado uma importante ferramenta para o desenvolvimento de processos fermentativos (ALPER; STEPHANOPOULOS, 2009). Ambientes, tais como solos, material vegetal em decomposição em florestas, ambientes marinhos de água doce, resíduos agrícolas e industriais, ambientes de compostagem, ambientes extremos tais como fontes termais, ambiente antártico, ambientes altamente salinos, associações mutualistas entre organismos tais como rúmens de mamíferos herbívoros e sistema digestivo de insetos, têm sido prospectados para microrganismos voltados ao desenvolvimento de produtos biotecnológicos (TOIVOLA et al., 1984; GUO et al., 2008; ALPER; STEPHANOPOULOS, 2009; GRAHAM et al., 2011).

O sucesso dos processos biotecnológicos está diretamente relacionado com a diversidade dos microrganismos e das moléculas que eles produzem como resultado do metabolismo primário e secundário, bem como a conservação dos recursos genéticos que eles fornecem (HUNTER, 1998).

3.4 BIOPRODUTOS OBTIDOS POR FERMENTAÇÃO MICROBIANA DO GLICEROL

A extraordinária expansão da indústria de biodiesel no Brasil e no mundo vem originando grandes volumes do principal coproduto, o glicerol. A superprodução de glicerol afeta negativamente o preço do biodiesel no mercado, tornando imperiosa a busca de novas aplicações para este coproduto. Neste contexto, o glicerol vem sendo investigado como uma fonte promissora de carbono em processos microbianos para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado (RIVALDI et al., 2008)

Um dos subprodutos, de interesse econômico, que pode ser obtido a partir de fermentação utilizando o glicerol como fonte de carbono é o 1,3-propanodiol. Este pode ser produzido por algumas espécies de bactérias da família Enterobacteriaceae, e pelas espécies de *Clostridium butyricum*, *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae* (HOMANN et al., 1990), ácido succínico utilizando *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (YAZDANI; GONZALES, 2007; LEE et al., 2001), butanol pela fermentação por *Clostridium pasteurianum*, ácido propiônico por *Propionibacteria acidipropionici*, ácido acético, ácido láctico, 1,3-butanodiol (DECKWER, 1995), dihidroxiacetonas, hidrogênio e polidrohialcanoatos (PACHAURI; HE, 2006; SOLAIMAN et al., 2006; ASHBY et al., 2005).

Atualmente na literatura, há diversos estudos visando melhorar o processo e aumentar o rendimento dos produtos obtidos através da bioconversão do glicerol utilizando microrganismos que já são conhecidos por fermentar este co-produto da produção do biodiesel. Como é o caso de Sá (2011), que estudou as variáveis de influência para o processo fermentativo na produção de ácido cítrico por leveduras utilizando glicerol, e Ferreira (2013) que avaliou a produção de 1,3-propanodiol, também a partir do glicerol, utilizando bactérias do gênero *Clostridium* visando identificar qual linhagem apresentava maior rendimento no produto de interesse.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foram utilizadas amostras da primeira lagoa de tratamento de efluentes oferecidas pelo laticínio Vida Ativa e pela fecularia Pinduca e o melaço de cana-de-açúcar pela Usina Sabarálcool. Os demais materiais utilizados para o preparo do meio de cultura foram: sulfato de amônio, glicerol, agar-agar e água destilada. Utilizou-se os equipamentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Ultimate 3000), estufa (Thelga TE150CRD), autoclave (Phoenix AV-75), centrífuga (Celm LS-3 Plus) e câmara de fluxo laminar (Bioseg 09 Tipo A1) além de vidrarias, pHmetro, balança analítica e microscópio luminoso.

4.2 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA E INOCULAÇÃO

A formulação utilizada tem como referência a metodologia utilizada por Rodriguez (2010) para o isolamento de microrganismos capazes de biodegradar o glicerol. Foram preparados três meios de culturas com diferentes pHs, sendo 5,5; 6,5 e 7,5. A preparação do meio de cultura seguiu o seguinte esquema:

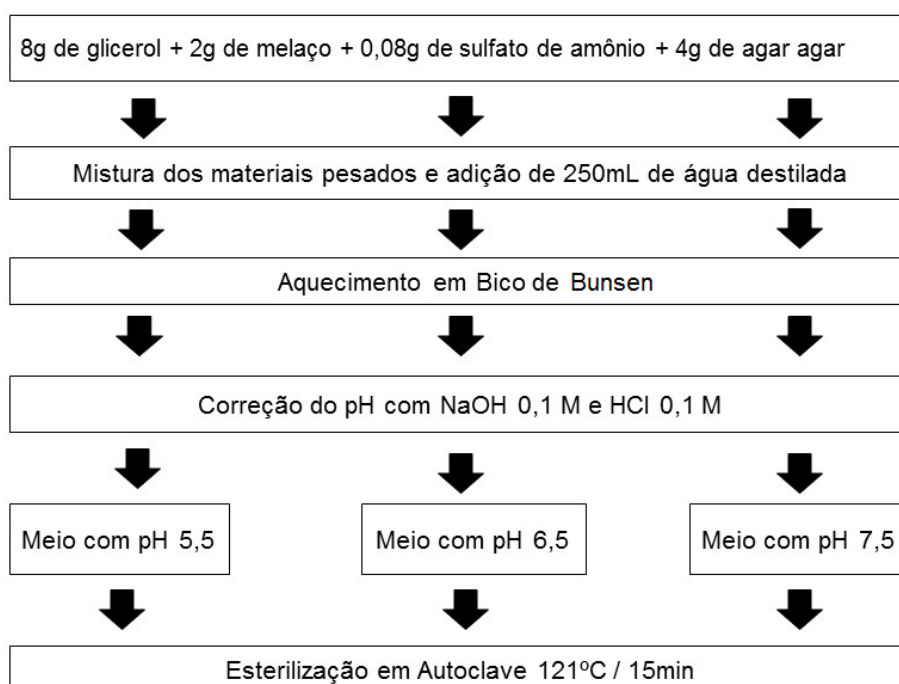


Figura 2 - Esquema representativo de preparação do meio de cultura.

Ao término da preparação dos meios de culturas, estes foram colocados em Placas de Petri previamente esterilizadas. Sendo três placas para cada meio de cultura, conforme ilustrado na figura abaixo.

Posteriormente, foi espalhado 0,1 mL das amostras das lagoas sobre as placas de Petri com auxílio da alça de Drigalski e estas foram incubadas a 37°C durante 72 horas em estufa.

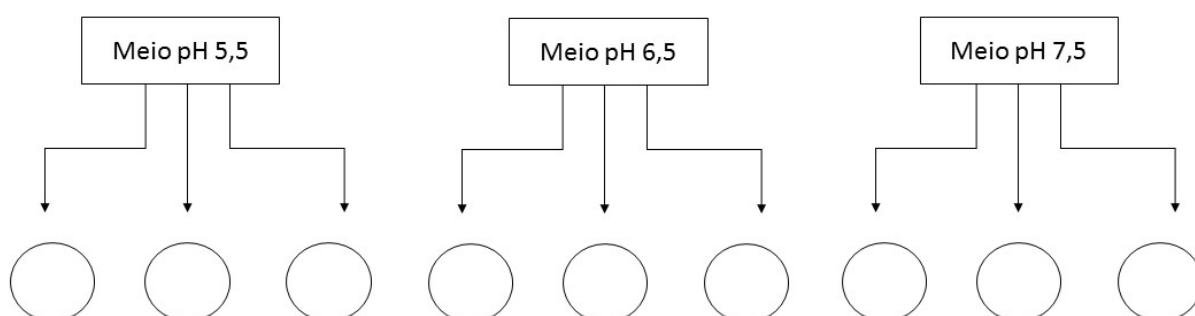


Figura 3 - Esquema representativo da triplicata.

4.3 ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS

Após o período de incubação, houve em todas as placas o crescimento de diversas colônias, sendo a maioria de fungos filamentosos. Optou-se em fazer o isolamento de duas colônias (uma proveniente da amostra da lagoa do laticínio e a outra da fecularia) por serem as únicas a apresentarem a aparência cremosa, e pela possibilidade de serem leveduras.

As colônias foram recolhidas e diluídas em água estéril em tubos de *eppendorf*, e posteriormente inoculada através da técnica de estriamento nas placas de Petri. O meios de cultivo foram preparados no valor de pH em que as colônias apresentaram melhor crescimento durante a etapa inicial de incubação, sendo pH 5,5 e 6,5 para a colônia proveniente da amostra da lagoa de fecularia (Colônia A) e de laticínio (Colônia B), respectivamente.

Por fim, as placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 72h. Este procedimento foi realizado três vezes, obtendo deste modo colônias puras em cada placa.

4.4 INOCULAÇÃO DAS COLÔNIAS EM MEIO LÍQUIDO, INCUBAÇÃO E ESTOQUE

As duas colônias isoladas foram inoculadas em tubos com o mesmo meio de cultura, porém sem Ágar-Ágar. Em seguida estes foram incubados a 37°C por 48h. Ao fim deste tempo transferiu-se 1,5 mL do meio fermentativo em tubos de *ependorf* estéril contendo 300 µL de glicerol, a fim de realizar o estoque dos microrganismos em freezer.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

Foi realizado uma identificação visual observando as características das colônias desenvolvidas nas placas, e também microscópica utilizando a técnica de coloração de gram.

4.6 ESTUDO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE MELAÇO E GLICEROL NA DISTRIBUIÇÃO DE METABÓLITOS

Foram preparados dois tipos de meios de cultura líquidos, ou seja, com os mesmos substratos do meio sólido, porém sem ágar-ágar. Nestes meios variou-se as proporções de substrato, sendo 2:1 e 1:1 (glicerol-melaço).

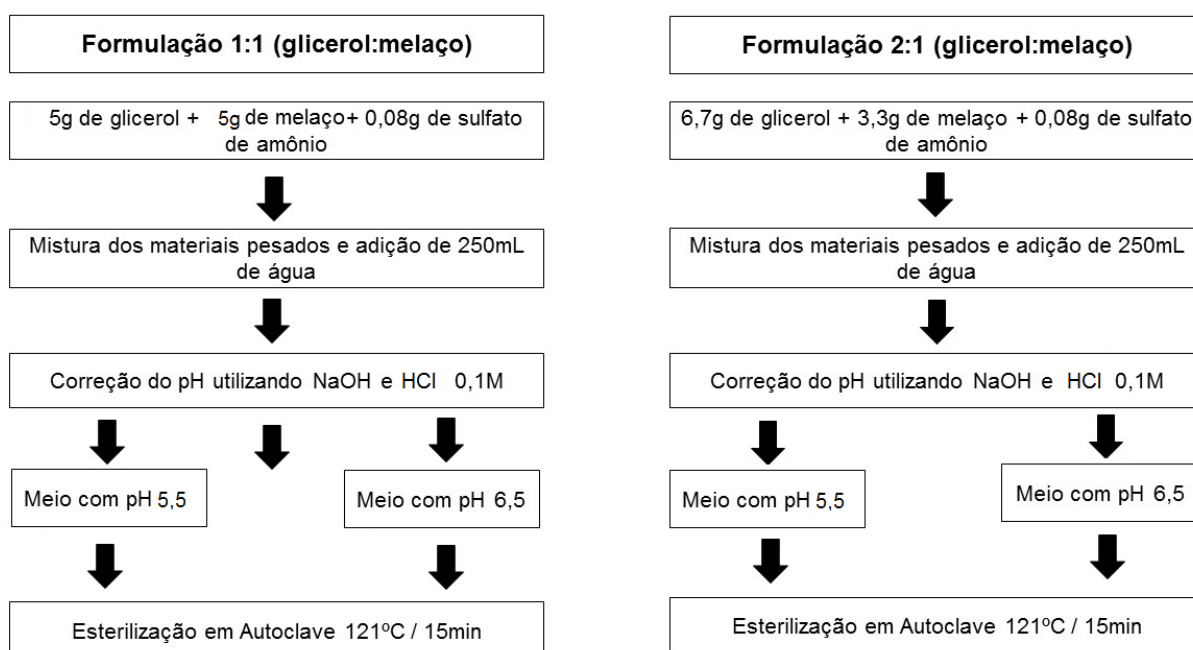


Figura 4 - Esquema representativo do preparo dos meios líquidos fermentativos.

Os meios líquidos fermentativos foram colocados em tubos e esterilizados. Cada tubo indicava o tempo de fermentação, sendo de 12, 24, 48 e 96h. Os tubos foram inoculados com os microrganismos das Colônias A e B e incubados a temperatura de 37°C. Ao término do tempo de incubação as amostras foram centrifugadas, filtradas e estocadas em tubos de *ependorf* e, por último, foram armazenadas em freezer para posterior análise dos metabólitos. Esta etapa foi realizada em duplicata.

4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS

Os metabólitos produzidos pelos dois microrganismos, nos diferentes tempos de fermentação, foram identificados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Inicialmente foi preparada uma solução de fase móvel, utilizando ácido sulfúrico, na concentração 5 mMolar e seu pH foi corrigido para pH 2,3. Para as análises utilizou-se uma coluna trocadora de H⁺ (Varian Hi-Plex H Column).

Os parâmetros utilizados no HPLC para analisar os metabólitos produzidos foram:

- Temperatura da coluna: 65°C
- Velocidade do fluxo: 0,7mL / min
- Tempo de corrida: 40 minutos
- Pressão: 298 psi
- Volume injetado de amostra: 5 µL
- Comprimento de onda: 225 nm

Devido a falta dos padrões necessários para as análises, os metabólitos foram comparados com os cromatogramas de soluções de ácido láctico, ácido cítrico, ácido acético e glicerol com o propósito de identificá-los. O único padrão disponível era o de etanol.

Foram feitas soluções em diferentes concentrações (1; 2,5; 5; 8 e 10 g/L) de ácido acético para elaborar uma curva de calibração (Concentração da solução *versus* área do pico do cromatograma) a fim de calcular a concentração de ácido acético produzido. Vale lembrar que tanto as soluções preparadas quanto o padrão de etanol foram analisados no HPLC com as mesmas condições utilizadas na análise dos metabólitos.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Aos dados de concentração de ácido acético foi aplicado o Teste de Tukey a um nível de significância de 5%, utilizando o software Statistica 6.0, com a finalidade

de verificar a influência das formulações e do tempo de fermentação na produção desse metabólito.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS

Foram isoladas duas colônias, uma proveniente da amostra da lagoa de tratamento de efluentes do laticínio e a outra da fecularia, como mostram as figuras 5 e 6.



Figura 5 - Colônia isolada da lagoa de tratamento de efluentes do laticínio (Colônia B)

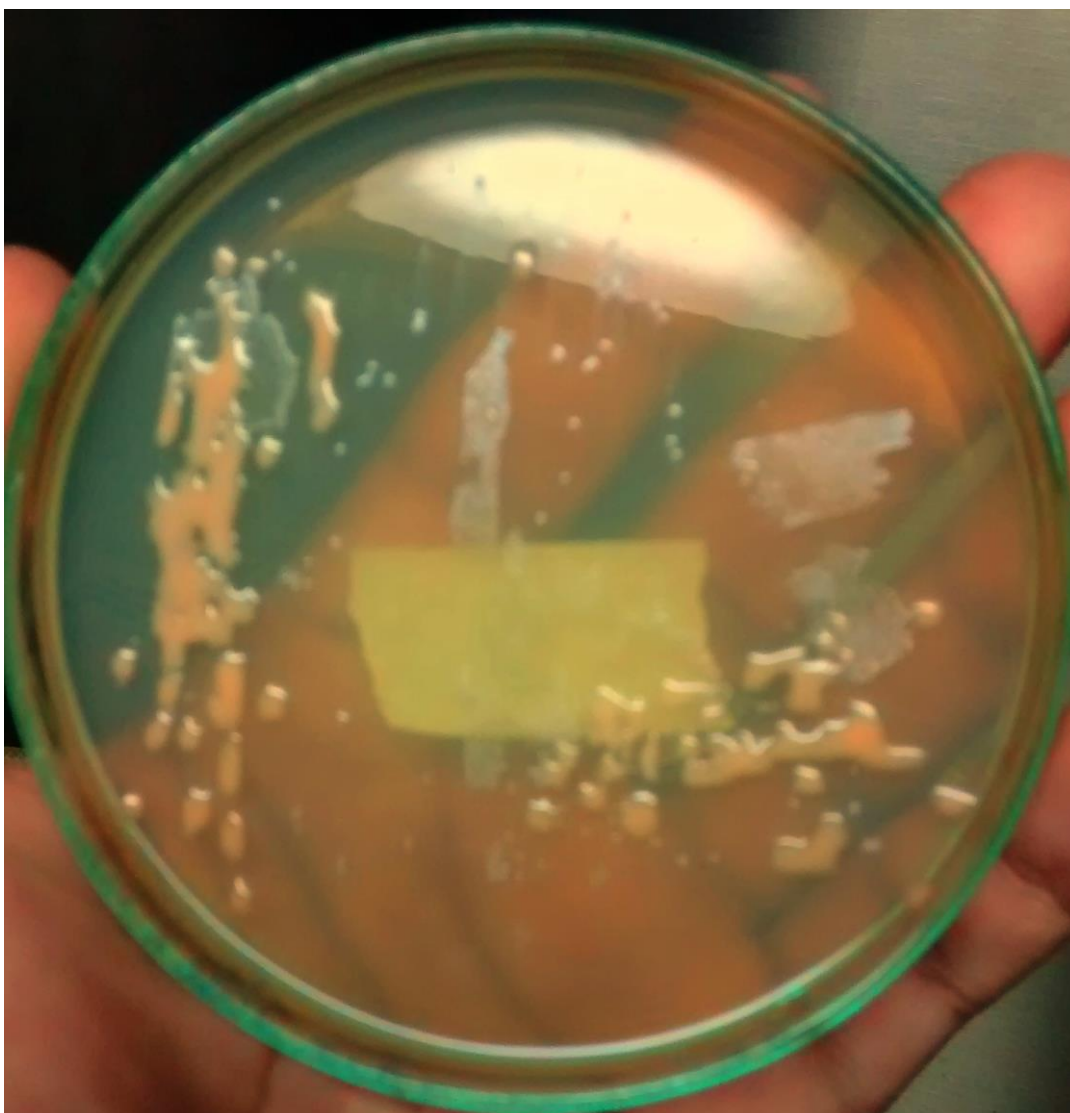


Figura 6 - Colônia isolada da lagoa de tratamento de efluentes da fecularia (Colônia A)

Segundo Sidrim & Rocha (2009), a maioria das leveduras apresentam colônias de coloração branca ou bege, textura cremosa e superfície lisa. Há também espécies de leveduras que produzem colônias alaranjadas, como por exemplo a *Rhodotorula* spp.

Os aspectos observados da colônia A tais como coloração alaranjada, textura cremosa e lisa indicam ser características de levedura.

Segundo Valduga *et al.* (2009), leveduras com estas características são conhecidas por serem capazes de sintetizar carotenóides. Os gêneros capazes de produzir este pigmento são *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* e *Phaffia*.

Sendo assim, como é limitante o número de gêneros de leveduras que possuem colônias com essa pigmentação alaranjada, pode-se supor que este

microrganismo seja uma levedura pertencente a um dos gêneros citados por Valduga *et al.* (2009). Para uma identificação mais apurada são necessários testes confirmativos, como por exemplo provas bioquímicas, sorológicas ou identificação molecular.

Em relação ao microrganismo oriundo da colônia B, não foi realizada nenhuma análise para que fosse possível discutir sobre suas características e a qual grupo de microrganismo pertence. Assim escolheu-se dar sequência ao presente trabalho utilizando o microrganismo oriundo da colônia A.

Através da técnica de coloração de Gram e utilizando um microscópio luminoso, no aumento de 1000x, foi possível verificar a morfologia das células do microrganismo A, observando que estas são ovaladas como mostra a figura 7.

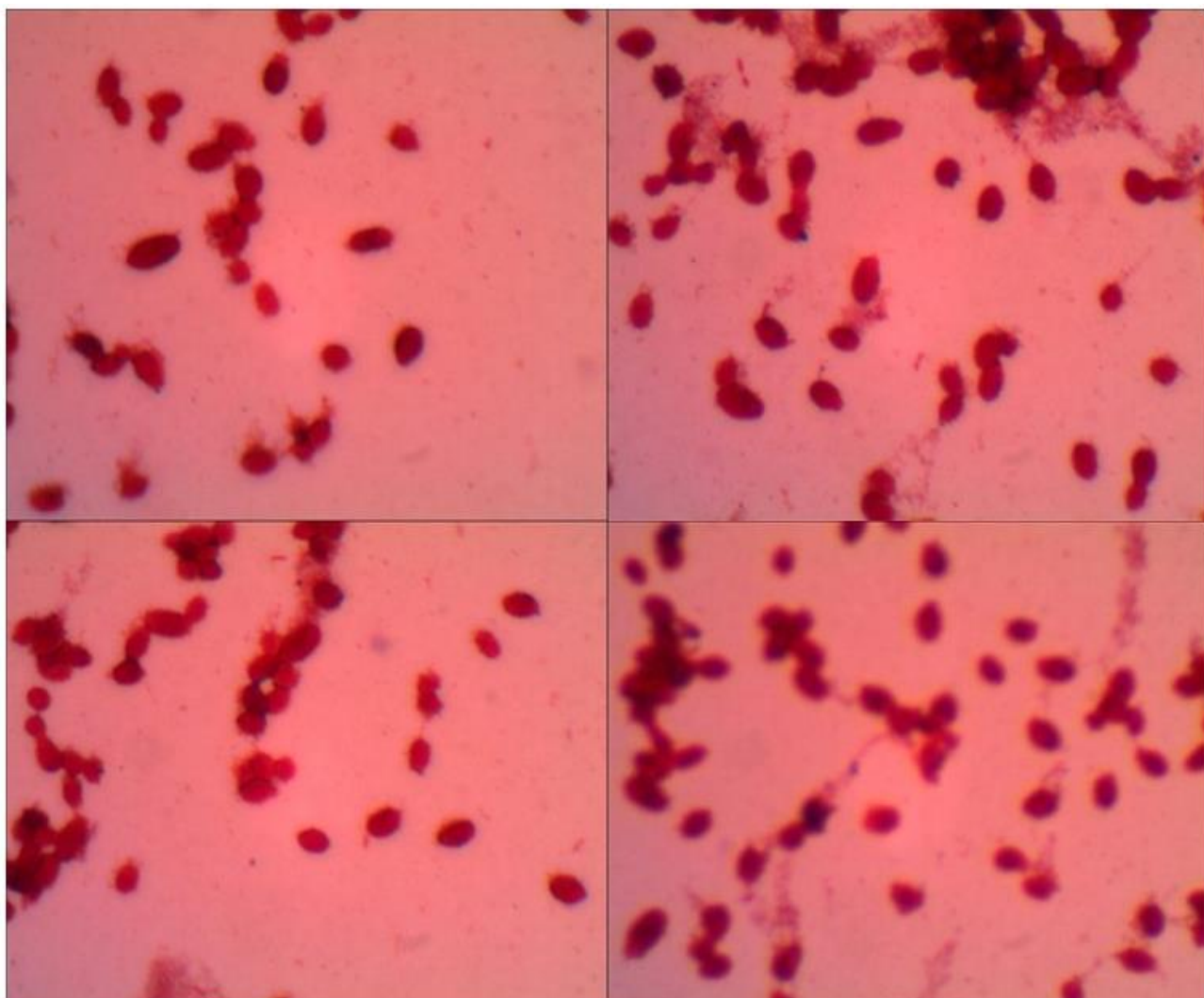


Figura 7 - Morfologia das células do microrganismo A observada de um microscópio luminoso.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS

Através da cromatografia líquida de alta eficiência foram identificados os metabólitos produzidos pelo microrganismo A.

5.2.1 Produção de Ácido cético

Foi identificada a produção de ácido acético pela levedura A no tempo de retenção de aproximadamente 14 minutos no cromatograma, tanto para a formulação 1:1 e 2:1 (glicerol:melaço).

Utilizando a curva de calibração (1), calculou-se as concentrações de ácido acético, onde y é a concentração de ácido acético e x a área da curva do cromatograma.

$$y = 0,7995x - 0,4414 \quad (1)$$

A tabela 1 mostra os dados de concentração de ácido acético nos diferentes de fermentação para cada formulação.

TABELA 1 – Concentração (média \pm desvio padrão) em g/L de ácido acético utilizando-se caldo fermentativo com diferentes proporções de glicerol: melaço.

Tempo de fermentação	Formulação	
	1:1 (glicerol: melaço)	2:1 (glicerol: melaço)
12 h	0,000 \pm 0,000 cB	0,080 \pm 0,008 bA
24 h	0,052 \pm 0,004 bB	0,148 \pm 0,019 aA
48 h	0,216 \pm 0,009 aA	0,163 \pm 0,010 aB
96 h	0,208 \pm 0,002 aA	0,162 \pm 0,008 aB

a, b, c: Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); A, B: Letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Segundo o teste de Tukey, para a formulação 1:1 (glicerol: melaço) houve diferença entre os tempos de fermentação na produção de ácido acético, exceto entre os tempos de 48 e 96 horas, que apresentaram uma maior concentração desse metabólito. Porém para a formulação 2:1, estatisticamente, não houve diferença entre os tempos de fermentação, exceto para o tempo de 12 horas, que apresentou uma menor concentração de ácido acético.

Comparando-se o mesmo tempo de fermentação entre as duas formulações, também foi observado que nestes houve diferenças na produção do ácido acético, indicando diferença entre as duas formulações.

Fica claro que a formulação 1:1 proporcionou uma maior produção de ácido acético em relação a formulação 2:1, sendo o tempo de 48 horas o ideal para a produção máxima desse metabólito, já que não houve aumento significativo na sua concentração em tempos maiores de incubação.

Assim, para futuros experimentos, pode-se utilizar a formulação 1:1 (glicerol:melaço) realizando a sua fermentação durante 48 horas, caso o produto de interesse seja o ácido acético.

5.2.2 Produção de Outros Metabólitos

Foi identificada a produção de ácido cítrico e ácido láctico, que são metabólitos normalmente produzidos na biodegradação do glicerol, porém não foram quantificadas suas concentrações. Também não foi possível identificar a produção de etanol e nem traçar o perfil de consumo do glicerol pois os cromatogramas de ambos se apresentaram com ruídos de fundo e sem nenhum pico.

6. CONCLUSÃO

Foram isolados dois microrganismos utilizando o meio de cultura proposto neste trabalho, cada um proveniente de uma lagoa de tratamento de efluentes. O microrganismo isolado da lagoa da fecularia apresentou indícios de ser uma levedura. Quanto ao microrganismo isolado da lagoa do laticínio não foi possível dizer se este era um bactéria ou uma levedura.

A partir das análises em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi possível identificar a produção de ácidos cítrico, láctico e acético pelo microrganismo isolado da lagoa de fecularia.

As diferentes proporções, 1:1 e 2:1, de glicerol: melaço interferiram na produção de ácido acético, mas essa interferência não é conclusiva na produção dos outros metabólitos, sendo necessário traçar o perfil de produção desses através da cromatografia líquida de alta eficiência. Ao se utilizar a formulação 1:1 obteve-se maiores concentrações de ácido acético, provavelmente devido ao maior quantidade de melaço na formulação.

O tempo de fermentação encontrado para a produção máxima de ácido acético foi de 48h, com aproximadamente 0,2 g/L.

Comprova-se que é possível prospectar de ambientes hostis microrganismos capazes de consumir o glicerol. Devido à escassez de certos nutrientes e as condições adversas no meio que habitam, estes microrganismos selvagens são capazes de degradar compostos complexos mais facilmente e de se adaptarem em meios de cultivo simples, como foi o caso do meio utilizado no presente trabalho.

O glicerol é uma potente matéria-prima para a bioprodução de compostos de maior valor econômico por ser um resíduo industrial e de baixo valor comercial. O uso deste resíduo, além das razões econômicas, é também uma alternativa ambientalmente responsável, dando uma nova aplicação a este composto que é gerado em grandes volumes pelas usinas de biodiesel.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Verificar a produção de outros metabólitos nos diferentes tempos de fermentação e analisar se houve diferença entre as formulações na produção de ácido cítrico, láctico e qualquer outro metabólito identificado.
- Fazer um estudo do perfil de consumo do glicerol ao decorrer do tempo de fermentação, para verificar se este substrato está sendo consumido pelo microrganismo.
- Analisar a influência do sulfato de amônio, fonte de nitrogênio, na produção dos metabólitos.
- Outro ponto importante é realizar a identificação dos microrganismos isolados para verificar se há pesquisas utilizando estes microrganismos na biodegradação do glicerol e, assim, fazer comparações e adaptações com os trabalhos de outros pesquisadores. E também pode-se buscar na literatura suas características e exigências de nutrientes e outros parâmetros ideais para o seu crescimento e produção máxima de metabólitos de interesse.
- Como foi identificado a produção de ácido cítrico pelo microrganismo A, seria interessante focar o estudo na produção deste composto, já que o ácido cítrico é utilizado em várias indústrias como a de alimentos, bebidas, farmacêuticas e de cosméticos como acidificante, antioxidante, aromatizante, conservante e plastificante. Por ser um *commoditie*, é necessário a utilização de matéria-prima barata na produção de ácido cítrico, como o glicerol.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHBY, R.D.; SOLAIMAN, D.K.Y.; FOGLIA, T.A. Synthesis of short-/medium-chainlength poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. **Biomacromolecules**, Washington, v. 6, p. 2106-2112, 2005.

CAMERON, D. C. *et al.* Metabolic engineering of propanediol pathways. **Biotechnology Progress**, vol. 14, n. 1, p. 116-125, 1998.

CRISTO, C.; DORNELLES, R. G. **Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel**. Brasília: MDIC/MME, 2006. Disponível em: http://www.fiesp.com.br/download/palestras/carlos_cristo.pdf. Acesso em: 19/04/2015.

DANIEL, R.; STUERTZ, K.; GOTTSCHALK, G. Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*. **Journal of Bacteriology**, vol. 177, n. 5, p. 4392 – 4401, 1995.

DECKWER, W. D.. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. **FEMS Microbiology Reviews**. Vol. 16, p.143-149, 1995.

FERNANDES Jr., A; CEREDA, M.P. Influência no tempo de retenção hidráulica (TRH) sobre a fase acidogênica da digestão anaeróbia de manipueira. **Energia na Agricultura**, v.11, n.2, p.1-4, 1996.

FERREIRA, F.G.D. Bioconversão do glicerol a 1,3 – propanodiol para aplicação na obtenção do poli(tereftalato de trimetileno). 2013.138 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2013.

GAVALA, H. N. *et al.* Treatment of dairy wastewater using na upflow anaerobic sludge blanket reactor. **Journal of Agricultural Engineering Research**, Vol. 73, n. 1, pp. 59-63, 1999.

GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production. **Fuel Processing Technology**, vol. 86, n. 10, p. 1097 – 1107, 2005.

HOMANN, T.; TAG, C.; BIEBL, H.; DECKWER W.-D.; SCHINK, B. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Volume 33 Issue - 2 , p. 121 – 126, 1990.

ITO, T. *et al.*, Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 100, n. 3, p. 260 – 265, 2005

JOHNSON, D. T.; TACONI, K. A. The glycerin glut: options for to value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. **Environmental Progress**, Vol.26, n. 4, pp. 338 – 348, 2007.

LEE, P. C. *et al.*. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 72, n. 1, p. 41 – 48, 2001.

LUERS, F. *et al.*, Glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium pasteurianum*: cloning and expression of the gene encoding 1,3-propanediol dehydrogenase. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 154, n. 2, p. 337 – 345, 1997.

LYBERATOS, G. *et al.* An integrated approach for management of agricultural industries wastewaters. **Nonlinear Analysis: Theory, Methods & Applications**, Vol. 30, n. 4, pp. 2341-2351, 1997.

MACEDO, G. A. e MACEDO J. A. Biodiesel. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, n. 32, p. 38 – 46, 2004. Brasília: KL3 Publicações Ltda. Disponível em: http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio32/biodiesel_32.pdf. Acesso em: 19/04/2015.

MALAOUI, H. e MARCZAK, R. Separation and characterization of the 1,3-propanediol and glycerol dehydrogenase activities from *Clostridium butyricum* E5 wild-type and mutant D. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 90, n. 6, p. 1006-1014, 2001.

NÉMETH, A. e SEVELLA, B. Development of a New Bioprocess for Production of 1,3-propanediol I: Modeling of Glycerol Bioconversion to 1,3-propanediol with *Klebsiella pneumoniae* Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 144, n. 1, p. 47 – 58, 2008.

PACHAURI, N.; HE, B. **Value-added Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Production: A Survey of Current Research Activities**. ASABE Annual International Meeting - 2006. Paper Number: 066223. Disponível em: www.webpages.uidaho.edu/~bhe/pdfs/asabe066223.pdf. Acessado em: 15/04/2015.

PAPANIKOLAOU, S. *et al.*. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Journal of Applied Microbiology**, vol.92, n. 4, p. 737 – 744, 2002.

RAMBLA, M A O et al. Méis. **Manual dos derivados da cana-de-açúcar**. Instituto Cubano de Pesquisas dos Derivados da Cana-de-Açúcar. Cap. 2.4, p. 49-55. 1999.

RODRIGUEZ, M.A.A. Biotransformação do glicerol – subproduto da produção de biodiesel. 2010. 139 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2010.

SÁ, T.N.M. Produção de ácido cítrico utilizando glicerol residual da produção de biodiesel como substrato. 2011. 84 f. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2011.

SAMPAIO, B.M.L. **Viabilidade do processo de tratamentos de resíduo da industrialização da mandioca em sistemas de duas fases**. Maringá, 1996. 176p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá.

SIDRIM, J. J. C. e ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. **Guanabara Koogan**, 2004.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). **Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol. 71, p.783–789, 2006.

SRIVASTAVA, A. e PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 4, n. 2, p. 111 – 133, 2000

TAKAHASHI, M. Aproveitamento da manipueira e de resíduos do processamento da mandioca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.13, n.145, p.83-7, 1987.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., & CASE, C. L. *Microbiologia*, 6ª edição. **Artmed**, Porto Alegre, 2000.

TYSON, K. S. *et al.*. **Biomass oil analysis: research needs and recommendations**. Technical Report, n. 510-34796, pp. 116, 2004.

VALDUGA, E; TATSCH, P, O; TIGGEMAN, L; TREICHEL, H; TONIOZZO, G; ZENI, J; DILUCIO, M. **Produção de carotenóides: Microrganismos com fonte de**

pigmentos naturais. Revista Química Nova On-Line., São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2429 – 2436. 2009.

VOLLENWEIDER, S. e LACROIX, C. 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. **Applied Microbiology and biotechnology**, Vol. 64, n. 1, p. 16 – 27, 2004.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 18, p. 213–219, 2007.

ZENG, A. P. *et al.* Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 44, n. 8, p. 902-911, 1994.