

REVISTA BRASILEIRA DE ENERGIAS RENOVÁVEIS

BIOTRANSFORMAÇÃO DO GLICEROL POR ESPÉCIE DE *ASPERGILLUS*¹

MARCOS FELIPE DE M. LOPES², GISELE B. MESSIANO³, CAROLINE PETERS P. DE
NARDI⁴

¹Apresentado no 7º Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica do IFSP: 29 de novembro a 02 de dezembro de 2016 - Matão-SP, Brasil

²Graduando em Tecnologia em Biocombustíveis, Bolsista PIBIFSP, IFSP, Câmpus Matão, mmarcosffelipe@gmail.com

³Doutora Gisele Baraldi Messiano, Coorientadora, IFSP, Câmpus Sertãozinho, gbaraldi@ifsp.edu.br

⁴Doutora Caroline Peters Pigatto de Nardi, Orientadora, IFSP, Câmpus Matão, carolinepigatto@ifsp.edu.br

RESUMO: O glicerol, além de ser utilizado na fabricação de diversos produtos, tem tido sua utilização estudada como substrato para biotransformação em compostos mais reduzidos e de maior valor agregado, uma vez que é considerado uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por diversos microrganismos sob condições aeróbicas e anaeróbicas para obtenção de energia metabólica. O trabalho objetivou estudar a produção de compostos tendo o glicerol como fonte de carbono para o fungo *Aspergillus niger*, a fim de contribuir para um melhor destino do glicerol, subproduto da síntese do biodiesel, a partir de sua biotransformação.

PALAVRAS-CHAVE: glicerol; *Aspergillus niger*; fonte de carbono; fungo; compostos.

BIOTRANSFORMATION OF GLYCEROL BY SPECIE OF *ASPERGILLUS*

ABSTRACT: Glycerol, as well as being used in the manufacture of various products, has been their use studied as substrate for biotransformation into smaller compounds with greater added value, since it is considered a highly reduced and assimilable carbon source by many microorganisms under conditions aerobic and anaerobic to obtain metabolic energy. The work will aim to study the production of compounds using glycerol as a carbon source for the fungus *Aspergillus niger*, in order to contribute to a better destination of glycerol, a byproduct of biodiesel synthesis from its biotransformation.

KEYWORDS: glycerol; *Aspergillus niger*; carbon source; fungus; compounds.

INTRODUÇÃO

Quimicamente, o glicerol é um tri-álcool com três carbonos, tendo como nome sistemático (IUPAC) 1,2,3-propanotriol, é um líquido incolor, com gosto adocicado, sem cheiro e muito viscoso, derivado de fontes naturais ou petroquímica (BEATRIZ et al., 2011).

Diversas alternativas tecnológicas estão sendo propostas com o objetivo de encontrar um destino para o uso desse coproduto, evitando a sua disposição no meio ambiente. Dentre elas, pode ser destacada a biotecnologia, na qual o glicerol é convertido em produtos com objetivo de agregar valor a este coproduto.

Uma das principais promessas de aplicação do glicerol é na bioconversão para compostos de alto valor através de fermentação microbológica. O glicerol é barato, abundante e possui grau de redução mais elevado que açúcares oferecendo a oportunidade de obter compostos reduzidos como succinato, etanol, xilitol, propionato, hidrogênio, etc., em rendimentos mais altos do que aqueles obtidos utilizando como fonte de carbono açúcares (DA SILVA et al., 2009).

E o fato do glicerol ser uma fonte de carbono altamente assimilável em grandes quantidades e podendo ser utilizado por um grande número de microrganismos o torna uma fonte de carbono renovável com grande potencial para uso em processos bioquímicos na obtenção de produtos de alto valor agregado. Pesquisas atuais têm mostrado o potencial de agregação de valor ao glicerol por meio da sua utilização como substrato para a produção de ácido cítrico, biossurfactantes, acroleína e gás de síntese mostrando que a valorização deste co-produto pode ocorrer através de rotas biotecnológicas e químicas (SOUSA et al., 2014).

Com base nas informações anteriores o objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento e a produção de compostos tendo o glicerol como fonte de carbono para o fungo *Aspergillus niger*, a fim de contribuir para um melhor destino do glicerol, subproduto da síntese do biodiesel, a partir de sua biotransformação.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desse trabalho, foram utilizadas as vidrarias necessárias disponíveis no laboratório do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia - Câmpus Matão.

Utilizou-se para a realização do trabalho o fungo *Aspergillus niger*.

No meio de cultivo foram estudadas as variações da fonte de carbono, utilizando duas fontes como a glicose e o glicerol.

Sendo o meio que possuía somente caldo de batata foi o teste negativo, o meio que possuía caldo de batata e glicose foi o teste positivo e o meio que possuía caldo de batata e glicerol foi o teste de interesse.

Para preparação do inóculo foi utilizado o fungo *Aspergillus niger* (pronto, a partir de uma cultura estoque), onde foi transferido assepticamente para as placas de Petri, por semeadura de estria simples (transferiu uma alçada da cultura para o meio sólido em placa e com a alça bacteriológica fez-se estrias sobre o meio. A estria foi realizada em movimento de zig-zag sobre o meio) e colocados na câmara para germinação com fotoperíodo, em torno de 28°C para crescimento.

Após o plaqueamento e período de crescimento, os esporos foram transferidos (aproximadamente 1 mL) para 100 mL de caldo de batata contido em frasco de erlenmeyer (250 mL). Este foi mantido sob agitação de 100 rpm a 28 °C por 7 dias em mesa agitadora (Shaker).

Foi realizada a extração líquida-líquida, após o crescimento dos fungos com o solvente orgânico acetato de etila, imiscível em água, onde realizou-se o descarte da fase aquosa e a evaporação do solvente.

Após a evaporação do solvente, os extratos finais foram armazenados em pequenos vidros para realização das análises.

Para as análises foi utilizado o método de cromatografia em camada delgada (CCD).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento do fungo se deu por dois preparos de meio de cultura a fim de avaliar em qual haveria um melhor crescimento, o primeiro foi o preparo de uma receita de PDA caseiro,

através do cozimento de batata, utilizando o caldo filtrado com a adição de dextrose e ágar, como mostra a Figura 1 abaixo. O segundo foi o preparo de PDA disponível no laboratório, da marca Kasvi, como mostra a Figura 2 abaixo.

FIGURA 1. Crescimento do fungo *Aspergillus niger* no meio de cultivo PDA caseiro.

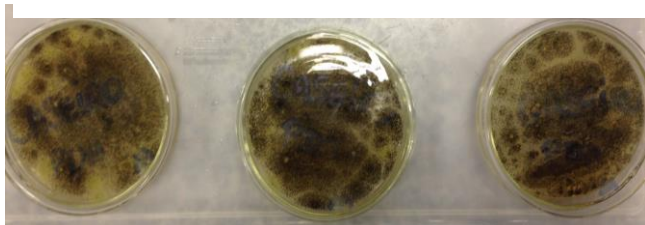


FIGURA 2. Crescimento do fungo *Aspergillus niger* no meio de cultivo PDA.



O meio de cultivo que apresentou melhor potencial de crescimento para o fungo *A. niger* foi o PDA caseiro, o qual foi escolhido para a realização do trabalho, o outro foi devidamente descartado.

Após um período de crescimento de 4 dias, foi colocado nas placas água destilada autoclavada onde realizou-se uma raspagem dos esporos com uma alça, posteriormente foi transferida cerca de 1 mL dessa raspagem para 12 erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de água de cozimento de batata com dextrose. Esses erlenmeyers foram colocados no Shaker a 28°C durante 2 dias a 100 rpm.

Após esse período, foram retirados do Shaker para a adição do glicerol e glicose, onde em 4 erlenmeyers não foi adicionado nada, em 4 erlenmeyers foi adicionado 15 mL de glicerol e em 4 erlenmeyers foi adicionado 15g de glicose, todo esse procedimento foi realizado na capela de fluxo laminar, utilizando materiais devidamente esterilizados e higienizados.

Após um período de 7 dias foi possível observar a formação de micelas, como mostra a Figura 3 abaixo.

FIGURA 3. Formação de micelas pelo fungo *Aspergillus niger*.



Após a formação de micelas, realizou-se a filtração dos líquidos, fase aquosa, onde foi feita uma extração líquido-líquido com o solvente orgânico acetato de etila que é imiscível com a água, essa extração foi realizada 3 vezes. A fase aquosa foi descartada e o solvente evaporado no rotaevaporador, os extratos finais foram colocados em pequenos vidros com tampa.

Na análise cromatográfica (CCD), a placa de sílica (SiO_2) foi utilizada como fase estacionária e as misturas clorofórmio/metanol, clorofórmio/metanol/ácido acético, hexano/acetona, hexano/acetato de etila e hexano/acetato de etila/ácido acético, cujas proporções variaram de 9:1 a 1:1 (v/v), que foram utilizadas como eluente, suas aplicações foram feitas com tubos capilares e as revelações feitas com iodo, mostradas a seguir:

(Proporções na ordem: 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1 / Ordem de aplicação: caldo, glicose e glicerol).

FIGURA 5. *Aspergillus niger*: clorofórmio/metanol



FIGURA 7. *Aspergillus niger*: hexano/acetato de etila



FIGURA 9. *Aspergillus niger*: hexano/acetona



FIGURA 6. *Aspergillus niger*: clorofórmio/metanol e ácido acético



FIGURA 8. *Aspergillus niger*: hexano/acetato de etila e ácido acético



As análises realizadas através da cromatografia de camada delgada mostraram eficiência no arraste da amostra pela placa

Fontes orgânicas de carbono são utilizadas para fornecer energia e carbono ao microrganismo. A glicose é uma das fontes mais utilizadas em cultivos de fungos, gerando elevadas taxas de crescimento. O glicerol também pode ser utilizado como fontes de carbono, por apresentar elevadas taxas de crescimento e também pelos fungos conseguirem metabolizar

e converter em compostos de alto valor agregado. Foi possível observar que houve consumo dos substratos, glicerol e glicose pelo fungo e através das revelações cromatográficas foi possível observar a presença de um composto na amostra com glicerol.

O método mostrou-se rápido, barato e eficiente.

CONCLUSÕES

O glicerol foi empregado como fonte de carbono para o fungo *Aspergillus niger* a fim de avaliar sua possível biotransformação.

Através das análises das placas cromatográficas, foi possível observar o consumo do glicerol pelo fungo, já que o mesmo consegue metabolizar o glicerol e converter em compostos de alto valor agregado. Essas análises pela cromatografia em camada delgada apresentam informações relevantes da presença de metabólitos para que posteriormente possa realizar o isolamento.

Outras análises serão feitas a fim de confirmar a possível biotransformação, como a cromatografia gasosa, para uma melhor resolução e separação de compostos.

Assim, a utilização do glicerol como fonte de carbono para produção de compostos de alto valor agregado, através de biotransformação deve ser considerada na busca de novas alternativas para absorver e agregar valor ao seu excedente proveniente da indústria de biocombustíveis.

AGRADECIMENTOS

Ao órgão de fomento, Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de São Paulo, PIBIFSP, pelo apoio financeiro e pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

BEATRIZ, A. et al. Glicerol: Um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. *Quim. Nova*, v. 34, n. 2, p. 306-319, 2011.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (orgs.) Fundamentos de cromatografia, Campinas: Editora Unicamp, 2006.

DA SILVA, G. P. et al. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, v.27, p.30–39, 2009.

SOUSA, J. R. et al. Cinética e caracterização de Ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 utilizando glicerol como fonte de carbono. *Quim. Nova*, v. 37, n. 3, p. 431-441, 2014.

SUN, R. et al. Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*, *Phytochemistry Letters*, p.101-105, 2010.

VARGA, J. et al. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 110, p. 627–640, 2004.

ZIMMER, G. F. et al. Avaliação de fontes de carbono para a produção de inibidor de crescimento de *Aspergillus fumigatus* USP2 por *Corynebacterium* sp. *Revista Jovens Pesquisadores*, Santa Cruz do Sul, v.3, n.1, p.145-155, 2013.