

AValiação DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO PROPIÔNICO

R.C.ROCHA¹, V.C.ROCHA¹, M.A.TEIXEIRA¹, P.G. CASTRO¹, R.N.MAEDA¹, N.P.Jr¹

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica
E-mail para contato: renata.eq.ufrj@gmail.com

RESUMO – No contexto em que há um crescimento da preocupação ambiental e um possível esgotamento do petróleo surge o interesse pela produção de alguns ácidos carboxílicos a partir de biomassa via fermentação, dentre eles o ácido propiônico. Ele é utilizado como antifúngico na alimentação humana e na conservação de grãos, aditivo em alimentos de origem animal, entre outros. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da temperatura na batelada alimentada com células imobilizadas para a produção de ácido propiônico. Para isso, foi realizado o crescimento da bactéria do gênero *Propionibacterium* a 30°C e pH 7 e esta foi imobilizada de forma passiva no bagaço para posterior utilização em fermentações conduzidas em biorreatores instrumentados com controle de temperatura a 30°C e sem controle de temperatura. Além disso, a agitação foi mantida a 150 rpm e o pH em 7 com variação de $\pm 0,1$. A fermentação onde o parâmetro temperatura foi controlado a 30°C mostrou-se melhor, pois produziu cerca de 37 g/L de ácido propiônico em detrimento de 26 g/L produzidos no ensaio sem o controle, além de uma produtividade superior. Concluiu-se que foi possível a produção de ácido propiônico por rota biotecnológica e que o parâmetro temperatura é de suma importância na produção deste ácido utilizando células imobilizadas.

1. INTRODUÇÃO

Os ácidos orgânicos são de extrema importância nas indústrias química, de alimentos e farmacêutica. Os mais importantes dentre eles são os ácidos carboxílicos. Uma das grandes aplicações de ácidos orgânicos é a sua utilização como intermediário na produção de plásticos biodegradáveis. Atualmente, muitos ácidos carboxílicos (incluindo os ácidos propiônico, butírico e acético) são produzidos, principalmente, por síntese química baseada no petróleo (YANG, 2008). Todavia, a preocupação com o esgotamento das reservas mundiais de matérias-primas fósseis estimulou a busca por fontes alternativas de produção de produtos petroquímicos e, neste contexto, está inserido o ácido propiônico.

Recentemente, este ácido tem chamado a atenção por ser um importante bloco de construção químico de três átomos de carbonos. Dentre as suas mais variadas aplicações, destacam-se seu papel como conservante na indústria de alimentos, aromatizante na indústria de cosméticos, além de aplicações farmacêuticas e na produção de plásticos e herbicidas (SUWANNAKHAM *et al.*, 2006).

Existe uma grande procura para produção de ácido propiônico por via biotecnológica, que pode ser produzido através de fermentação por meio de bactérias, tais como *Selenomonas ruminantium*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium acidipropionici*.

As bactérias do gênero *Propionibacterium* são capazes de produzir o ácido propiônico em quantidades expressivas (ZHU et al., 2012). São gram positivas, imóveis, não formadoras de esporos, anaeróbias ou anaeróbias facultativas, catalase-positivas e apresentam-se sob a forma de bastonetes curtos ou de cocos, de acordo com o meio em que se encontram. A linhagem utilizada neste trabalho foi *Propionibacterium acidipropionici*.

Por tudo acima reportado, o objetivo do presente trabalho foi obter a máxima produção de ácido propiônico, evitando a inibição característica deste tipo de fermentação, utilizando-se da estratégia de conduzir uma batelada alimentada por pulsos em um reator com células imobilizadas no bagaço de sorgo, avaliando a influência do parâmetro temperatura.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Procedimento experimental

A cultura estoque de *Propionibacterium acidipropionici* foi armazenada em tubos criogênicos contendo 25% de glicerol e conservada a - 80° C. Nas etapas de pré-inóculo e do inóculo foi utilizado o meio sintético *Reinforced Clostridial Broth* (RCB) (CORAL, 2008), contendo por litro: 10 g de caseína enzimática hidrolisada e de extrato de carne bovina; 3 g de extrato de levedura e de acetato de sódio; 5 g de cloreto de sódio e de dextrose; 1 g de amido solúvel e 0,5 de cloreto de L-cisteína. No inóculo, no entanto, houve um incremento de 10g/L da fonte de carbono, a xilose e de 10% (v/v) do volume do pré-inóculo crescido pelo tempo determinado a partir da cinética realizada. Estas etapas foram realizadas em frascos de penicilina, onde gás nitrogênio foi injetado por 10 min com o auxílio da mesa inoculadora com o intuito de proporcionar a condição de anaerobiose dos ensaios. Como medida de controle do método e para garantir esta condição, em todas as etapas, utilizou-se a substância rezazurina na concentração de 1 mL/L como indicador colorimétrico de oxigênio (na ausência de oxigênio, a solução deve ficar amarela). Previamente, os meios foram esterilizados em autoclave, a 121° C (1 atm) por 20 min. Após serem inoculados, em ambas as etapas (pré-inóculo e inóculo), o meio foi incubado a 30° C por 24 h.

Com a finalidade de se obter a máxima produção de ácido propiônico, evitando a inibição característica deste tipo de fermentação, foi realizada a estratégia de conduzir uma batelada alimentada por pulsos em um reator com células imobilizadas no bagaço de sorgo. A imobilização utilizada nos ensaios foi passiva sendo utilizado o método de adsorção (Pereira Jr., et al., 2008), em um reator de imobilização.

O sistema de fermentação (Figura 1) foi constituído de dois reatores: um BioFlo (New Brunswick BioFlo 310®) com volume nominal de 1,5 L e um reator de imobilização com volume nominal de 0,12 L. O meio de fermentação utilizado foi baseado no descrito por Lewis e Yang (1992a,b) contendo por litro: 4 g de TSB; 0,25 K₂HPO₄; 0,05 g de MnSO₄; 9 g de extrato de levedura. Este meio foi esterilizado junto com o biorreator a 121° C (1 atm) por 30 minutos e o

meio contendo xilose (40 g/L inicial) foi esterilizado a 111° C (0,5 atm) durante 20 min. O reator de imobilização, já com as células imobilizadas, foi conectado através de mangueiras ao BioFlo, que continha 1,2L de meio de fermentação já esterilizado a 121° C por 30 min. A bomba do biorreator foi ativada para funcionar 25% do tempo, o que corresponde a 40 minutos para que todo o meio de fermentação passasse pelo bagaço imobilizado (1,8 L/h). A circulação do meio de fermentação no reator de imobilização para o BioFLO ocorreu de forma ascendente. Após o esgotamento do substrato, houve alimentações que se constituíram de soluções de xilose concentradas (400g/L), cujo volume adicionado foi calculado a fim de manter a concentração no meio em torno de 20 g/L (50% da concentração inicial). A influência do parâmetro temperatura também foi avaliada no presente trabalho, sendo então realizadas duas fermentações. As condições operacionais das fermentações foram pH 7 +/- 1; 150 rpm e injeção de nitrogênio a 0,06 vvm sendo que na primeira fermentação o controle de temperatura foi desligado, já no segundo, controle de temperatura manteve-se em 30°C com variação de 1°C.

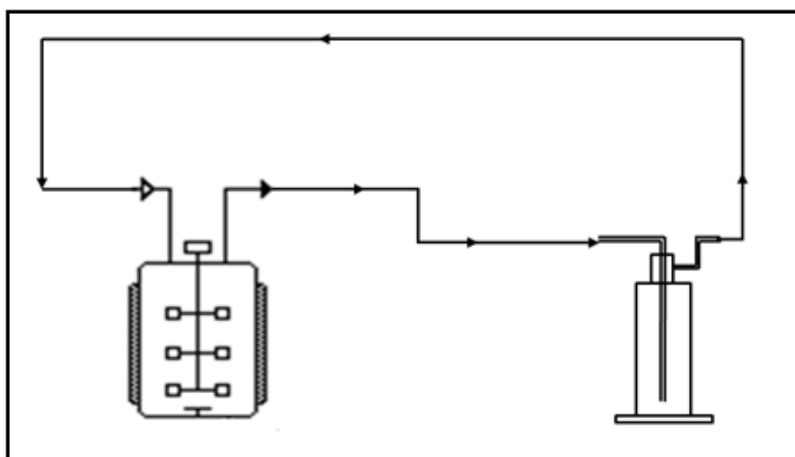


Figura 1 - Esquema da imobilização de *P.acidipropionici* em bagaço de sorgo

Foram coletadas amostras em intervalos de tempo regulares e estas foram devidamente tratadas para se obter os resultados de concentração de ácidos orgânicos (ácido propiônico, acético e succínico) e xilose que foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em dois cromatógrafos: Shimadzu e Waters, acoplado a uma coluna PL Hi-Plex. As condições operacionais utilizadas para as análises foram: fase móvel de 0,005 mol/L de H₂SO₄; fluxo de 0,6 mL/min; volume de injeção de 20µL ; temperatura de 60° C e os detectores foram o Índice de Refração para os açúcares (RID a 50° C) e o Ultra-Violeta (UV/VIS) para os ácidos orgânicos. Já a quantificação celular foi realizada por turbidimetria a 600nm em um espectrofotômetro UVmini 1240 - SHIMADZU.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o intuito de avaliar o parâmetro temperatura foram realizados 2 ensaios de batelada alimentada, um com a temperatura controlada e outro sem controle de temperatura. As cinéticas estão reportadas nas figuras 1 e 2 respectivamente. Cabe ressaltar que os valores estão demonstrados em massa, para permitir uma melhor visualização.

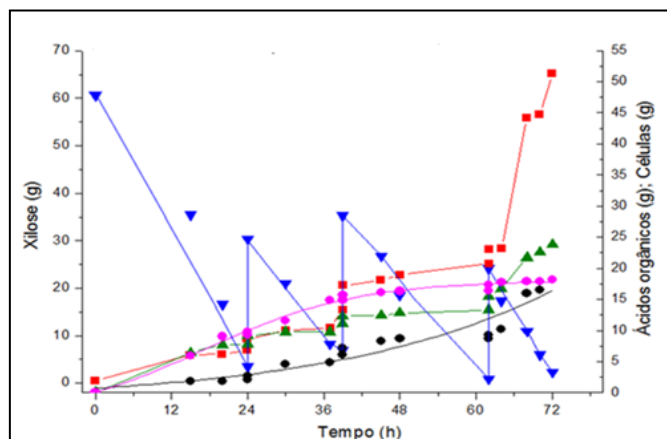


Figura 2 - Perfil cinético da batelada alimentada em biorreator empregando células imobilizadas de *P. acidipropionici* em bagaço de sorgo com 40 g/L de xilose inicial e alimentações de 20 g/L, com temperatura controlada (pH 7,0, 30°C, 150 rpm).
Legenda: ▼ Xilose ■ Ácido propiônico ▲ Ácido acético ● Células ● Ácido Succínico

No ensaio em que se controlou a temperatura, o reator BioFlo (New Brunswick BioFlo 310®) teve este parâmetro controlado a 30° C +/- 1° C do início ao fim do processo. O processo teve uma duração de 72 h e sua produção de ácido propiônico foi de 37 g/L, já a de ácido acético e succínico foi de 17,05 g/L e 14,21 g/L, respectivamente. A produtividade volumétrica global foi de 0,51g/L.h e as razões P/A e P/S foram de 2,2:1 e 2,6:1, nessa ordem. Além disso, a eficiência do processo foi de 83% e as médias dos fatores $Y_{P/S}$ foi de 0,41g/g e o $Y_{X/S}$ foi 0,18g/g.

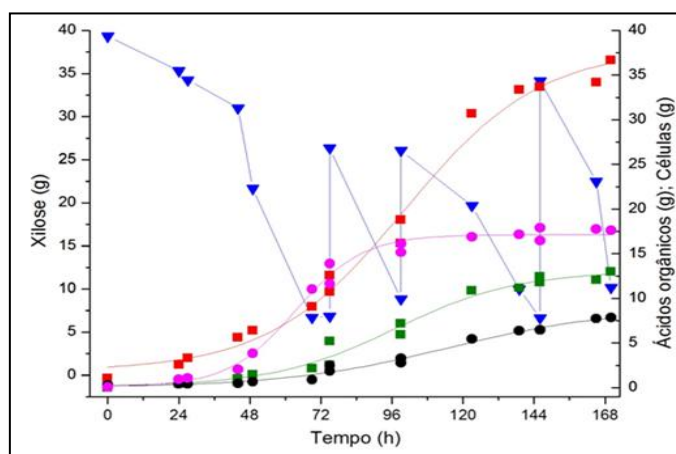


Figura 3 - Perfil cinético da batelada alimentada em biorreator empregando células imobilizadas de *P. acidipropionici* em bagaço de sorgo com 40 g/L de xilose inicial e alimentações de 20 g/L, sem temperatura controlada (pH 7,0, 150 rpm).
Legenda: ▼ Xilose ■ Ácido propiônico ▲ Ácido acético ● Células ● Ácido Succínico

Na cinética de batelada alimentada sem temperatura controlada, pode-se observar que houve a produção de 26,2 g/L de ácido propiônico, 9,3 g/L de ácido acético e 5,62 g/L de ácido succínico. Além disso, atingiu-se uma produtividade volumétrica global de 0,15 g/L.h, um $Y_{X/S}$ de 0,35 g/g e uma razão P/A de 2,8:1. A razão entre ácido propiônico e succínico foi de

aproximadamente 5:1 e houve uma produção de 64 % do ácido propiônico em relação ao total de ácidos. O tempo de fermentação foi muito longo, 170 horas, e isto explica a baixa produtividade. O fator de rendimento em células foi de 0,29 g/g, já os fatores de rendimentos em produtos foram 0,3 g/g (batelada inicial), 0,42 g/g (primeira alimentação), 0,61 g/g (segunda alimentação) e 0,14 g/g (terceira alimentação) ao longo das alimentações, sendo a média 0,37 g/g. Houve, também, uma eficiência de fermentação de 75%.

Alguns autores como CORAL (2008) já estudaram a influência da temperatura na fermentação do ácido propiônico a partir de lactato, melaço de cana e glicerol e, com uma temperatura de 30° C. Este autor alcançou valores de concentração de ácido propiônico de 15,06 g/L, 7,55 g/L e 6,77 g/L, respectivamente, superiores aos encontrados em 36° C (13,32 g/L, 3,71 g/L e 4,87 g/L respectivamente), além de um aumento na razão P/A com a temperatura de 36° C em relação a de 30° C. Seus resultados vão ao encontro dos conseguidos na presente pesquisa e demonstram a importância do controle de temperatura. Em relação à batelada alimentada com células imobilizadas, outros autores também desenvolveram trabalhos, como LIANG et al, 2012, que realizaram experimento em batelada alimentada com células imobilizadas e conseguiram uma produção de ácido propiônico de 68,9 g/L em um tempo de 200 h, com uma produtividade volumétrica de 0,34 g/L.h. Cabe destacar aqui, que a produtividade do presente trabalho foi de 0,51 g/L.h e com alimentações de 20 g/L de xilose em contraste a um outro trabalho que utilizou 20 g/L de glicose e 40 g/L de frutose.

Uma comparação mais explícita dos dados encontrados nestes 2 experimentos pode ser observada no gráfico de barras (Figura 4), no qual é mostrado a diferença entre as produtividades volumétricas e as produções de ácido propiônico, evidenciando a importância do controle da temperatura nesta fermentação.

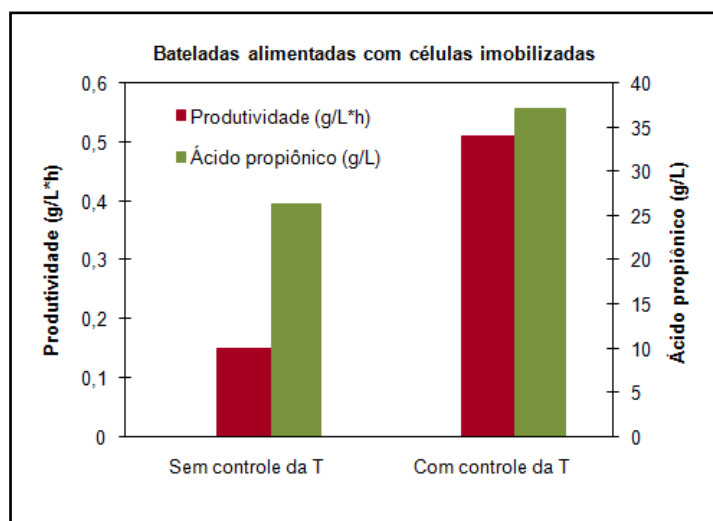


Figura 4 - Gráfico comparativo entre as bateladas alimentadas sem controle de temperatura e com controle de temperatura.

Legenda: ■ Produtividade ■ Ácido propiônico

4. CONCLUSÃO

Ao serem comparados os dois processos de batelada alimentada com células imobilizadas, onde foi estudado o controle de temperatura, pode-se observar que na fermentação conduzida com controle de temperatura, obteve-se um aumento de cerca de 41 % na produção de ácido propiônico (37g/L de ácido propiônico em comparação com 26g/L), com um decréscimo de 57 % no tempo (170 horas sem controle de temperatura para 72 horas de processo ao se controlar este parâmetro). Além disso, a temperatura também influenciou na razão entre ácido propiônico e ácido acético produzidos. Desta forma, fica evidente a importância do parâmetro temperatura na batelada alimentada utilizando células imobilizadas para a produção de ácido propiônico.

5. REFERÊNCIAS

CORAL, J., KARP, SG., PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, L., PARADA, JL., PANDEY, A., SOCCOL, CR. 2008. Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. Appl Biochem Biotechnol. Dec;151(2-3):333-41.

LEWIS V.P., YANG S.T., 1992a. Continuous propionic acid fermentation by immobilized *Propionibacterium acidipropionici* in a novel packed-bed bioreactor. Biotechnol Bioeng 40:465-474.

LEWIS VP, YANG S-T. 1992b. Continuous propionic acid fermentation by using immobilized *Propionibacterium acidipropionici* in a novel packed-bed bioreactor. Biotechnol Bioeng 40:465-474.

PEREIRA JR, N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. (2008b). Biomass of lignocellulosic compostion for fuel ethanol production and the context of biorefinery. Series on Biotechnology. Biblioteca Nacional: Rio de Janeiro, v. 2, 2008.

LIANG X.L.; LI, L., LI, SHUANG L.; CAI YH.; YANG, ST.; WANG JF. 2012. Enhanced propionic acid production from Jerusalem artichoke hydrolysate by immobilized *Propionibacterium acidipropionici* in a fibrous-bed bioreactor. Bioprocess Biosyst. Eng. 35: 915-921