

PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) POR *Bacillus megaterium* EM EMULSÃO DE ÓLEO DE ARROZ

LETÍCIA ZARNOTT LAGES¹; MARIANE IGANSI ALVES²; KARINE LASTE MACAGNAN³; PATRÍCIA DIAZ DE OLIVEIRA⁴; ANGELITA DA SILVEIRA MOREIRA⁵; CLAIRE TONDO VENDRUSCOLO⁶

¹Graduação em Química de Alimentos, CCQFA, UFPel - leticiazarnott@hotmail.com;

²Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, PPGCTA, UFPel - marianeigansialves@hotmail.com;

³Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, CDTec, UFPel - karinemacagnan@hotmail.com;

⁴CDTec, UFPel - bilicadiaz@yahoo.com.br

⁵CDTec, CCQFA, UFPel - angelitadasilveiramoreira@gmail.com;

⁶CDTec, CCQFA, UFPel - claire.vendruscolo@pq.cnpq.br

1. INTRODUÇÃO

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são plásticos tipo poliésteres acumulados no citoplasma bacteriano como material de reserva de energia e carbono. Estes bioplásticos, produzidos a partir de fontes renováveis, se degradam completamente e sob curto período de tempo pela ação enzimática de microrganismos quando em condições apropriadas no meio ambiente; além disso, são termoplásticos e biocompatíveis ao ser humano (PIEMOLINI, 2004).

Dentre os PHAs, o Poli(3-hidroxibutirato) ou P(3HB) é o polímero plástico de fonte renovável mais estudado. Apresenta, em alguns aspectos, propriedades e características semelhantes às daquelas do polipropileno: termoplástico com temperatura de fusão semelhante, altamente cristalino, possui grau elevado de polimerização e é insolúvel em água (GOMES; BUENO NETTO, 1997).

Os fatores que afetam a sua economia incluem os custos de matérias primas e o processamento (MOZUMDER, et al; 2014). A redução dos custos de produção depende da obtenção de linhagens altamente eficientes na conversão dos substratos no produto desejado, de utilização de substratos de baixo custo, do desenvolvimento de processos que permitam explorar ao máximo o potencial dessas linhagens, de forma a tornar os custos de recuperação do produto os menores possíveis (GOMES; BUENO NETTO, 1997).

Esse trabalho tem por objetivo avaliar o rendimento de massa celular seca e de polímero de meio de cultura em uma solução visando o aumento de rendimento de biomassa e acúmulo de polímero suplementado com óleo de arroz e emulsionado com os emulgentes Tween80 e Span80.

2. METODOLOGIA

Foi utilizado a cepa de *Bacillus megaterium* pertencente à coleção de culturas de microrganismos do Laboratório de Biopolímeros do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas.

Através de repiques multiplicativos o microrganismo foi incubado a 36°C, durante 48h em meio sólido *Nutritive Yeast Agar* (NYA) (PAGGE, 1982). O inóculo foi realizado com a ressuspensão das células em meio líquido *Yeast Malt* (YM) (JEANES, 1974) em frascos *Erlenmeyers* aletados de 500mL. As condições de cultivo foram 36°C, 150rpm e 24h. Para a fase de produção, foi utilizado o meio mineral F4 (OLIVEIRA, 2010) adicionado de óleo de arroz nas concentrações de 20, 50 e 100g/L emulsionado por 1,5% de Span80-Tween80 na proporção de 37,4%/ 62,6% respectivamente e 2,5% de glicerina. Inoculou-se 20% do inóculo

em frascos *Erlenmeyer* aletados de 500mL contendo 160mL do meio de produção emulsionado; incubou-se em agitador incubador orbital a 36°C e 200rpm durante 72h.

A determinação da massa celular seca (MCS) foi realizada da seguinte forma: as células foram transferidas para tubos *Falcon* e submetidas a uma centrifugação a 10.000 x g por 15min a 4°C. O sobrenadante foi separado e a biomassa massa celular em solução salina 0,89% e novamente centrifugada. O *pellet* de células foi seca em estufa a 56°C até atingir peso constante.

Para a extração de polímero, a MCS foi submetida à agitação com clorofórmio na proporção 40:1v/m na temperatura de 58°C. Transferiu-se a solução para funil de decantação e adicionou-se 40 partes de água destilada. Em seguida, repousou-se para a separação de fases e transferiu-se a fase orgânica para placa de Petri. Armazenou-se em capela de exaustão de gases, para a evaporação do solvente e formação do biofilme (MACAGNAN, 2014). Após sua recuperação, os filmes foram pesados para o cálculo de rendimento, que foi expresso em porcentagem. Todas as médias foram comparadas e analisadas estatisticamente pelo teste de *Tukey* $p < 0,05$ no programa Statistix 9.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os rendimentos obtidos para MCS e polímero em solução suplementado com óleo de arroz emulsionado com Tween80 e Span80 podem ser observados nas Fig. 1 e Fig. 2, respectivamente.

Em relação ao rendimento de massa celular seca pode-se observar que a suplementação com a maior concentração de óleo de arroz (100g/L) resultou em maior rendimento (11g/L). Nas concentrações de 20 e 50g/L de óleo de arroz o rendimento diminui para 4,33 e 5,08g/L, respectivamente. Acredita-se que o rendimento com a maior suplementação de óleo pode ter sido superestimado pelo excesso de óleo (não completamente emulsionado) retido na biomassa recuperada. Assim recomenda-se realizar lavagens das células centrifugadas com detergente, permitindo a retirada total do óleo presente.

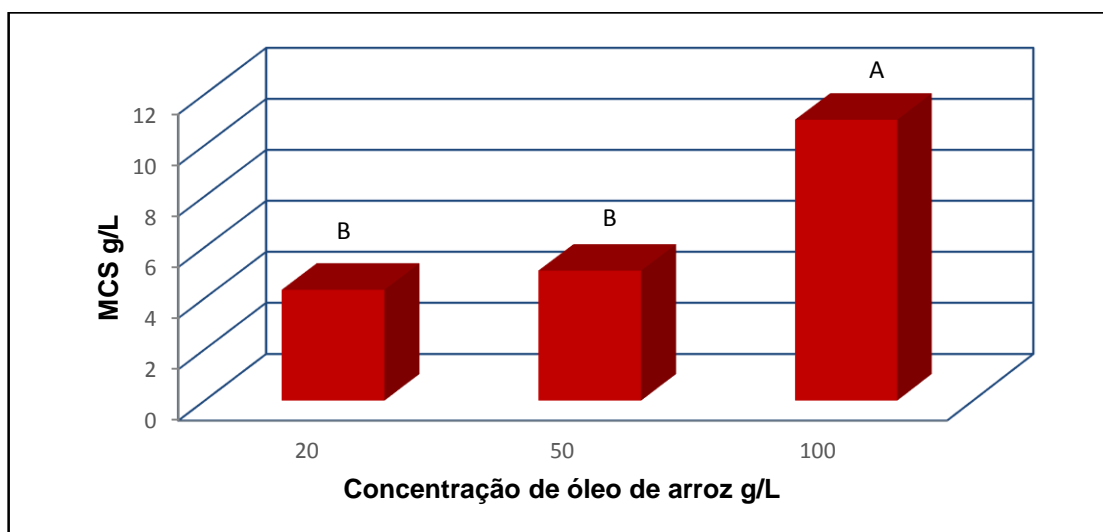
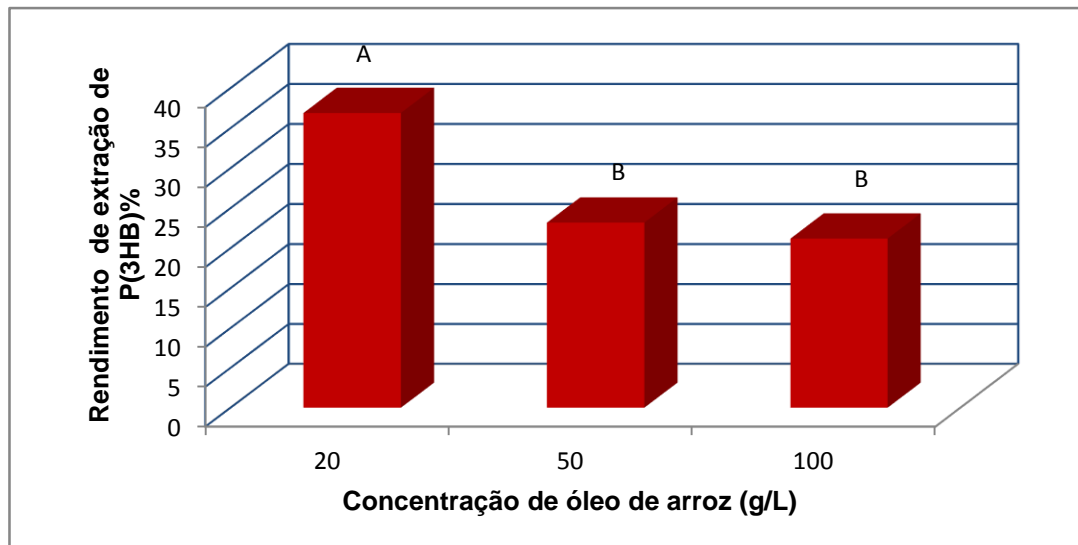


Figura 1. Rendimento de MCS em 72h de produção nas concentrações de óleo de arroz (20, 50 e 100 g/L). Letras diferentes significam que as médias obtidas diferiram estatisticamente pelo teste de *Tukey* $p < 0,05$.

Já para rendimento de polímero extraído da massa celular seca, o melhor resultado foi obtido com a suplementação de óleo na menor concentração (20g/L) ocasionando em 36,9% de extração de P(3HB). Para as concentrações de 50 e 100g/L foram obtidos baixos rendimentos de 23,2 e 22%, respectivamente.

Figura 2. Rendimento de polímero em 72h de produção nas diferentes concentrações de óleo de



arroz (20, 50 e 100 g/L). Letras diferentes significam que as médias obtidas diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey $p < 0,05$

Estudos de suplementação de cultivos utilizando os ácidos oléico e linoléico demonstraram que a adição resulta em aumento na produção de PHAs (SQUIO; ARAGÃO, 2004). Estes ácidos graxos fazem parte da composição de muitos óleos vegetais tornando-os uma possível alternativa de baixo custo para suplementação de cultivos.

Ainda vale ressaltar que a adição dos emulsificantes, Tween 80 e Span 80, no meio de cultivo têm como função diminuir a tensão interfacial, promover a mistura homogênea do meio e estabilizar as emulsões geradas, facilitando a disponibilidade do óleo para o consumo do microrganismo (BECHER, 1957). DALCANTON et al. (2010) avaliaram a influência da suplementação de óleo de soja (0,3g/L) para a linhagem de *Cupriavidus necator*, porém sem a adição de emulsificantes. Observaram que a suplementação, mesmo em pequenas quantidades, ocasionou aumento no acúmulo de polímero (43%) quando comparado ao meio de cultivo não suplementado (35%). Já para o rendimento de biomassa, o óleo de soja suplementado resultou em menor rendimento. AKIYAMA et al. (1992) também avaliaram a suplementação de óleo de soja (3,0g/L) no meio de cultivo de *Alcaligenes* sp. e alcançaram a porcentagem de 33% de P(3HB). Sendo esse resultado semelhante ao encontrado no presente trabalho quando adicionou-se 20g/L de óleo de arroz no meio de cultivo.

Ao avaliarem diferentes tipos de substratos para a produção de Poli(3-hidroxiobutirato) por *Bacillus megaterium*, Nainka e colaboradores (2014), observaram que ao utilizarem um efluente da indústria de soja (concentração de carbono de 16 g/L), em 24h em estufa incubadora rotatória, tiveram um rendimento de polímero de $30\% \pm 4\%$, já em 48h, o rendimento foi de $22\% \pm 1\%$. Sendo esse resultado semelhante ao encontrado no presente trabalho quando adicionou-se 20g/L e 50g/L de óleo de arroz no meio de cultivo.

Através desses resultados é possível observar que o aumento dos rendimentos, massa celular seca e polímero, ocasionados pela adição de óleo variam conforme a concentração deste adicionado ao meio de cultivo.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a maior concentração de óleo de arroz como suplemento no meio mineral proporcionou o aumento de rendimento de massa celular seca, porém para obterem-se maiores rendimentos de P(3HB) deve ser utilizada a menor concentração de óleo analisada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIYAMA, M.; TAIMA, Y.; DOI, Y.; EUR, J. Production of poly (3-hydroxyalkanoates) by a bacterium of the genus *Alcaligenes* utilizing long-chain fatty acids. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 37, p. 698, 1992.

BECHER, P. **Emulsions: Theory and Practice**. American Chemical Society Monograph, n.º 135, Reinhold, New York. 1957.

DALCANTON, F.; IENCZAK, J. L; FIORESE, M. L; ARAGÃO, G. M. F. Produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* em meio hidrolisado de amido de arroz com suplementação de óleo de soja em diferentes temperaturas. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 552-556, 2010

GOMES, J.G.C.; BUENO NETTO, C.L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 17, p. 24-29, 1997.

JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, p. 34-40, 1974.

MACAGNAN, Karine Laste. **Otimização de metodologia de extração química clássica de poli(3-hidroxibutirato) sintetizado por *Ralstonia solanacearum***. 2014. 69f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MOZUMDER, M. S. I.; GOORMACHTIGH, L.; GARCIA- GONZALES, L.; WEVER, H.; VOLCKE, E. I.P.; Modeling pure culture heterotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB), **Bioresource Technology**, v. 155, p. 272–280, 2014.

OLIVEIRA, C. **Produção de polihidroxibutirato: bioprospecção de *Beijerinckia* sp. da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CDTec - UFPEL**. Dissertação Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

PIEMOLINI, L.T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *C. violaceum* para estudos de mutação sítio-dirigida**. Dissertação. Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, UFSC, Florianópolis. 2004.

SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M. F. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bactérias. **Química Nova**, v. 27, p. 615, 2004.