

Engenharia de Alimentos

POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) [P(3HB)]: RENDIMENTO DE MASSA CELULAR SECA E ACÚMULO DE POLÍMERO SINTETIZADO POR *Bacillus megaterium* A PARTIR DE EMULSÃO EM ÓLEO DE ARROZ

Mariane Igansi Alves^{1*}, Karine Laste Macagnan², Amanda Ávila Rodrigues², Victoria de Moraes Gonçalves², Ana Cláudia da Silva Pôrto², Dener Acosta de Assis^{*3}, Patrícia Diaz de Oliveira¹, Claire Tondo Vendruscolo³, Angelita da Silveira Moreia³

¹PPGCTA- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS; ²PPGB- Universidade Federal de Pelotas/RS;

³CCQFA- Universidade Federal de Pelotas/RS

*E-mail: marianeigansialves@hotmail.com; dener.acosta@hotmail.com

RESUMO – Os plásticos convencionais, obtidos a partir do petróleo, devido a sua durabilidade e resistência, têm sido, por décadas, usados indiscriminadamente. Estes materiais têm despertado preocupação devido a sua rápida descartabilidade e a lenta degradação, por não reagirem quimicamente com a maioria das substâncias, provocando problemas nos aterros sanitários, dificultando a troca de gases e a decomposição de outros compostos. O Poli-3hidroxibutirato P(3HB), pertencente à família dos polihidroxialcanoatos, é o polímero plástico biodegradável de origem biológica mais estudado. Em cuja síntese utiliza-se variadas fontes renováveis de carbono, sendo a glicose e sacarose as principais. Muitos microrganismos sintetizam P(3HB), mas poucos crescem e acumulam em quantidades viáveis à produção industrial. Neste trabalho avaliou-se o rendimento de massa celular seca (MCS) e de polímero utilizando o microrganismo isolado de solo de clima temperado *B. megaterium* e meio de cultura contendo diferentes concentrações de óleo de arroz emulsionado com Tween80 e Lecitina de soja. Os resultados encontrados no estudo variaram estatisticamente nas análises de MCS pertencem aos meios F4+ Tween80- Lecitina de soja, na concentração de 50g/L em 48h; F4+ Tween80- Lecitina de soja 100g/L em 48h; YM+ Tween80- Lecitina de soja 20g/L, 48h de produção e YM+ Lecitina de soja 100g/L em 48 e 72h e de Rendimento de polímero nos meios F4+ Tween80- Lecitina de soja, na concentração de 20g/L em 48h e F4+ Tween80- Lecitina de soja, nas concentrações de 20g/L e 100g/L, sendo assim, conclui-se que a menor concentração de óleo de arroz é o mais indicado para a produção.

Palavras-chave: Poli(3-hidroxibutirato); Emulsão; Óleo de arroz; Tween80; Lecitina de soja;

1 INTRODUÇÃO

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres biodegradáveis sintetizados por microrganismos e acumulados no citoplasma da célula na forma de grânulos insolúveis em água, a fim de armazenar carbono e energia (FACCIN, et. al, 2013). Podem ser provenientes de fontes naturais renováveis açúcares simples obtidos a partir de fontes complexas como milho, celulose, batata, cana de açúcar, ou serem sintetizados por bactérias a partir de pequenas moléculas como o ácido butírico ou o ácido valérico ou até mesmo serem derivados de fonte animal, como a quitina, a quitosana ou proteínas (Brito, et. al, 2011).

Dentre a família dos PHAs, o poli(3-hidroxi butirato [P(3HB)]) é o mais extensivamente estudado e caracterizado; é um homopolímero de cadeia curta, composto por unidades monoméricas de quatro átomos de carbono (TSUGE, 2002). Com relação a algumas propriedades físicas o P(3HB) pode ser comparado ao polipropileno (PP); é cristalino e apresenta ponto de fusão em torno de 180°C (HOLMES, 1985). Além de ser biocompatível e passível de ser produzido com recursos renováveis de carbono oriundos da produção agrícola ou de resíduos industriais, o que justifica o crescente interesse em relação a sua produção e aplicação (FACCIN, et. al., 2013).

Os fatores que afetam negativamente sua produção incluem baixo crescimento microbiano nos meios de produção, os custos de matérias-primas e de 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 produção os menores possíveis (GOMES; BUENO NETTO, 1997)

Esse trabalho tem por objetivo avaliar o rendimento de massa celular seca e acúmulo de polímero em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de óleo de arroz e emulsionado com os emulgentes Tween80 e Lecitina de soja.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado a linhagem de *Bacillus megaterium* cepa CN3, isolado de solo de clima temperado, na região de Pelotas, RS, 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 produzido através da ressuspensão dessas células em XX mL de meio líquido *Yeast Malt* (YM) (JEANES, 1974) contidos em frascos *Erlenmeyers* aletados de 500mL. As condições de cultivo foram 36°Ce 150rpm durante 24h. Para a fase de produção, utilizou-se os meios mineral F4 (OLIVEIRA, 2010) e YM, adicionados de óleo de arroz nas concentrações de 20, 50 e 100g/L e 2,5% de glicerina, emulsionados por 1,5% de Tween80 e Lecitina de soja na proporção de 37,4:62,6 (%), respectivamente. Adicionou-se 20% do inóculo em frascos *Erlenmeyer* aletados de 500 mL contendo 160 mL de meio de produção emulsionado; incubou-se em agitador incubador orbital a 36°C e 250rpm durante 48 e 72h.

A determinação da massa celular seca (MCS) foi realizada da seguinte forma: xx ml de meio fermentado foram transferidos para tubos *Falcon* e submetidos a uma centrifugação a 10.000 x g por 15min a 4°C. O sobrenadante foi separado e a biomassa ressuspensa em solução salina 0,89% e novamente centrifugada. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células seco 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 obtenção, 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 resultados obtidos para a massa seca celular (MCS) e rendimento na produção de P(3HB) utilizando os meios F4 e YM emulsionados adicionados de diferentes concentrações de óleo de arroz encontram-se na Tab. 1. Tabela 1 - Massa Celular Seca (MCS) e Rendimento de polímero de P(3HB) obtidos a partir de meio emulsionado com adição dos emulgentes Tween80- Lecitina de soja nos tempos de 48h e 72h de produção.

AMOSTRA	MCS (g/L)		RENDIMENTO P(3HB) (%)	
	48h	72h	48h	72h
F4+ Tween80-Lecitina de soja, 20g/L	2,5 ^b ± 1,114	2,9 ^{bc} ± 0,551	34,3 ^a ±4,580	36,3 ^{ab} ±2,722
F4+ Tween80-Lecitina de soja, 50g/L	4,8 ^a ± 0,551	5,4 ^b ± 0,764	26,4 ^b ±2,230	30,8 ^{abc} ±1,563
F4+ Tween80-Lecitina de soja, 100g/L	4,3 ^a ± 0,252	3,7 ^{bc} ± 0,306	24,4 ^{bc} ±1,352	45,3 ^a ±6,553
YM+ Tween80-Lecitina de soja, 20g/L	3,6 ^{ab} ± 0,015	5,4 ^b ± 0,608	16,5 ^c ±1,382	17,1 ^c ±3,291
YM+ Tween80-Lecitina de soja, 50g/L	2,8 ^b ± 0,200	1,6 ^c ± 0,351	24,2 ^{bc} ±6,357	17,8 ^c ±5,943
YM+ Tween80-Lecitina de soja, 100g/L	4,5 ^a ± 0,351	9,6 ^a ± 2,066	25,9 ^b ±2,762	21,8 ^{bc} ±2,795

Legenda: MCS = Massa Celular Seca. Letras sobre escritas iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística pelo Teste de *Tukey* ($p > 0,05$).

Pode-se observar pela Tab. 1 que os melhores resultados para a análise de Massa Seca Celular (MCS) pertencem aos meios F4+ Tween80- Lecitina de soja, na concentração de 50g/L em 48h com 4,8± 0,551; F4+

Tween80- Lecitina de soja 100g/L em 48h com $4,3 \pm 0,252$; YM+ Tween80- Lecitina de soja 20g/L, 48h de produção e YM+ Lecitina de soja 100g/L em 48 e 72h de produção com $4,5 \pm 0,351$ e $9,6 \pm 2,066$ respectivamente. Os demais meios de cultivo e tempos analisados não diferenciaram estatisticamente. Porém, ao avaliar o rendimento de polímero, os melhores resultados encontram-se nos meios F4+ Tween80- Lecitina de soja, na concentração de 20g/L em 48h com $34,3 \pm 4,580$ e F4+ Tween80- Lecitina de soja, nas concentrações de 20g/L e 100g/L com $36,3 \pm 2,722$ e $45,3 \pm 6,553$, respectivamente.

Ao avaliarem diferentes tipos de substratos para a produção de poli(3-hidroxitirato) 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.

A produção de poli (3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato) por *Ralstonia eutropha* utilizando óleos vegetais como suplementos nutricionais, foi avaliada por Soquio, (et. al, 2003). Adicionaram uma concentração equivalente a 0,3g de ácido oléico (L^{-1}) no meio de cultivo utilizando os óleos de oliva, canola, girassol e ácido oléico não suplementado. Obtiveram aumento da concentração de polímero de 10% em meio suplementado quando comparado com o meio de cultivo sem ácido oleico. Os maiores acúmulos de polímero foram obtidos com suplementação com óleo de canola e oliva, pois, possuem as maiores concentrações de ácido oléico na sua composição, já o óleo de girassol que possui uma maior concentração de ácido linoléico não proporcionou um aumento na produção.

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.

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 CONCLUSÃO

Conclui-se que as concentrações com emulsão de óleo de arroz e Tween 80 e Lecitina de soja na produção de P(3HB), a menor concentração de óleo que é de 20g/L é a mais indicada para a utilização deste estudo.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecimento à Universidade Federal de Pelotas, FAPERGS, ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos- PPGCTA e ao Laboratório de Biopolímeros do curso de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico-CDtec

6 REFERÊNCIAS

- BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A.; Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes; **Revista eletrônica de materiais e processos**, v.6.2, pag. 127-139, 2011.
- FACCIN, D. J. L.; RECH, R.; SECCHI, A. R.; CARDOZO, N. S. M.; AYUB, M. A. Z. Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 420-425, 2013.
- 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.
- HOLMES, P. A. Applications of PHB- a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physical Technology**, v. 16, p. 32-36, 1985.
- JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, p. 34-40, 1974.
- MACAGNAN, K.; **Extração e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Ralstonia solanacearium***; Monografia (Conclusão de curso); Biotecnologia; Universidade Federal de Pelotas- UFPel; Centro de Desenvolvimento Tecnológico- CDtec; – 48f. – Pelotas, 2013.
- 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.
- PADILHA, F. F. **Estudo da compartimentalização das enzimas para a produção de biopolímeros por *Beijerinckia sp.* 7070**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia em Alimentos) - Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Pelotas, 1997.
- 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.
- TSUGE, T. Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n.6, p. 579-584, 2002.