

PRODUÇÃO DE P(3HB) POR *Priestia megaterium* A PARTIR DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS

B. V. SCOTTÁ¹, X. R. OYOLA¹, N. S. M. CARDOZO¹, D. J. L. FACCIN¹

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: xilena.rodriguez@ufrgs.br

RESUMO – Com foco na redução do custo de produção do biopolímero Poli(3-hidroxibutirato), P(3HB), por P. megaterium foi avaliado o uso de dois resíduos industriais como substrato para a produção. Os resíduos empregados foram provenientes do efluente de uma indústria de doces e de uma indústria de chocolates. Os cultivos foram realizados em batelada, em estufa incubadora rotatória (30 °C, 180 rpm e de 20 h, 24 h, 28 h e 48 h). Foram avaliadas as quantidades produzidas de P(3HB) e biomassa, além de avaliar a quantidade de açúcares remanescentes no meio e valores de pH. Após a avaliação dos resultados, verificou-se que os substratos meio mineral (controle) e efluente da indústria Florestal produziram as maiores quantidades de P(3HB), sendo o percentual máximo do biopolímero de 42% em 28 h de cultivo no meio mineral e 47% em 20 h de cultivo do efluente. O cultivo a partir do resíduo da indústria de chocolate apresentou a produção máxima de 5%. Verificou-se que todos os substratos avaliados apresentaram produção de P(3HB), sendo potenciais fontes de carbono para redução de custos inerentes ao processo de produção desse biopolímero.

1 INTRODUÇÃO

Os polímeros biodegradáveis ou biopolímeros se apresentam como uma alternativa frente a polímeros de origem petroquímica, principalmente diferenciados no fato de que polímeros de origem petroquímica, em sua maioria, não são facilmente biodegradáveis em condições ambientais e se acumulam no meio ambiente por anos, além de serem formados a partir de uma matéria-prima não renovável. No esforço de reduzir esse significativo impacto ambiental, há um interesse crescente no desenvolvimento de polímeros biodegradáveis produzidos a partir de fontes renováveis, com propriedades semelhantes às dos polímeros derivados do petróleo com possibilidade de substituição destes em algumas aplicações. Os polímeros biodegradáveis podem ser sintéticos ou naturais, obtidos por meio de crescimento de organismos vivos. Com exemplos dos primeiros, tem-se o poli(ácido lático) (PLA), o poli(ácido glicólico) (PGA) e o poli(ácido glicólico-ácido lático) (PGLA). Entre os polímeros biodegradáveis obtidos via cultivo de organismos vivos destacam-se os polihidroxialcanoatos (PHAs), que são poliésteres biodegradáveis e biocompatíveis (Franchetti *et al.*, 2006).

Uma grande desvantagem na produção de PHAs é o custo, sendo a fonte de carbono um fator que torna o processo em larga escala inviável, aliado ao alto custo de recuperação. Portanto, fontes de carbono menos custosas são importantes para viabilizar o processo, tendo em vista essa problemática.

O P(3HB), um dos PHAs que tem recebido maior atenção na literatura e na indústria, é produzido por diversos micro-organismos, dos quais se destacam diversos gêneros bacterianos. *Priestia megaterium* antigamente *Bacillus megaterium* (Gupta *et al.*, 2020) é uma bactéria Gram-positiva que pode produzir P(3HB) a partir de diversas fontes de carbono. Diversos subprodutos agro-industriais como cascas, palhas, melaço, sementes e polpas de diversas frutas (Neetu & Srividya, 2020) tem sido utilizados como matéria prima para a produção de P(3HB) por *P. megaterium*, com base na alta capacidade de metabolizar esta matéria prima e seu baixo custo.

O presente trabalho objetiva avaliar o efluente da indústria de doces Florestal Alimentos (Lajeado, Rio Grande do Sul) e o resíduo da indústria de chocolate Florybal (Gramado, Rio Grande do Sul) como substratos para produção de P(3HB), utilizando a *P. megaterium* como microrganismo produtor. Serão quantificados o polímero produzido, assim como crescimento do micro-organismo, açúcares residuais no meio e valores de pH para verificar o potencial da utilização desse resíduo.

2 METODOLOGIA

2.1 Microrganismo e meio de cultivo mineral

A bactéria *P. megaterium* foi armazenada congelada em solução composta contendo 20% de glicerol. Este microrganismo foi utilizado no presente trabalho para produção de P(3HB) em cultivos em estufa incubadora rotatória. A reativação celular, pré-inóculo foi efetuada em cultivo por 16 h. Nesse estudo foi utilizada a razão carbono:nitrogênio utilizada na literatura (Faccin *et al.*, 2009) para cultivos com sacarose ($16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) com adição de sulfato de amônio ($2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), utilizada aqui como condição de cultivo de referência. O meio mineral (Lee, 1996) foi composto por: KH_2PO_4 , $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; Na_2HPO_4 , $3,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,008 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; ácido cítrico, $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, suplementado com 1 mL de solução de micronutrientes ($\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; H_3BO_4 , $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{NiSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

2.2 Cultivo em diferentes meios

Os experimentos foram realizados em frascos contém 50 mL de meio de cultivo, utilizando alíquotas de inóculo padronizadas, na proporção de 2% em volume de meio de cultivo. Os cultivos de referência foram realizados com $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose, como fonte de carbono, em meio de cultivo mineral. Nos experimentos utilizando como fontes de carbono o efluente da indústria de doces doado pela empresa Florestal Alimentos (Lajeado – RS) e o resíduo doado pela indústria Florybal (Gramado – RS), os cultivos foram preparados a partir do efluente concentrado e pH ajustado para 7, com solução de NaOH. De forma a respeitar a razão C:N empregada no cultivo controle (meio mineral) foi adicionado 1,2 mL de solução sulfato de amônio no caso do efluente da indústria de doces e 2 mL de solução sulfato de amônio no caso do resíduo da Florybal. Os experimentos foram realizados em duplicata em

estufa incubadora rotatoria a 180 rpm e 30 °C por períodos de 20, 24 e 28 horas, porém para o resíduo Florybal também foi avaliado o tempo de 48 h.

2.3 Procedimentos analíticos

A biomassa total foi determinada por meio de medidas gravimétricas, utilizando-se 15 mL de solução do meio de cultivo, centrifugadas a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, posteriormente lavadas com água destilada, secadas até peso constante a 80 °C. O sobrenadante das amostras da quantificação de biomassa por gravimetria foram analisadas em HPLC para quantificar o açúcar remanescente após os diferentes tempos de cultivo. Para a quantificação do P(3HB) foi empregado o método descrito por Riis e Mai (1988) que consiste na quebra do polímero e esterificação dos componentes para quantificação em cromatografia gasosa por meio de propanólise. Para análise em cromatógrafo gasoso (marca Agilent) foi coletada fase orgânica e foram realizadas injeções de 2 µL de cada amostra no cromatógrafo com detector de ionização de chama com coluna Elite-WAX, utilizando N₂ como gás de arraste, na vazão de 2 mL·min⁻¹.

2.4 Análise estatística

Para analisar estatisticamente os resultados, foi utilizado o software Past, utilizando a metodologia de análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey, com grau de confiança de 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Açúcares nos substratos

De acordo aos resultados das análises em HPLC, o conteúdo de açúcares no resíduo Florybal foram de 1,09 g·L⁻¹ de glicose, 0,31 g·L⁻¹ de lactose e 0,99 g·L⁻¹ de frutose, partindo de uma concentração de chocolate de 4,87 g·L⁻¹ no extrato aquoso. No caso do resíduo Florestal as concentrações foram de 5,73 g·L⁻¹ de glicose e 4,13 g·L⁻¹ de frutose. Os valores percentuais em relação a massa de chocolate do resíduo da indústria Florybal são de 22% de glicose, 6% de lactose e 20% de frutose, com os açúcares representando, assim, 49% da massa de resíduo de chocolate.

3.2 Quantificação de sólidos suspensos

A quantidade de sólidos suspensos nos resíduos utilizados foi determinada pela massa de precipitado obtida após centrifugação. As referidas massa foram de 0,0043 ± 0,0001 g no caso do resíduo Florestal e 0,009 ± 0,001 g no caso do resíduo Florybal. Estes valores foram posteriormente subtraídos da massa total de precipitado na etapa de precipitação das amostras pós-cultivo para determinação da biomassa total.

3.3 Açúcares após cultivos

Por meio dos resultados apresentados na Tabela 1, podemos verificar um grande consumo da glicose no resíduo industrial da Florestal. Como a concentração de açúcares em 28 h está próxima a 0, não foi necessário um tempo maior de cultivo. Para o resíduo Florybal a concentração manteve-se praticamente constante, indicando baixo consumo dos açúcares glicose, frutose e lactose. Esse baixo consumo pode ser devido à ausência de suplementação de micronutrientes. Como esse resíduo difere bastante do meio mineral, a razão carbono/nitrogênio escolhida pode não ser a mais adequada para esse cultivo. Nas

primeiras 20 h existe um alto consumo dos açúcares presentes no cultivo de meio mineral, e após esse tempo decorrido não há consumo significativo.

Tabela 1: Concentração ao longo do tempo dos diferentes tipos de açúcares após produção, sendo C0 a concentração inicial do açúcar no substrato. (1) As letras como superíndice junto aos valores de médias indicam grupos no resultado do Teste de Tukey. Assim, diferentes letras em uma mesma linha indicam resultados com diferença significativa (2) Experimento não foi realizado em duplicata (3) No experimento não foi quantificada de forma separada a glicose e frutose, apenas açúcares totais.

Substrato	C0	Açúcar	20 h	24 h	28 h	48 h	
Resíduo Florestal (g·L ⁻¹)	5,8 ^a ± 0,1	Glicose	2,9 ^b ± 0,6	0,54 ^c ± 0,01	0,5 ^c ± 0,3	-	
		Frutose	4,9 ^a ± 0,8	2,7 ^b ± 0,3	1,3 ^b ± 0,3	-	
Permeado de leite com enzima (g·L ⁻¹)	1,1 ^a 2	Lactose	0,5 ^b ± 0,05	0,51 ^b ± 0,01	0,5 ^b ± 0,03	-	
		Galactose	0,75 ^b ± 0,04	0,78 ^b ± 0,04	0,74 ^b ± 0,06	-	
Permeado de leite sem enzima (g·L ⁻¹)	1,1 ^a 2	Lactose	0,87 ^b ± 0,06	0,92 ^b ± 0,01	0,92 ^b ± 0,04	-	
		Galactose	0,6 ^b ± 0,1	0,7 ^b ± 0,01	0,74 ^b ± 0,05	-	
Florybal concentrado (g·L ⁻¹)	8,1 ^a ± 0,3	Glicose	7,7 ^a ± 0,4	5,6 ^a ± 0,4	6 ^a ± 2	5,7 ^a ± 0,5	
		Frutose	6,1 ^{ab} ± 0,5	4,2 ^b ± 0,4	4 ^b ± 2	3,7 ^b ± 0,3	
		Lactose	2,31 ^a ± 0,08	1,8 ^{ab} ± 0,2	1,28 ^{ab} ± 0,08	1,3 ^b ± 0,5	1,455 ^b ± 0,002
Florybal precipitado (g·L ⁻¹)	8,1 ^a ± 0,3	Glicose	7 ^a ± 1	5,6 ^a ± 0,9	6,11 ^a ± 0,04	6,4 ^a ± 0,1	
		Frutose	7,4 ^a ± 0,2	6,3 ^{ab} ± 0,7	4,7 ^b ± 0,7	5,05 ^b ± 0,03	4,8 ^b ± 0,1
		Lactose	2,31 ^a ± 0,08	1,6 ^b ± 0,1	1,2 ^b ± 0,2	1,292 ^b ± 0,005	1,39 ^b ± 0,02
Meio mineral (g·L ⁻¹)	16 3	Glicose	3,2 ^a ± 0,2	2,6 ^a ± 0,3	2,38 ^a ± 0,06	-	
		Frutose	2,5 ^a ± 0,2	2,3 ^a ± 0,3	2,09 ^a ± 0,06	-	

3.4 Crescimento celular

Dentre os substratos avaliados, o cultivo de referência, usando sacarose como fonte de carbono controle em meio mineral, foi a que proporcionou maior quantidade de biomassa obtida após o cultivo. Por meio dos resultados da Tabela 1, os cultivos a partir das fontes de carbono meio mineral e resíduo de chocolate Florybal não apresentaram diferença significativa após as 20 h de cultivo, indicando que este é o tempo adequado de crescimento celular. No caso do efluente Florestal, observa-se diferença significativa entre 20 h e 24 h de cultivo, porém não se observa diferença significativa entre 24 h e 28 h, indicando que o crescimento celular ocorreu nas 24 primeiras horas de cultivo.

3.5 Quantificação de P(3HB)

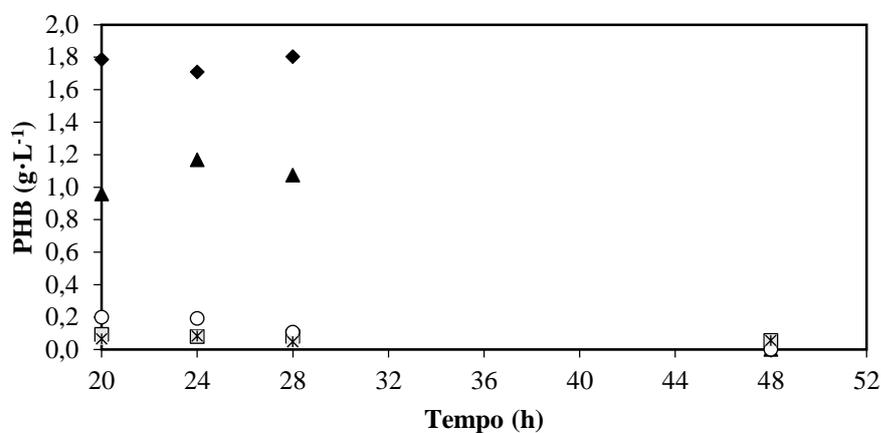
Os valores obtidos para a produção do P(3HB) são apresentados na Tabela 2 em termos do percentual de P(3HB) obtido em cada meio de cultivo, Na Figura 1 são apresentados os dados de concentração do polímero em função do tempo para cada estratégia de cultivo. A quantificação de P(3HB) para o cultivo por resíduo de chocolate Florybal, evidenciou uma

baixa produção do biopolímero, em concordância com o baixo consumo de açúcares discutido anteriormente. Essa limitação na produção de P(3HB) pode ser atribuída à uma falta de suplementos adicionais, podendo ser necessária adição de micronutrientes, e juntamente a baixa capacidade do microrganismo para utilizar sacarídeos mais complexos como a lactose presente no meio.

Tabela 2: Percentual obtido do polímero P(3HB) em cada cultivo. (1) As letras como superíndice junto aos valores de médias indicam grupos no resultado do Teste de Tukey. Assim, diferentes letras em uma mesma linha indicam resultados com diferença significativa.

Fonte de carbono	20 h	24 h	28 h	48 h
Meio mineral (%)	40 ^a ± 7	41 ^a ± 0,4	42 ^a ± 1	-
Chocolate Florybal (%)	5 ^a ± 2	5	4 ^a ± 1	2 ^a ± 2
Chocolate Florybal centrifugado (%)	6	4 ^a ± 2	5 ^a ± 1	3 ^a ± 0,2
Efluente Florestal (%)	47 ^a ± 11	45 ^a ± 1	39 ^a ± 1	-
Permeado com enzima (%)	19 ^a ± 1	18 ^a ± 5	9	-

Figura 1: Concentração obtida do biopolímero P(3HB) produzidos nas biomassas dos diferentes cultivos (♦)Meio mineral (○)Permeado com enzima (*)Florybal concentrado (▲)Efluente Florestal (□)Florybal centrifugado.



Em contrapartida, o efluente da indústria Florestal resultou em uma produção muito próxima ao cultivo de meio mineral ainda que contenha quantidade menor de açúcares e não tenha recebido suplementação, indicando forte potencial de produção do biopolímero P(3HB) por *P. megaterium* a partir desse resíduo. Adicionalmente, o fato de não ter sido suplementado pode proporcionar redução de complexidade do processo, assim como custos.

A Figura 1 também mostra que existe um tempo ótimo de cultivo, visto que em 48 h de cultivo a concentração de P(3HB) é aproximadamente nula, mesmo nos casos do cultivo de referência e do cultivo com efluente Florestal, nos quais se alcançou bom nível de produção de P(3HB) até 28 h. Esse comportamento é provavelmente devido à redução gradual da concentração de micronutrientes e/ou e da razão nitrogênio/carbono, que pode levar a consumo do P(3HB) como fonte de energia para célula (Slepecky e Law, 1961).

4 CONCLUSÃO

Nesse trabalho avaliou-se a possibilidade de produção de P(3HB) e biomassa a partir dos resíduos industriais de chocolate (resíduo Florybal) e de um efluente da indústria de doces (efluente Florestal) como fonte de carbono para a bactéria *P. megaterium*. Com o resíduo Florybal não se obteve consumo significativo de açúcares e, conseqüentemente, produção de P(3HB), provavelmente pela falta de suplementação com micronutrientes ou necessidade de ajuste da razão carbono/nitrogênio. O uso do efluente Florestal como fonte de carbono possibilitou consumo significativo de açúcares e produção de P(3HB) por *P. megaterium* mesmo sem suplementação de macro ou micronutrientes. Apesar de que a produção de P(3HB) com este efluente foi menor do que a obtida com cultivo de referência (sacarose em meio mineral), os resultados obtidos indicam grande potencial de utilização desse resíduo como substrato para redução de custos de produção de P(3HB), podendo contribuir para a substituição parcial de polímeros petroquímicos por polímeros biodegradáveis.

5 REFERÊNCIAS

D.J.L. FACCIN, I. MARTINS, N.S.M. CARDOZO, R. RECH, M.A.Z. AYUB, T.L.M. ALVES, et al. Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. *J Chem Technol Biotechnol*, volume. 84, p. 1756-1761, 2009.

FRANCHETTI, SANDRA MARA MARTINS; MARCONATO, JOSÉ CARLOS. Polímeros biodegradáveis - uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. *Química Nova*, volume. 29, n. 4, p. 811–816, 2006.

GUPTA, R. S.; PATEL, S.; SAINI, N.; et al. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, volume. 70, n. 11, p. 5753–5798, 2020.

LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, volume. 49, n. 1, p. 1–14, 1996.

NEETU ISRANI, SRIVIDYA SHIVAKUMAR. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from directly valorized ragi husk and sesame oil cake by *Bacillus megaterium* strain Ti3: Statistical optimization and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, volume 148, p. 20-30, 2020.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography A*, volume. 445, p. 285-289, 1988.