

XII-042 - APROVEITAMENTO DA BIOMASSA DE MICROALGAS E GLICEROL PARA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO

Bruna Martini Zacarias da Silva ⁽¹⁾

Graduanda no curso de Química Industrial na Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC. Bolsista PUIC.

Rosana de Cassia de Souza Schneider

Professora do Departamento de Química e Física e do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental da UNISC, Química pela UNISC; Mestre em Química Analítica pela UFSM; Doutora em Química- Química Ambiental pela UFRGS.

Valeriano Antonio Corbellini

Professor do Departamento de Química e Física e do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental da UNISC, Química pela UFRGS; Mestre em Química pela UFRGS; Doutora em Química- Síntese Orgânica pela UFRGS.

Maria Viviane Gomes Muller

Professora do Departamento de Biologia e Farmácia e do programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da UNISC; Bióloga pela UFRGS. Mestre em Microbiologia Ambiental pela UFRGS; Doutora em Bioquímica pela UFRGS;

Endereço ⁽¹⁾: Av. Independência, 2293, Bairro: Universitário - Santa Cruz do Sul - RS - CEP: 96815-900 – Brasil - Fone: (51) 3717-7300 - Fax: (51) 3717-1855 – e-mail: bruna_mzs@outlook.com

RESUMO

O desenvolvimento de polímeros biodegradáveis é a cada dia mais necessário em razão da dificuldade de degradação e a exaustão das reservas mundiais de petróleo para produção dos plásticos convencionais. Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres de vários ácidos hidrocarboxílicos, acumulados como fonte de carbono e energia por vários micro-organismos. O PHAs mais estudado como substituto aos plásticos convencionais é o biopolímero poli-3-hidroxibutirato, P(3HB). A produção em grande escala desse polímero é limitada, principalmente, devido aos custos inerentes ao processo de produção, como por exemplo, a fonte de carbono utilizada nos meios de cultivo. O uso de hidrolisado de microalgas excedente da produção de biodiesel pode ser promissor para o desenvolvimento de bioprodutos como os biopolímeros. O objetivo deste trabalho dirige-se à prospecção de isolados bacterianos e otimização dos processos tecnológicos para aumentar a produção de polihidroxialcanoatos (PHA) por bactérias, empregando hidrolisado algáceo como fonte de carbono.

PALAVRAS-CHAVE: Biopolímero, Poli-3-hidroxibutirato, hidrolisado, microalgas.

INTRODUÇÃO

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres de vários ácidos hidrocarboxílicos, os quais são acumulados em inclusões insolúveis no citoplasma microbiano, chegando a representar cerca de 90% do peso seco. Estas inclusões servem como fonte de carbono e energia para o microrganismos produtores, sendo produzidas usualmente em condições de limitação de um nutriente essencial, tal como N, P, S ou Mg, e na presença de excesso de fonte de carbono (Madison e Huisman, 1999).

Nos últimos anos estes polímeros têm despertado grande interesse industrial e ambiental por serem termoplásticos ou elastômeros termoplásticos biodegradáveis. Atualmente são reconhecidos mais de 150 hidroxialcanoatos diferentes como constituintes de PHA bacterianos. O domínio sobre o processo de síntese pode permitir a produção de PHA sob medida para as aplicações que se desejar (Steinbüchel e Valentin, 1995; Silva *et al.*, 2007).

Entre os PHAs mais estudados encontram-se o poli-3-hidroxibutirato (PHB), homopolímero que apresenta propriedades termoplásticas semelhantes aos plásticos de origem petroquímica, e o poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV), o qual apresenta também maior elasticidade, em virtude da incorporação de unidades de 3-hidroxivalerato em sua molécula, tornando-o mais interessante comercialmente (Salehizadeh e Van Loosdrecht, 2004; Ceyhan e Ozdemir, 2011).

Até o momento já foram identificadas mais de 300 microrganismos capazes de sintetizar PHAs, mas somente uma pequena parte é empregada para a produção e desenvolvimento de processos, incluindo *Ralstonia sp.*, *Azotobacter vinelandii*, *Alcaligenes latus*, *Cupriavidus necator*, vários isolados metilotróficos e as versões recombinantes de *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* (Choi e Lee, 1999; Rawte e Mavinkurve, 2002). De acordo com as condições de crescimento e estratégias de fermentação, as bactérias podem acumular altos valores de PHA (próximos a 90%) de sua massa celular seca (Khanna e Srivastava, 2005).

A maior parte dos microrganismos sintetiza o P(3HB) tendo uma molécula de acetil-COA como precursora. Em cultivo balanceado o acetil-COA entra no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) para geração de energia e material celular. Entretanto, quando o cultivo ocorre em condições de excesso de fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial, o acetil-COA é convertido em PHB por uma sequência de três reações catalisadas pelas enzimas cetotiolase, acetil-COA redutase e PHA sintase (Oeding e Schlegel, 1973; Byrom, 1987; Kunasundari e Sudesh, 2011).

Após o cultivo e na sequência para produção de bioplástico bacteriano é fundamental que o processo de extração e purificação seja de baixo custo, uma vez que essa etapa representa 50% ou mais do custo total do produto. Vários métodos de extração foram propostos para a recuperação de PHAs, como extração do polímero por solventes como clorofórmio, por digestão com hipoclorito de sódio, surfactante e quelante, enzimas e rompimento mecânico (Lee, 1996; Jacquelin *et al.*, 2008; Crochemore *et al.*, 2012).

Dentre as técnicas espectroscópicas de identificação e caracterização de polímeros podemos citar a espectrometria de massas, espectrometria de ressonância magnética, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e raios-X.

A literatura apresenta que a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) é hoje um dos métodos mais rápidos para triagem, detecção e caracterização dos grupamentos funcionais de PHA intracelular ou purificado de microrganismos (Ramalingam *et al.*, 2011).

Apesar do PHB já ser produzido em nível industrial o seu custo de produção é ainda muito elevado quando comparado aos plásticos de origem petroquímica. De acordo com Choi e Lee (1999) a fonte de carbono utilizada para geração de biomassa microbiana pode representar mais de 38% do custo global.

De acordo com dados da literatura pertinente a produção de P(3HB) qualquer estratégia para reduzir custos na produção terão que passar indubitavelmente pela triagem de um bom microrganismo produtor, seleção de substratos adequados e de baixo custo e estudo de parâmetros do processo fermentativo que permitam explorar ao máximo o potencial dos microrganismos produtores para aumentar assim a produtividade do biopolímero (Khanna e Srivastava, 2005).

O emprego de rejeitos agroindustriais de baixo custo, com alto teor lignocelulósico na produção de biomassa microbiana pode ser uma alternativa econômica e socialmente viável para produção de P(3HB) (Salehizadeh e Van Loosdrecht, 2004; Ceyhan e Ozdemir, 2011).

Neste viés podemos destacar as microalgas, que representam um grupo de microrganismos extremamente diverso, altamente especializado e de ampla distribuição biogeográfica, com capacidade de sequestrar CO₂ pré-existente através de sua atividade fotossintética e acumular biomassa rápida e eficientemente quando comparada às plantas terrestres (Pienkos e Darzins, 2009).

Em comparação às plantas oleaginosas, as microalgas apresentam maior eficiência em produtividade lipídica podendo alcançar até 80% do peso seco em óleo, reproduzem-se rapidamente e durante todo o ano, requerem menor área de cultivo, além de utilizarem áreas não agriculturáveis, requerem menos água, podem ser cultivadas em água não potável, além de serem CO₂ neutras e sequestrarem CO₂ pré-existente (Singh e Gu, 2010).

Podemos ainda destacar as microalgas como possibilidade versátil na geração de biocombustíveis de terceira geração, o que as torna capazes de gerar além de biodiesel, etanol, bioquerosene, bioplásticos, biohidrogênio, biogás e intermediários químicos para o setor petroquímico (Singh e Gu, 2010).

De acordo com dados da literatura pertinente a produção de P(3HB), por fermentação em fase líquida, a utilização de biomassa a partir de rejeitos agroindustriais de baixo custo, com alto teor lignocelulósico pode ser uma alternativa econômica e socialmente viável. Desde modo o objetivo do presente projeto foi desenvolver alternativas tecnológicas para a produção de poli (3-hidroxibutirato) P(3HB), através da fermentação no estado líquido empregando subprodutos da biomassa algácea como meio de cultivo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento de microrganismos

Bactérias de interesse previamente isoladas e armazenadas na coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia Clínica e Microbiologia Industrial da UNISC foram submetidas à avaliação prévia quanto à produção efetiva de P(3HB) em fermentação no estado líquido.

As bactérias selecionadas para esta pesquisa foram identificadas pelas características tintoriais como pertencentes ao gênero *Bacillus* e denominadas E10, E5, E12, E24, e E25.

Produção do hidrolisado das microalgas

Hidrólise do resíduo

Partindo-se da metodologia proposta e Law *et al.* (2003), com modificações a produção de hidrolisado algácea foi realizada pelo ataque ácido em autoclave a 121 °C. A concentração de ácido foi de 1 a 3% e o tempo de hidrólise foi de até 1h. Após a hidrólise o líquido obtido foi neutralizado e utilizado como fonte de carbono para o meio de cultura.

Preparo do inóculo e produção de P(3HB)

Para os ensaios de produção de P(3HB), foram utilizadas duas pré-culturas, uma seguida da outra: os isolados foram cultivados primeiramente nas condições descritas na pré-fermentação por 24 horas. Em seguida, 10% (v/v) do pré-inóculo foi transferido para 130 mL de meio agora com limitação de nutriente e 10 mL de hidrolisado algácea, e cultivados por 72h.

PRÉ-FERMENTAÇÃO:

As bactérias testadas foram Inoculadas em erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de BHI composto por (em g L⁻¹): Infuso cérebro-coração 17,5 g L⁻¹, Peptona 10,0 g L⁻¹, Dextrose 2,0 g L⁻¹, Cloreto de sódio 5,0 g L⁻¹, Fosfato dissódico 2,5 g L⁻¹, Água Destilada q.s.p. e pH final 7,4 ± 0,2, homogeneizadas e incubadas em shaker a 150 rpm, a 30 °C por 18-24 hs. Após esse período foi realizada leitura no espectrofotômetro (500 µL-600 nm).

Os fermentados com as células dos microrganismos foram centrifugados a 4000 rpm, lavados com H₂O estéril e centrifugados novamente por duas vezes. O sobrenadante foi descartado e aos precipitados adicionado 100 mL de Meio Mínimo ou basal composto por (em g L⁻¹): KH₂PO₄ 0,16; K₂HPO₄ 0,64; MgSO₄.7H₂O 0,4; NaCl 0,2; CaSO₄.2H₂O 0,05; FeSO₄.7H₂O 0,0025 e Na₂MoO₄.2H₂O 0,001. O pH foi de 6,8 – 7,0.

A padronização da concentração do inóculo foi realizada comparando a turbidez com o padrão 0,5 da escala de MacFarland em espectrofotômetro. Essa turvação é semelhante à padronizada para o antibiograma e o resultado da absorbância deve estar entre 0,08 e 0,10, o que equivale a 1,5 x 10⁸ UFC mL⁻¹ (UNITED STATES PHARMACOPEIAL, 1990 ; NCCLS, 2002).

FERMENTAÇÃO:

Foram testados dois meios para fermentação (FERMENTADO 1 E 2).

No fermentação 1 as bactérias padronizadas foram inoculadas em erlemeyers de 250 mL contendo 130 mL de meio mínimo, 10 mL de inóculo padronizado, 300µL de elementos traço, 10 mL de hidrolisado algácea e 700 µL de glicerol.

A solução de elementos traço deverá apresentar em sua composição (em g L⁻¹): H₃BO₃ 0,3; CoCl₂.6H₂O 0,2; ZnSO₄.7H₂O 0,1; MnCl₂.4H₂O 0,03; Na₂MoO₄.2H₂O 0,03; NiCl₂.6H₂O 0,02; e CuSO₄.5H₂O 0,01.

Na fermentação 2 foram mantidas as mesmas condições subtraindo-se o hidrolisado algácea.

Todos os testes foram realizados em duplicata. O controle positivo constou de cada isolado crescido somente em meio mínimo, nas condições e tempos já descritos. Os erlenmeyers foram mantidos em incubador agitador orbital a 30 °C, 150 rpm por um período de 72 horas.

A cada 24 horas alíquotas do fermentado foram coletadas para determinação da biomassa (espectrofotômetro-600 nm); contagem de UFCs; avaliação do parâmetro pH; coloração de Sudan Black; comprovação do P(3HB) no infravermelho (FT-IR/FT-NIR) com posterior análise multivariada dos espectros (Perkin Elmer, Spectrum 400 series).

RESULTADOS

A via bioquímica de produção de PHAs por microrganismos depende das condições de cultivo e dos substratos e suplementos fornecidos. Grande parte dos microrganismos, dentre eles os *Bacillus*, necessitam de limitação de algum nutriente essencial assim como excesso de carbono no meio em que se desenvolvem, para que, então, haja regulação de seu metabolismo e inicie o processo de absorção de carbono e acúmulo do mesmo em forma de grânulos como reserva de energia (Luengo *et al.*, 2003).

Como fonte de carbono para os microrganismos, foi utilizado neste trabalho o glicerol e resíduo algáceo obtido do material coletado da estação de tratamento da UNISC.

A biomassa produzida pelas bactérias foi submetida aos ensaios espectrofotométricos, de microcultivo, de coloração de Sudan Black e espectroscopia no infravermelho (FT-IR/FT-NIR).

Os resultados a partir dos ensaios espectrofotométricos (Tabela 1), microcultivo e coloração de Sudan Black (Figura 1), mostraram que a bactéria E10, quando cultivada à 30° C apresentou os melhores resultados para produção de biomassa no período entre 24 até 48 horas, tendo neste período maior produção de PHA usando como fonte de carbono o hidrolisado algáceo e glicerol. Transcorrido este tempo observa-se diminuição na densidade óptica e produção de biopolímero.

Tabela 1: Densidade Óptica (D.O.) da cultura da bactéria E10 (600nm), nos diferentes tempos, utilizando glicerol e hidrolisado algáceo como fonte de carbono.

| Parâmetro | Tempo (h) | | | |
|---|-----------|--------|--------|-------|
| | 0 | 24 | 48 | 72 |
| Leitura espectrofotômetro | 0,142 | 0,2715 | 0,4035 | 0,238 |
| Crescimento (10 ⁶ UFC mL ⁻¹) | 2,8 | 8,2 | 9,6 | 5,8 |

A figura 1 mostra a bactéria E10, após coloração de Sudan Black, crescida em meio de cultivo usando hidrolisado algáceo e glicerol como fonte de carbono. Os pontos negros azulados apontados pela seta indicam a presença de PHAs. A bactéria quando submetida às mesmas condições de cultivo, subtraindo o hidrolisado algáceo da composição do meio não apresentou produção de PHAs (Figura 2). Este resultado mostra que o hidrolisado algáceo é uma alternativa potencial e de baixo custo como fonte de carbono na produção de PHAs.

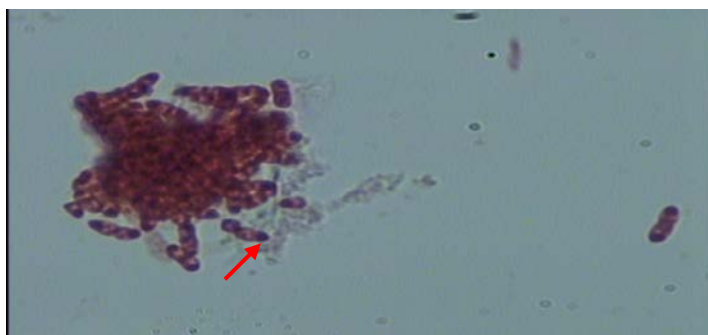


Figura 1: Coloração de Sudan Black da Bactéria E10 (1000x): 48 horas de fermentação usando hidrolisado algáceo e glicerol como fonte de carbono. A seta indica inclusão lipídica sugestiva de PHA.



Figura 2: Coloração de Sudan Black da Bactéria E10 (1000x): 48 horas de fermentação usando somente glicerol como fonte de carbono. A seta indica ausência de inclusão lipídica sugestiva de PHA.

Nossos resultados colorimétricos reportam ao trabalho de Lelliot e Stead (1987) que avaliaram a presença de corpos lipofílicos no citoplasma bacteriano através do teste de Sudan Black. O corante de Sudan Black é ligeiramente solúvel em solvente orgânico e insolúvel em água; ao ligar-se a estruturas hidrofóbicas confere coloração negra azulada, visível em microscópio óptico. A bactéria E10 apresentou no citoplasma pontos polares negros azulados, característicos de PHAs.

A presença de inclusões polares na bactéria E10 sugestiva de (PHAs) observadas através da coloração de Sudan Black foi confirmada pelos resultados da Espectroscopia no Infravermelho. Nos espectros da figura 3 podemos observar o acúmulo de polímero.

O pico presente na região do infravermelho na faixa de 1700 cm^{-1} é devido à presença do grupo carbonila na estrutura do P(3HB), indicando a presença da ligação $\text{C}=\text{O}$ do éster, deformação axial assimétrica e simétrica da ligação $\text{C}-\text{H}$ no grupo metil em 2975 e 2874 cm^{-1} ; deformação assimétrica da ligação $\text{C}-\text{H}$ no grupo metileno em 2933 cm^{-1} ; deformação angular assimétrica e simétrica da Ligação $\text{C}-\text{H}$ no grupo metil em 1453 e 1379 cm^{-1} ; deformação axial da ligação $\text{C}-\text{O}$ no grupo éster em 1221 cm^{-1} , de acordo com o reportado na literatura

No meio de cultivo onde a fonte de carbono foi exclusivamente o glicerol, não foi possível detectar a presença de corpos lipofílicos (figura 2) nem observar os picos na região do espectro do P(3HB) (Figura 4), indicando assim o hidrolisado algáceo como alternativa potencial e de baixo custo como fonte de carbono.

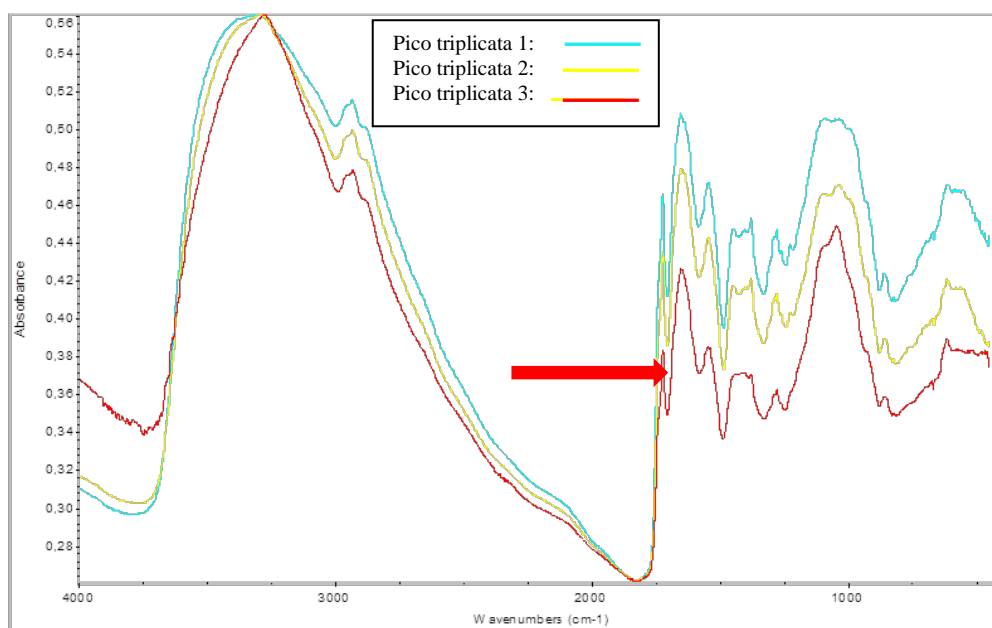


Figura 3: Espectro de Infravermelho da bactéria E10 (triplicata – linhas coloridas) indicando a presença de pico semelhante aos apresentados no espectro padrão de PHB. Cultivo em meio mínimo suplementado com glicerol e hidrolisado algáceo como fonte de carbono. 48 horas de cultivo. Janela espectral de 400 a 4000 cm^{-1} .

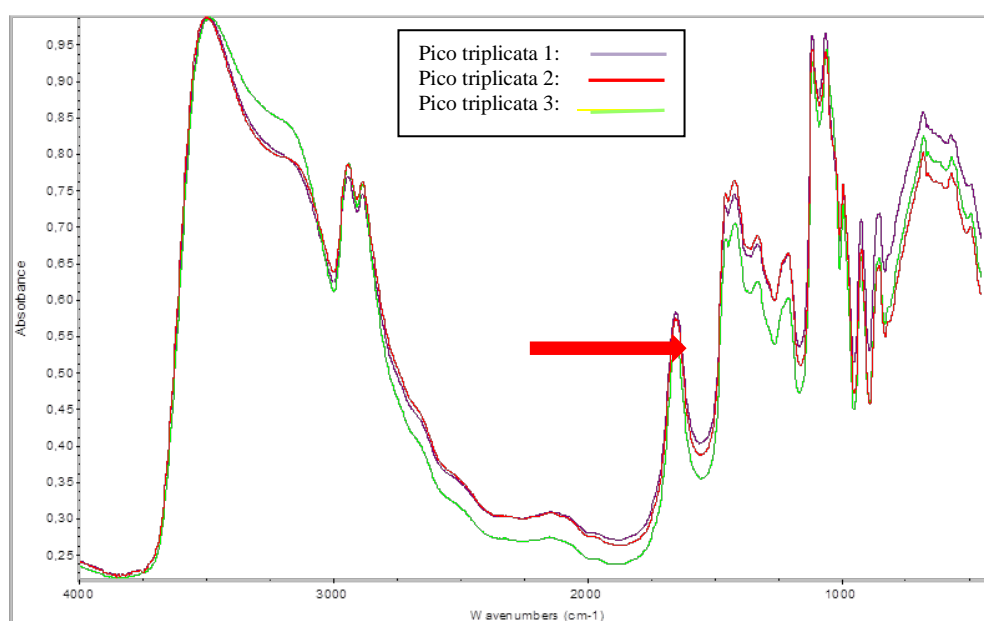


Figura 4: Espectro de Infravermelho da bactéria E10 (triplicata – linhas coloridas) indicando ausência do pico (seta vermelha) semelhante aos apresentados no espectro padrão de PHB. Cultivo em meio mínimo suplementado somente com glicerol como fonte de carbono. 48 horas de cultivo. Janela espectral de 400 a 4000 cm^{-1} .

CONCLUSÕES

1. O hidrolisado algáceo apresentou teores de açúcares redutores, podendo ser metabolizado como substrato carbônico adequado à produção de PHAs.
2. A bactéria E10 apresentou o melhor resultado produzindo P(3HB) quando cultivada em meio com hidrolisado algáceo.
3. A análise por espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier mostrou bandas características da presença de P(3HB), confirmando que o polímero visualizado na coloração de Sudan Black é de P(3HB).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends in Biotechnology*, v. 5, n. 9, p. 246-250, 1987.
- 2 CEYHAN, N., OZDEMIR, G. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production from domestic wastewater using *Enterobacter aerogenes* 12 Bi strain. *African Journal of Microbiology Research*, v. 5, n. 6, p. 12, 2011.
- 3 CHOI, J., LEE, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 51, n. 1, p. 13-21, 1999.
- 4 CROCHEMORE, A. G., MATTOS, M. L. T., VENDRUSCOLO, C. T., CASTRO, L. A. S., MOREIRA, A. S. Identification of pesticide-degrading *Pseudomonas* strains as poly- β -hydroxybutyrate producers. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 85, p. 5, 2012.
- 5 JACQUEL, N., LO, C.-W., WEI, Y.-H., WU, H.-S., WANG, S. S. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, n. 1, p. 15-27, 2008.
- 6 KHANNA, S., SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 2, p. 607-619, 2005.
- 7 KUNASUNDARI, B., SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters*, v. 5, n. 7, p. 14, 2011.
- 8 LAW, K. H., CHENG, Y. C., LEUNG, Y. C., LO, W. H., CHUA, H., YU, H. F. Construction of recombinant *Bacillus subtilis* strains for polyhydroxyalkanoates synthesis. *Biochemical Engineering Journal*, v. 16, n. 2, p. 203-208, 2003.
- 9 LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, v. 14, n. 11, p. 431-438, 1996.
- 10 LUENGO, J. M., GARCÍA, B., SANDOVAL, A., NAHARRO, G., OLIVERA, E. A. R. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, n. 3, p. 251-260, 2003.
- 11 MADISON, L. L., HUISMAN, G. W. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 63, n. 1, p. 21-53, 1999.
- 12 OEDING, V., SCHLEGEL, H. G. β -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. *Biochemical Journal*, v. 134, n. 1, p. 239-248, 1973.
- 13 PIENKOS, P. T., DARZINS, A. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 3, n. 4, p. 431-440, 2009.
- 14 RAMALINGAM, S., VIKRAM, M., SIVASANKARI, V. B. Flux balance analysis for maximizing polyhydroxyalkanoates production in *Pseudomonas putida*. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 4, 2011.
- 15 RAWTE, T., MAVINKURVE, S. A rapid hypochlorite method for the extraction of polyhydroxy alkanates from bacterial cells. *Indian J. Exper. Biol.*, v. 40, p. 1, 2002.
- 16 SALEHIZADEH, H., VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*, v. 22, n. 3, p. 261-279, 2004.
- 17 SILVA, L. F. D., GOMEZ, J. G. C., ROCHA, R. C. S., TACIRO, M. K., PRADELLA, J. G. D. C. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Química Nova*, v. 30, p. 1732-1743, 2007.
- 18 SINGH, J., GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 9, p. 2596-2610, 2010.
- 19 STEINBÜCHEL, A., VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, v. 128, n. 3, p. 219-228, 1995.