

PRODUÇÃO DE UM BIOPOLÍMERO EM LARGA ESCALA UTILIZANDO BIORREATOR

LARGE SCALE PRODUCTION OF A BIOPOLYMER USING A BIOREACTOR

Alice Sales Pinheiro

Aluna de Graduação de Engenharia Química 6º período
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Período PIBIC: novembro de 2021 a julho de 2022
alicesalespinheiro1@gmail.com

Cláudia Duarte da Cunha

Orientadora, Engenharia Química, D.Sc.
ccunha@cetem.gov.br

Diogo Simas Bernardes Dias

Coorientador, Engenharia Química, D.Sc.
diogosimasbd@gmail.com

RESUMO

Os biopolímeros são polissacarídeos de origem microbiana, conhecidos como exopolissacarídeos (EPS) ou gomas, que tem a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso. Por conta da vasta aplicação biotecnológica do EPS, atualmente é possível visualizar um grande interesse na sua produção e aplicação em diversos processos industriais, como a biofloculação, biorremediação, bioflotação e biossorção. Por conseguinte, no presente trabalho, foi utilizada a bactéria *Paenibacillus polymyxa* –reconhecida na literatura como produtora de EPS – isolada a partir de rizosfera de trigo, em trabalhos anteriores. Nesse estudo, buscou-se ativar a estirpe da bactéria em meio específico, visando uma produção em escala ampliada (*scale up*), utilizando um biorreator de 14L, a partir de insumos de baixo custo. Como resultado preliminar, foi obtido um bom rendimento do EPS, em cerca de 80g/L. Testes utilizando o biorreator Bioflo®320 seguem em andamento, com ajuste das condições operacionais.

Palavras-chave: Substâncias poliméricas extracelulares (EPS), *paenibacillus polymyxa*, biorreator.

ABSTRACT

Biopolymers are polysaccharides of microbial origin, known as exopolysaccharides (EPS) or gums, which have the ability to form gels and viscous solutions in an aqueous medium. Due to the vast biotechnological application of EPS, it is currently possible to visualize a great interest in its production and application in several industrial processes, such as bioflocculation, bioremediation, bioflotation and biosorption. Therefore, in the present work, the bacterium *Paenibacillus polymyxa*, recognized in the literature as an EPS producer –, isolated from wheat rhizosphere in previous works was used. In this study, we activated the strain of the bacteria in a specific medium, aiming at a scale up, using a 14L bioreactor with low-cost inputs. As a preliminary result, a good yield of EPS was obtained, around 80g/L. Tests using the Bioflo®320 bioreactor are still in progress, with adjustment of operational conditions.

Keywords: Extracellular polymeric substances (EPS), *paenibacillus polymyxa*, bioreactor.

1. INTRODUÇÃO

As Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPS) são polissacarídeos de origem microbiana, também conhecidos como: biopolímeros, exopolissacarídeos ou gomas, e tem a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso. Eles são uma complexa mistura de polímeros que consistem em polissacarídeos, proteínas, ácidos húmicos, ácidos urônicos, ácidos nucleicos, lipídeos e outros, com grupos funcionais ionizáveis, como carboxílico, fosfórico, amino e hidroxílico. A proporção de cada componente da mistura influencia diretamente nas suas características, e conseqüentemente em sua aplicação biotecnológica, seja para biossorção, biodegração, biofloculação ou bioflotação. Assim, elas podem ser usadas como uma alternativa a processos agressivos ao meio ambiente, bem como diminuir o impacto dos processos industriais já existentes (SHI et al., 2017).

Devido à presença de grupos funcionais ionizáveis dos EPS microbianos, podem ocorrer ligações entre diferentes metais, contribuindo na adsorção a estes elementos (BHASKAR; BHOSLE, 2006; GUINÉ et al., 2007; JOHNSON et al., 2006; LAMELAS et al., 2006). Sendo assim, poderia haver um impacto sobre a mobilidade dos íons metálicos em muitos sistemas: água-rocha, solo, ou cadeia alimentar marinha, contribuindo para recuperação desses ecossistemas ou mesmo para a obtenção de metais de interesse. Os biopolímeros não só possibilitam a diminuição da toxidez do metal pela adsorção, como podem ser utilizados na recuperação deste mesmo metal em solução aquosa (FEIN, 2006).

As vantagens desta tecnologia incluem a disponibilidade de baixo custo da biomassa e muitas vezes do desenvolvimento de técnicas para a sua imobilização. Adicionalmente, devido a diferentes mudanças ambientais, ocorre uma pressão em especial contra produtos sintéticos, petroquímicos e derivados, enquanto fatores econômicos funcionam contra as opções das tecnologias ambientalmente aceitáveis (VERBEEK, 2017). Um micro-organismo produtor de EPS é o *Paenibacillus polymyxa*, ranqueado pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos como um dos mais aplicados no comércio mundial (RAFIGH et al., 2014). Assim, com a finalidade de se manter competitiva, a produção das EPS por essa bactéria se dá pela necessidade de melhorar seus atrativos econômicos, principalmente em termos de aumento de produtividade e minimização dos custos de produção.

Desta forma, o presente trabalho buscou estimular a bactéria *Paenibacillus polymyxa* a produzir EPS em escala de bancada, iniciando também ensaios para ampliação de escala (*scale up*) utilizando o fermentador Eppendorf Bioflo®320, que é um equipamento que permite controlar melhor as variáveis como por exemplo oxigênio dissolvido (OD), pH, temperatura e agitação.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo a manutenção e ativação da estirpe de *Paenibacillus polymyxa*, para aplicação em ensaios de escalonamento da produção de biopolímero (substâncias poliméricas extracelulares – EPS), utilizando um biorreator Eppendorf Bioflo®320.

Sendo os objetivos específicos:

- Testar diferentes meios de cultivo, buscando diminuir os custos de produção;
- Maximizar os rendimentos em ensaios em escala ampliada (biorreator);

3. METODOLOGIA

3.1. Manutenções do Micro-organismo

A linhagem bacteriana de *Paenibacillus* sp. existente na coleção de culturas do LABIOTEC/SEMEB, com potencial de aplicação nos estudos de produção de EPS, vem sendo mantida através de repiques periódicos em meio Agar batata dextrose (sigma) e refrigerada a 4°C. A linhagem bacteriana também foi cultivada em placa contendo sacarose e extrato de

levedura, incubadas por um período de 48 horas em estufa à 30°C. Após a incubação, o material foi retirado de forma asséptica e transferido para microtubos Eppendorf contendo solução 20% de glicerol em água destilada. O material foi mantido nesta solução, sob refrigeração à -22°C.

3.2. Produção de Biopolímero – EPS

A metodologia utilizada foi adaptada à descrita por Martins e colaboradores (2008), sendo utilizado um meio contendo 20g de sacarose, 5g de extrato de levedura. Após incubação por 24h à 30 °C, sob agitação, o cultivo foi fervido durante 15 minutos buscando liberar a EPS que estava na superfície celular. Em seguida o material foi levado a centrífuga a 4.000rpm, com o intuito de remover a fração celular. O sobrenadante foi adicionado a um erlenmeyer com etanol na proporção de 3:1 (etanol:sobrenadante) de forma a precipitar a EPS. Essa mistura foi então armazenada por refrigeração a 4°C pelo período de 24 horas, e posteriormente foi novamente centrifugada a 4.000rpm, onde foi recuperado o EPS. Após tais processos, foi realizada a secagem do EPS à 60°C, até atingir peso constante (TAKETANI, 2016).

3.3. Testes em Fermentador

Foi realizada a produção em fermentador EppendorfBioflo®320 com capacidade para 14 L, mostrado na Figura 1, visando o controle de variáveis bem como ajustes operacionais. O meio de cultivo utilizado continha as seguintes especificações (g/L): sacarose (20), extrato de levedura (5).



Figura 1: (A) Meio de preparo do inculo / (B) fermentador com meio de produção e o inóculo / (C) fermentador com mosto fermentado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Manutenções do Micro-organismo

A seguir, na Figura 2, são apresentadas imagens das placas de petri, contendo o crescimento da bactéria *Paenibacillus polymyxa* pela técnica de semeadura por esgotamento, após o período de 48h, demonstrando que sua ativação ocorreu de forma positiva.



Figura 2: Crescimento de *Paenibacillus polymyxa*.

Após o cultivo e o crescimento, uma pequena quantidade do material foi retirada e adicionada aos tubos de Eppendorf para estocagem, aguardando o início dos ensaios de produção.

4.2. Produção de Biopolímero – EPS

Após o crescimento por 20h em meio líquido, aquecimento e centrifugação, a EPS foi precipitada a frio com etanol PA. A Figura 3 (A) mostra a EPS já liberada e no erlenmeyer para precipitação com o etanol. Com a adição do etanol é possível notar que a precipitação ocorre quase que instantaneamente e a quantidade parece aumentar conforme a sua proporção (3:1). As Figuras 3 (B) e (C) mostram, respectivamente, a precipitação da EPS logo após a adição do etanol, e após as duas centrifugações, para a recuperação e secagem do polímero produzido.

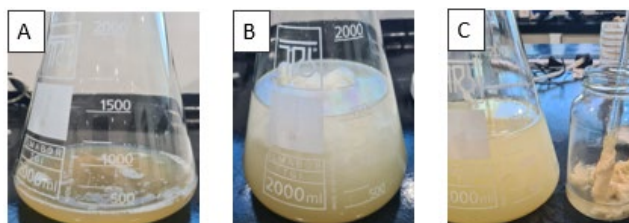


Figura 3: (A) EPS solúvel retirada após à centrifugação / (B) precipitação de EPS com etanol à frio e (C) o polímero produzido.

Por último, foi feita a secagem da EPS bruta à 60°C na estufa, até peso constante (Figura 4). Como resultado, a produção primária de EPS se aproximou de 128 g/L em ensaios de bancada, valores esses que estão acima da grande maioria citada na literatura (LIANG; WANG, 2015). Dependendo da espécie e das condições de cultivo, a produção de EPS varia significativamente. Por exemplo, Liang e Wang (2015) obtiveram valores de produção de EPS por *Paenibacillus* spp. na faixa de 3,44 a 41,24 g/L, com diferentes fontes de carbono e condições, além de tempos superiores a 2,5 dias. Os maiores valores de goma curdlana obtidos na literatura ficaram em torno de 63 g/L, e para a goma levana, valores próximos a 100g/L.



Figura 4: EPS após secagem em estufa.

De acordo com as curvas de crescimento realizadas anteriormente a este estudo, a produção em frascos agitados utilizando o tempo do pré-inóculo de 20 horas, bem como ajustando o tempo de produção para 28 horas, em meio contendo 200 g/L de sacarose e 10 g/L de extrato de levedura, tornou o processo ainda mais econômico. Os ensaios em biorreator ainda se encontram em fase de ajuste das condições operacionais

5. CONCLUSÕES

Como conclusão, os estudos realizados demonstraram que a manutenção e ativação da estirpe de *Paenibacillus polymyxa* ocorreu de forma eficiente e satisfatória. O rendimento obtido em frascos erlenmeyer foi de cerca de 80g/L, valor esse superior ao encontrado na literatura. Atualmente estão sendo realizados ensaios no biorreator Eppendorf Bioflo®320 onde é esperado um melhor controle das variáveis de processo, em especial o oxigênio dissolvido, seja pela adição de ar ao fermentador, ou aumento da agitação (esse limitado pelo cisalhamento das células), favorecendo o aumento da eficiência do processo, para atingir os valores próximos ou superiores aos obtidos em escala de bancada.

6. AGRADECIMENTOS

A autora agradece ao CETEM, pela disponibilidade da infraestrutura laboratorial, à Dra. Cláudia Cunha (CETEM), Mariana Ruiz (CETEM), Sandy Sampaio (CETEM) e Daniele Leonel (CETEM) pela ajuda e discussões, à COPMA pelo fornecimento dos equipamentos e do material utilizado no presente estudo e ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHASKAR, P. V; BHOSLE, N. B. Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): a carrier of heavy metals in the marine food chain. *Environment international*, v. 32, p. 191-198, 2006.

FEIN, J. B. Thermodynamic Modeling of Metal Adsorption onto Bacterial Cell Walls: Current Challenges. In: SPARKS, D. L. (Ed.). *Advances in Agronomy*. Academic Press, v. 90p. 179-202, 2006.

GUINÉ, V. Effect of cultivation and experimental conditions on the surface reactivity of the metal resistant bacteria *Cupriavidus metallidurans* CH34 to protons, cadmium and zinc. *Chemical Geology*, v. 236, n. 3-4, p. 266-280, 2007.

JOHNSON, K. J.; CYGAN, R. T.; FEIN, J. B. Molecular simulations of metal adsorption to bacterial surfaces. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, v. 70, n. 20, p. 5075-5088, 2006.

LAMELAS, C. et al. Characterization of H⁺ and Cd²⁺ binding properties of the bacterial exopolysaccharides. *Chemosphere*, v. 65, n. 8, p. 1362-1370, 2006.

LIANG, T.; WANG, S. Recent advances in exopolysaccharides from *Paenibacillus* spp.: Production, Isolation, structure, and Bioactivities. *Marine drugs*, v.13, p.1847-1863, 2015.

MARTINS, P. S. O.; ALMEIDA, N.F.; COSTA, R.G.S.; FRANCO, A.P; VIEIRA, M.F.; MELACHUS, J.M.M.; SANTOS, L.G.; ALVES, F.; VIEIR, C.R.; CUNHA, C.D.; LEITE, S.G.F. Evaluation of EPS Application in Microbial Consortia Growing in Aqueous Co-Contaminated Systems: The Trend to Natural Attenuation. *The Open Biotechnology Journal*, v.2, p.176-182, 2008.

RAFIGH A, S. M.; YAZDI, A. V.; VOSSOUGHIB, M.; SAFEKORDIA, A. A.; ARDJMANDC, M. Optimization of culture medium and modeling of curdlan production from *Paenibacillus polymyxa* by RSM and ANN. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 70, p. 463-473, 2014.

SHI, Y.; HUANG, J.; ZENG, G.; GU, Y.; CHEN, Y.; HU, Y.; TANG, B.; ZHOU, J.; YANG, Y.; SHI, L. Exploiting extracellular polymeric substances (EPS) controlling strategies for performance enhancement of biological wastewater treatments: An overview. *Chemosphere*, v. 180, p. 396-411, 2017.

VERBEEK, C. J. R. Products and applications of biopolymers. In *Tech*. 2017.

TAKETANI, N. F. Degradação de hidrocarbonetos em solo multi-contaminado com níquel e alteração na comunidade bacteriana. Rio de Janeiro. Tese de doutorado. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2016.