

## X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

*“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”*

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Universidade Severino Sombra  
Vassouras – RJ – Brasil

### UTILIZAÇÃO DE VINHAÇA PARA A PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) POR *Cupriavidus necator*

MARTINHAGO<sup>1</sup> F. M.; STEFFEN<sup>1</sup>, W. F.; SANTOS<sup>1</sup>, E. C.; ZANFONATO<sup>2</sup>, K.; QUINES<sup>2</sup>,  
L. K. M.; SCHMIDT<sup>2</sup>, M.; GAI<sup>3</sup>, C. S.; SCHMIDELL<sup>4</sup>, W.; ARAGÃO<sup>4</sup>, G. M. F.

<sup>1</sup>Aluno – EQA/CTC/UFSC <sup>2</sup>Doutorando – EQA/CTC/UFSC

<sup>3</sup>Pós-Doutorando - EQA/CTC/UFSC <sup>4</sup>Professor - EQA/CTC/UFSC

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos - Centro Tecnológico -  
Universidade Federal de Santa Catarina,

Endereço – UFSC, Bairro Trindade, Florianópolis, CEP 88040-900, SC

e-mail: glaucia@enq.ufsc.br

**RESUMO** - A produção de bioetanol a partir da fermentação de melaço de cana-de-açúcar gera vinhaça como resíduo da destilação, na proporção de 4 a 10 l para cada litro de produto. Geralmente usada em fertirrigação, a vinhaça causa impactos negativos no meio ambiente, contaminando solos e águas subterrâneas. Para minimizar este impacto, a vinhaça pode ser utilizada na geração de produtos com valor agregado. O Poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) é um biopolímero, biodegradável e biocompatível, acumulado intracelularmente como reserva energética, por diversos micro-organismos (e.g. *Cupriavidus necator*), mas o seu elevado custo de produção o torna economicamente não competitivo. Neste contexto, a utilização da vinhaça como substrato para a produção biotecnológica de P(3HB) é uma alternativa possível de ser explorada. Este trabalho relata a capacidade de crescimento da bactéria *C. necator* DSM 545, e produção de P(3HB) a partir de vinhaça proveniente da destilação do mosto de cana-de-açúcar, em incubador rotativo. Os ensaios preliminares mostraram a capacidade de crescimento do micro-organismo em vinhaça não diluída sem efeito inibitório no crescimento do mesmo. Testes com a adição de minerais essenciais, fonte de nitrogênio e glicose (durante o crescimento da bactéria) à vinhaça, demonstraram a capacidade de produção de P(3HB).

**Palavras-chave:** biopolímero, cana-de-açúcar, resíduo agroindustrial.

## INTRODUÇÃO

Responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo, o Brasil é o maior produtor de açúcar e etanol e conquista, cada vez mais, o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética (Ministério da Agricultura, Brasil, 2013). Dados publicados para a safra prevista em

2013/2014 mostram que a área plantada de cana-de-açúcar será, aproximadamente, igual a 8,8 milhões de hectares e serão produzidas 40,97 milhões de toneladas de açúcar e 27,17 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2013).

A vinhaça, resíduo da destilação do álcool etílico produzido por via fermentativa, é também conhecida como vinhoto, restilo, caldo ou garapão (Bittencourt *et al*, 1978).

A vinhaça é principalmente utilizada em fertirrigação, porém há controvérsias quanto à aplicação da vinhaça no solo, devido à possível contaminação da água subterrânea quando a mesma é aplicada em excesso (Laime *et al.*, 2011).

A valorização da vinhaça, um resíduo rico em ácidos orgânicos, glicerol e sais minerais (Parnaudeau *et al.*, 2008), através da sua utilização como substrato para a produção biotecnológica de Poli-hidroxialcanoatos (PHAs) é uma alternativa interessante.

Dentre os PHAs, o Poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) é o biopolímero mais estudado em função de suas características similares às do polipropileno (PP), polímero de origem fóssil. Estes biopolímeros são acumulados como material de reserva de carbono e energia por vários micro-organismos, geralmente sob condições de limitação de nutrientes essenciais como nitrogênio, fósforo, enxofre ou oxigênio, e na presença de excesso de fonte de carbono (Lee *et al.*, 1999; Khanna e Srivastava, 2005).

Muitos são os micro-organismos produtores de P(3HB). Entre eles, a bactéria *Cupriavidus necator* é uma das que apresenta melhores condições à produção industrial. Esta bactéria destaca-se pela capacidade de acumular mais de 80 % de sua massa seca em polímero, com alta massa molar e utilizando diferentes tipos de substratos como glicose, frutose, ácidos orgânicos dentre outros (Ramsay, 1994).

Este trabalho teve como objetivo demonstrar a capacidade de produção de P(3HB), um biopolímero biodegradável, a partir de vinhaça, a partir de *C. necator*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Micro-organismo e Meios de Cultivo

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a bactéria *Cupriavidus necator* DSM 545.

Os experimentos preliminares, com o objetivo de verificar se o micro-organismo estudado teria capacidade de crescer em meio mineral (Aragão *et al.*, 1996) com vinhaça e vinhaça adicionada de glicose (20 g.l<sup>-1</sup>) foram realizados a partir de uma pré-cultura em caldo nutriente (CN), que contém peptona de carne

(5,0 g.l<sup>-1</sup>) e extrato de carne (3,0 g.l<sup>-1</sup>). As concentrações de vinhaça durante o experimento variaram de 0,5; 5; 10 e 100 % (v/v).

O cultivo para estudar a produção de P(3HB) foi realizado a partir de duas pré-culturas, uma em CN e outra em meio mineral (sem adição de glicose). A adição de glicose (20 g.l<sup>-1</sup>) ao meio mineral foi realizada após 6 h.

A vinhaça utilizada em todos os ensaios foi esterilizada por filtração em membrana com poro de 0,22 µm.

### Condições de Cultivo

As pré-culturas em CN foram realizadas em frascos *erlenmeyer* aletados de 500 ml contendo 150 ml de meio, e permaneceram a 35 °C/150 rpm em incubador rotativo, por 18 h. A fração de inóculo utilizada em todos os experimentos foi de 10 % (v/v).

Ensaio preliminar: Os testes foram realizados em frascos *erlenmeyer* aletados de 250 ml contendo 100 ml de meio mineral, a 35 °C e 150 rpm por 24 h, em incubador rotativo.

Cultivo: O cultivo foi conduzido em frasco *erlenmeyer* aletado de 1000 ml com 200 ml de meio, a 35 °C/150 rpm por 26 h, em incubador rotativo, sendo que, este partiu de uma segunda pré-cultura, também em meio mineral, que permaneceu sob as mesmas condições por 6 h.

### Técnicas Analíticas

Amostragem: Amostras de 2 ml foram coletadas a cada 2 h e acondicionadas em microtubos de plástico e centrifugadas (10956 xg/3 min). Os sobrenadantes e os precipitados foram congelados separadamente para posteriores análises.

Determinação da concentração da biomassa: O acompanhamento do crescimento da biomassa foi realizado por espectrofotometria A<sub>600nm</sub> e por meio de análise gravimétrica, através da filtração de 5 ml de meio cultivado em membrana de celulose com 0,22 µm de poro, em seguida as membranas, previamente taradas, foram secas e pesadas.

Determinação da concentração de glicose e glicerol: As amostras foram

analisadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em um equipamento Jasco (LC-2000Plus Series). Os picos analisados foram detectados com um detector de índice de refração (RI-2031 – Jasco).

Determinação demanda química de oxigênio (DQO): Foi realizada segundo o procedimento do Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA, WEF, 1995).

Determinação da concentração de P(3HB): As células contendo P(3HB) foram analisadas por HPLC, segundo Karr *et al.* (1983) com modificações. Esta análise foi realizada em equipamento Jasco (LC-2000Plus Series). A concentração foi detectada a  $A_{210nm}$  (Jasco UV-2077).

### Tratamento dos Dados

Considerando-se que o acúmulo de P(3HB) é intracelular, é importante a definição de:

$X_t$  (biomassa total) = biomassa contendo P(3HB);

$X_r$  (biomassa residual) =  $X_t - P(3HB)$ .

Velocidade específica de crescimento da biomassa: A partir dos perfis de concentração celular, foi possível determinar as velocidades instantâneas de crescimento microbiano ( $dX_r/dt$ ). Dividindo-se estas velocidades pela concentração celular residual no instante  $t$ , a velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_{X_r}$ ) foi obtida e está representada pela Equação 1.

$$\mu_{X_r} = \frac{1}{X_r} \frac{dX_r}{dt} \quad (1)$$

Os ajustes aos dados experimentais foram realizados com o auxílio do *software* Microsoft Office Excel 2007.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios preliminares, realizados com o objetivo de verificar o possível efeito inibitório da vinhaça no crescimento de *C. necator*, demonstraram que, sob as condições estudadas, houve crescimento da biomassa em todas as concentrações testadas (0,50 a 100 %) (v/v). Conforme Bekatorou *et al.* (2006) uma das vantagens da utilização da

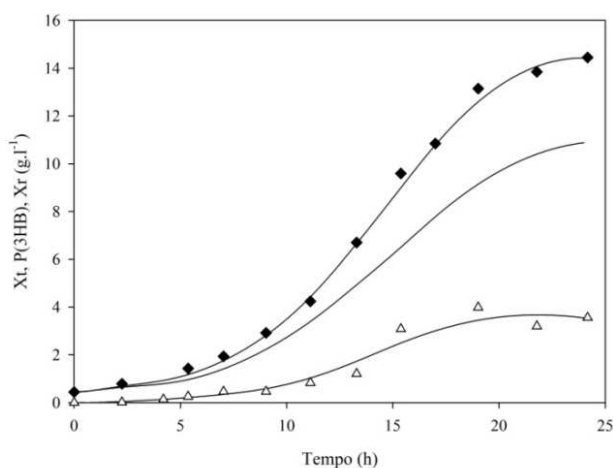
vinhaça em processos biotecnológicos, é a mesma ser livre de toxinas e inibidores de fermentação. Por outro lado, Santos *et al.* (2003) afirmaram que a presença de compostos, como os compostos fenólicos, podem ser tóxicos e/ou inibir micro-organismos.

Estudos reportados da literatura que avaliaram variações da concentração de vinhaça no crescimento de micro-organismos, normalmente leveduras, como *Candida lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, utilizaram concentrações de vinhaça de até 75 % (v/v) e com adição de outros nutrientes como peptona, extrato de levedura, melaço e também glicose (Silva *et al.*, 2011; Cazetta e Celligoi, 2006).

Com a comprovação do crescimento de *C. necator* em vinhaça pura (100 % - v/v) apenas com adição de sais minerais, ensaios com diferentes estratégias de cultivo (dados não apresentados) foram realizados com o objetivo de se estabelecerem as condições experimentais. A partir das respostas obtidas nesses testes, foi possível concluir que, o principal inconveniente da utilização de vinhaça para a produção de P(3HB), é sua baixa concentração da fonte de carbono, apesar dos índices de DQO de 30 a 100 g.l<sup>-1</sup>. (Pant e Adholeya, 2007; Jimenez *et al.*, 2006; Beltran *et al.*, 2005).

Como este trabalho se propôs a analisar também a produção de P(3HB) em frascos agitados, uma adição complementar de vinhaça ao longo do cultivo, com a finalidade de aumentar a fonte de carbono disponível, não seria conveniente, visto a grande variação de volume que seria acarretada. Desta forma, para permitir o crescimento de *C. necator* em vinhaça pura (com adição de sais) e o acúmulo de biopolímero, adotou-se a estratégia de adição de uma solução concentrada de glicose, para elevar esta concentração a aproximadamente 20 g.l<sup>-1</sup>, ao final da fase exponencial de crescimento.

A Figura 1 apresenta os dados de concentração total de células ( $X_t$ ), de concentração residual ( $X_r$ ) e de concentração de biopolímero (P3HB)) ao longo do cultivo.

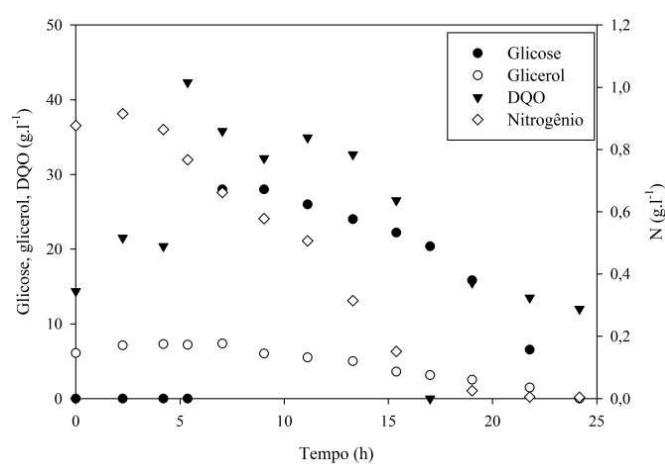


**Figura 1 - Evolução da biomassa total (♦), biomassa residual (—) e da produção de P(3HB) (▲), ao longo do cultivo. A linha contínua representa os ajustes feitos pelo software Microsoft Office Excel (2007).**

A porcentagem final de biopolímero acumulado foi de 30 % (p/v) e a velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{Xr}$ ) foi de  $0,20 \text{ h}^{-1}$ . O acúmulo de P(3HB) foi relativamente baixo quando comparado a outros estudos da literatura, com valores próximos a 80 % de P(3HB), dependendo das condições experimentais (Reinecke e Steinbüchel, 2009). Porém, o valor de  $\mu_{Xr}$  encontrado está de acordo com a literatura consultada para este micro-organismo (Khan *et al.*, 2013; Tavares *et al.*, 2004).

Pramanik *et al.* (2012) utilizaram vinhaça para a produção de P(3HB) a partir de *Haloarcula marismortui*, um micro-organismo halofílico (capaz de crescer em elevadas concentrações de sais) e o acúmulo final de P(3HB) em meio com 10 % de vinhaça foi de 30 % com  $\mu_X$  de  $0,086 \text{ h}^{-1}$ . Myshkina *et al.* (2008) com o objetivo de produzir P(3HB) a partir de vinhaça (25 % - v/v) e outros resíduos, obtiveram acúmulo de 73 % utilizando *Azotobacter charoococcum*. Sendo os trabalhos citados, uns dos poucos encontrados contendo relatos de produção de P(3HB) a partir de vinhaça, independente do micro-organismo utilizado. Cabe ressaltar que neste estudo a vinhaça não foi diluída, o que torna o acúmulo encontrado de biopolímero bastante satisfatório.

Na Figura 2 são apresentados os dados de concentração residual de glicose, glicerol, DQO e nitrogênio, todos em  $\text{g.l}^{-1}$ .



**Figura 2 - Dados de concentração residual de glicose (●), glicerol (○), DQO (▼) e nitrogênio (◇), ao longo do cultivo.**

É possível observar na Figura 2 que antes da adição de glicose (aproximadamente 6 h) esta não se encontrava disponível no meio, como substrato acredita-se que o micro-organismo tenha assimilado outras fontes de carbono (não quantificadas neste estudo) presentes na vinhaça, como por exemplo, os ácidos orgânicos (Robles-González *et al.*, 2012; Elia Neto e Nakahondo, 1995), comprovada através dos níveis de DQO que se encontravam em torno de  $20 \text{ g.l}^{-1}$ .

Informações disponíveis na literatura sugerem que um dos maiores componentes orgânicos da vinhaça da cana-de-açúcar é o glicerol (Parnaudeau *et al.*, 2008), porém foi observado que o glicerol proveniente da vinhaça, parece ter sido consumido somente após a adição da glicose.

O nutriente utilizado como limitante neste estudo, para o processo de síntese de P(3HB), foi o nitrogênio e sua limitação pode ser observada (Figura 2) em torno de 12 h de cultivo e sua exaustão em aproximadamente 18 h, permitindo assim o acúmulo de P(3HB), que como mostrado na Figura 1, começou a aumentar neste instante de tempo.

Ao final do cultivo, a DQO se encontrava em aproximadamente  $15 \text{ g.l}^{-1}$ , e a biomassa total estava entrando em fase de decaimento, sugerindo que, da DQO disponível na vinhaça, determinados compostos não são capazes de serem consumidos pelo micro-organismo estudado.

Frente ao exposto, este estudo demonstrou a capacidade de produção de

P(3HB) a partir de vinhaça, sem utilização de pré-tratamento, apenas esterilização.

A produção deste biopolímero a partir de vinhaça pode ser promissora tanto do ponto de vista ambiental, como econômico, visto os elevados custos de produção de PHAs.

## CONCLUSÃO

*C. necator* foi capaz de produzir P(3HB) a partir de um resíduo abundante e poluente. Este é o primeiro relato de produção de biopolímero por este micro-organismo utilizando vinhaça pura.

## REFERÊNCIAS

- APHA, AWWA, WEF. (1995), Standard methods for the examination of water and wastewater 19<sup>th</sup>. American public health association. Washington, DC.
- ARAGÃO, G. M. F., LINDLEY, N. D., URIBELARREA, J. L., PAREILLEUX, A. (1996), "Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*". Biotechnology Letters, 18, 937-942.
- BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. (2006), "Production of food grade yeasts". Food Technology and Biotechnology, 44, 407-415.
- BELTAN, J.; DOMINGUEZ, J.; PARTIDO, E. (2005), "Phisico-chemical treatment for the depuration of wine distillery wastewaters (vinasses)". Water Science and Technology, 51, 159-166.
- BITTENCOURT, V. C., CASTRO, L. J. B., FIGUEIREDO, A. A. M., PAIXÃO, A. C. S., POLLI, D. M. (1978), "Composição da Vinhaça". Brasil Açucareiro, 92, 25-35.
- CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. (2006), "Study of molasses/vinasse waste ratio for single cell protein and total lipids production by microorganisms". Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, 27, 03-10.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar - estimativa safra 2013/2014.
- ELIA NETO, A.; NAKAHONDO, T. (1995), Caracterização físico-química da vinhaça projeto N° 9500278. Relatório técnico da seção de tecnologia de tratamento de águas do centro de tecnologia cooperucar, Piracicaba, 26 p.
- JIMÉNEZ, A. M.; BORJA, R.; MARTÍN, A.; RAPOSOB, F. (2006), "Kinetic analysis of the anaerobic digestion of untreated vinasses and vinasses previously treated with *Penicillium decumbens*". Journal of Environmental Management, 80, 303-310.
- KARR, D. B.; WATERS, J. K. A; EMERICH, D. W. (1983), "Analysis of Poly-β-Hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* Bacteroids by Ion-Exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV detection". Applied and Environmental Microbiology, 46, 1339-1344.
- KHAN, M. R.; PRASAD, E. N. R.; ABDULLAH, H; BATCHA, A. F. M. (2013), "Kinetic analysis on cell growth and biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) in *Cupriavidus necator* H 16". Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 3, 516-519.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. (2005), "Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates". Process Biochemistry, 40, 609-619.
- LAIME, E. M. O., FERNANDES, D. C. S., FREIRE, E. A. (2011), "Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão". Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas, 5, 16.
- LEE, S. Y., CHOI, J., WONG, H. H. (1999), "Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review". International Journal of Biological Macromolecules, 25, 31-36.

- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA (2013), <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>, acessado em 28 de agosto de 2013.
- MYSHKINA, V. L.; NIKOLAEVA, D. A.; MAKHINA, T. K.; BONARTSEV, A. P.; BONARTSEVA, G. A. (2008), "Effect of growth conditions on the molecular weight of Poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B" *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44, 482–486.
- PANT, D.; ADHOLEYA, A. (2007), "Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review". *Bioresource Technology*, 98, 2321-2334.
- PARNAUDEAU, V.; CONDOM, N.; OLIVER, R.; CAZEVIEILLE, P.; RECOUS, S. (2008), "Vinsasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration process". *Bioresource Technology*, 99, 1553-1562.
- PRAMANIK, A.; MITRA, A.; ARUMUGAM, M.; BHATTACHARRYA, A.; SADHUKHAN, S.; RAY, A.; HALDAR, S.; MUKHOPADHYAY, U. K.; MUKHERJEE, J. (2012), "Utilization of vinsasse for the production of polyhydroxybutyrate by *Haloarcula marismortui*". *Folia Microbiology*, 57, 71–79.
- RAMSAY, B.A. (1994), "Physiological factor affecting PHA production. Physiology, kinetics, production and use of biopolymers". *Proceedings*, 9-7, Austria.
- REINECKE, F., STEINBÜCHEL, A. (2009). "Ralstonia eutropha strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers". *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16, 91–108.
- ROBLES-GONZÁLEZ, V.; GALÍNDEZ-MAYER, J.; RINDERKNECHT-SEIJAS, N.; POGGI-VARALDO, H. M. (2012), "Treatment of mezcal vinasses: A review". *Journal of Biotechnology*, 157, 524-546.
- SANTOS, M. A. M., BOCANEGRA, J. L. F., MARTÍN, A. M., GARCÍA, I. G. (2003) "Ozonation of vinsasse in acid and alkaline media". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78, 1121–1127.
- SILVA, C. F.; ARCURI, S. L.; CAMPOS, C. R.; VILELA, D. M.; ALVES, J. G. L. F.; SCHWAN, R. F. (2011), "Using the residue of spirit production and bio-ethanol for protein production by yeasts". *Waste Management*, 31, 108-114.
- TAVARES, L. Z., SILVA, L. S., PRADELLA, J. G. C. (2004), "Production of poly(3-hydroxybutyrate) in an airlift bioreactor by *Ralstonia eutropha*". *Biochemical Engineering Journal*, 18, 21–31.