



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

USO DE *Paenibacillus sp.* PARA PRODUÇÃO DE EPS UTILIZANDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO

DIAS DSB¹, TAKETANI NF², LEITE SGF² e CUNHA CD¹

¹ Centro de Tecnologia Mineral, MCTIC

² Departamento de Engenharia Bioquímica, UFRJ

E-mail para contato: ccunha@cetem.gov.br

RESUMO – A produção de biopolímeros necessita melhorar seus atrativos econômicos, principalmente em termos de aumento de produtividade e minimização dos custos de produção. No presente trabalho, foi utilizado um microrganismo do gênero *Paenibacillus* comprovadamente produtor de EPS e a produção do biopolímero foi investigada em frascos Erlenmeyer sob agitação, utilizando quatro diferentes fontes de carbono (sacarose, açúcar VHP, glicerol e glicerina). Os resultados mostram que com o uso do açúcar VHP obteve-se a maior produção com 147,4 g/L de EPS bruto em 28h.

1. INTRODUÇÃO

As substâncias poliméricas extracelulares (EPS) ou gomas são polissacarídeos extracelulares de origem microbiana, que tem a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso. São uma complexa mistura de polímeros de alto peso molecular, que consiste de polissacarídeos, proteínas, ácidos húmicos, ácidos urônicos, ácidos nucleicos, lipídeos e etc, com grupos funcionais ionizáveis, como carboxílico, fosfórico, amino e hidroxílico, sendo que a proporção de cada componente dessa complexa mistura influencia diretamente nas características da EPS, e conseqüentemente em sua aplicação biotecnológica, seja para adsorção, biodegração, biomineração, biofloculação ou bioflotação (More et al., 2014).

Um microrganismo conhecidamente produtor de EPS é o *Paenibacillus*, uma bactéria Gram-positiva, aeróbica ou anaeróbica facultativa, em forma de bastonete, formadora de endosporo, comumente encontrada em solos e na rizosfera. Este microrganismo foi ranqueado pela agência de proteção ambiental dos estados unidos (*US Environmental Protection Agency*) como um dos mais aplicados no comércio mundial (Rafigh et al., 2014).

Com a finalidade de se manter competitiva, a produção de biopolímeros por *Paenibacillus sp.* necessita melhorar seus atrativos econômicos, principalmente em termos de aumento de produtividade e minimização dos custos de produção. Neste contexto, vários estudos vêm sendo conduzidos para explorar a biossíntese para produção do polímero, influenciada pelas variáveis pH, nutrientes, temperatura, agitação, aeração e fonte de carbono. Uma segunda alternativa é o uso de substratos naturais para a produção de uma ampla variedade de produtos de valor agregado (Rafigh et al., 2014). No presente trabalho, foi utilizado um microrganismo altamente produtor de EPS (*Paenibacillus sp.*) para investigar o uso de quatro diferentes fontes de carbono (sacarose, açúcar VHP, glicerol e glicerina) na sua produção.



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

2. MATERIAL E MÉTODOS

A técnica para isolamento da estirpe produtora de EPS foi realizada utilizando meio RCV como Kaci et al. (2005) com algumas modificações. Após o isolamento, ocorreu a seleção das colônias por suas características mucoides e a identificação por sequenciamento. Para a produção de EPS foram utilizados meios de cultivos compostos de 30 g/L de extrato de levedura e mais uma fonte de carbono, sendo 4 fontes de carbono estudadas, (i) sacarose (200 g/L), (ii) açúcar VHP (200 g/L), (iii) glicerol (170 mL/L) e (iv) glicerina (218 mL/L). Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, em triplicata, com tempo de produção de 28 horas, a 30°C e 150 rpm. Após cultivo, o meio foi fervido por 15 minutos. Em seguida levado ao rotaevaporador e posteriormente foi feita a centrifugação a 3.000 rpm para a remoção da fração celular. Ao sobrenadante foi adicionado etanol gelado na proporção 3:1 (etanol: sobrenadante) para a precipitação da EPS e mantido sob refrigeração por 24 horas. Em seguida o etanol foi removido e a EPS quantificada após incubação à 60° C até peso constante (Taketani, 2016).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização combinada de rizosfera de trigo com meio específico descrito por Kaci e colaboradores (2005) estimulou o aparecimento de bactérias produtoras de EPS. Nas placas de crescimento, foi possível observar colônias que tinham característica mucóide, possíveis produtoras de EPS. Contudo, a variedade de morfotipos foi baixa, fator que pode estar relacionado com o uso deste meio de cultura específico. Dentre algumas bactérias isoladas, foi selecionada apenas uma, que apresentava crescimento em até 72 horas em meio RCV modificado, em seguida foi realizado o sequenciamento e a identificação como pertencente a do gênero *Paenibacillus*.

As fontes de carbono utilizadas recorrentemente na literatura para produção de EPS são sacarose, glicose e glicerol com alta pureza (Rütering et al., 2016; Liang e Wang; 2015; Rafigh et al., 2014), entretanto visando uma redução de custos de produção foram utilizadas fontes de carbono alternativas, seja por meio do reaproveitamento de um subproduto de um processo, como é o caso da produção de biodiesel (glicerina), ou por uso de um açúcar que não utiliza uma etapa de refino (açúcar VHP). A seguir são apresentados na Tabela 1 os valores de produção de EPS bruto, como pode ser observado o açúcar VHP apresentou melhor produção de EPS, seguido da sacarose.

Tabela 1 – Produção de EPS a partir de diferentes fontes de carbono

Fonte de carbono	Produção de EPS (g/L)
Sacarose*	142,8 ± 4,3
Açúcar VHP*	147,4 ± 11,3
Glicerol	82,1 ± 11,9
Glicerina	45,7 ± 11,1

*sem remoção de células



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

O uso de materiais residuais como matéria prima pode ser uma alternativa para diminuir os custos do produto. Por exemplo, o uso de melaço ou materiais lignocelulósicos requer um pré-tratamento para remover as impurezas, o qual acarreta aumento dos custos de produção. Por outro lado, fontes de carbono puras podem resultar em altos custos do produto final, especialmente pela demanda de alta concentração de açúcares (no presente trabalho 200 g/L). O uso de matérias primas de baixo custo, como o açúcar VHP é fundamental para a redução dos custos do processo (Cruz et al., 2017).

O açúcar VHP não é refinado, sendo produzido nas plantas industriais de cana de açúcar e contem mais de 99% de sacarose (o restante é composto de Ca, Mg, K, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, S e P). Este é o açúcar mais exportado no mundo e é refinado para a produção de diferentes tipos de açúcar. A produção do biopolímero utilizando açúcar VHP foi ligeiramente maior à obtida usando sacarose, que pode ser atribuído à presença das impurezas. A obtenção desse produto também é influenciada pelas condições de cultivo, como meio e escala. A produção do EPS por bactéria está relacionada tanto a uma alta concentração da fonte de carbono quanto à limitação nutricional ou a outra resposta de estresse (Häbler, et al., 2012).

A glicerina bruta pode ser obtida por diferentes processos como a produção de detergentes, ácidos e ésteres graxos e a produção de biodiesel. Neste ponto é importante esclarecer que o termo glicerol é aplicado ao composto orgânico com grau de pureza $\geq 99\%$, enquanto os compostos com graus de pureza inferiores são denominados glicerina (Jaramillo et al., 2018). A glicerina utilizada no trabalho (S, Cl, 21% de água, N, Al, Fe, Ca, K, Si, P, Z, Ba, Cd, Hg, Pb, V, metanol e etanol) apresentou resultado inferior em comparação ao obtido com glicerol. Neste caso, ao contrário do ocorrido com o açúcar VHP, a presença de algum elemento inibiu o desenvolvimento dos microrganismos, provavelmente metais como Pb, Hg e Al que são conhecidos por sua toxicidade, mesmo em baixas concentrações (Rathnayake et al., 2009).

Comparativamente aos outros trabalhos citados na literatura para a produção de EPS, por exemplo, o resultado de 53 g/L produzido por *Xantomonas campestris* (Kalogiannis et al., 2003), de 70 g/L produzido por *Bacillus subtilis* (Shih et al., 2010), ou mesmo em recente revisão de Liang et al. (2015) que apresentou valores variando de 3,46 a 41,25 g/L de EPS produzidos por microrganismos do gênero *Paenibacillus*, os níveis de produção de EPS bruto no presente trabalho foram bastante promissores, obtendo-se um valor superior ao máximo encontrado na literatura (70 g/L). Os valores de EPS obtidos neste trabalho foram os melhores, comparativamente aos resultados encontrados na literatura pesquisada, em pelo menos três das 4 condições estudadas.

5. CONCLUSÃO

O gênero *Paenibacillus* isolado da rizosfera apresentou grande potencial para produção de EPS, alcançando concentrações de 142,8, 147,4, 82,1 g/L, utilizando sacarose, açúcar VHP e glicerol como fonte de carbono, respectivamente, valores estes acima dos obtido na literatura. Adicionalmente, o maior potencial é o da produção utilizando o açúcar VHP, em substituição à sacarose, que é um produto refinado e que aumenta os custos do processo.

6. REFERÊNCIAS



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

CRUZ JC, DIAS DSB, CASTRO AM, SÉRVULO EFC. Itaconic acid production by *Aspergillus terreus* from low-cost carbon and nitrogen sources. *Int. J. of Eng. and Tec. Res.*, v. 7, p. 32-36, 2017.

HÄBLER T, SCHIEDER D, PFALLER R, FAUSTICH M, SIEBER V, Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Bior. Tech.*, v. 124, p. 237-244, 2012.

HUGENHOLTZ P, PACE NR, Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trend. in biotech.*, v. 14, p. 190–197, 1996.

JARAMILLO LYA, DIAS DSB, FERREIRA DG, VASCONCELOS U, SERVULO EFC, Sobreprodução de glicerina: uma tendência mundial e alternativas para seu aproveitamento. *Meio Ambiente: Os desafios do mundo contemporâneo*, Capítulo 18, p. 366-386, 2018.

KACI Y, HEYRAUD A, BARAKAT M, HEULIN T, Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. *Res. in micr.*, v. 156, p. 522–31, 2005.

KALOGIANNIS S, IAKOVIDOU G, LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES M, AKYRIAKIDIS D, SKARACIS G N Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. *Proc. Biochem.*, v. 39, p. 249– 256, 2003.

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

MORE TT, Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *J. of Env. Manag.*, v. 144, p. 1–25, 2014.

RAFIGH ASM, YAZDI AV, VOSSOUGHIB M, SAFEKORDIA AA, ARDJMANDC M, Optimization of culture medium and modeling of curdlan production from *Paenibacillus polymyxa* by RSM and ANN. *Int. J. of Biol. Macr.*, v. 70, p. 463-473, 2014.

RATHNAYAKE IVN, MEGHARAJ M, BOLAN N, NAIDU R, Tolerance of heavy metals by gram positive soil bacteria. *Int. J. of Bioeng. and lif. Scienc.*, v. 3, p. 270-274, 2009.

RÜTERING M, SCHMID J, RUHMANN B, SCHILLING M, SIEBER V, Controlled production of polysaccharides—exploiting nutrient supply for Levan and heteropolysaccharide formation in *Paenibacillus* sp. *Carb. Pol.*, v. 148, p. 326-334, 2016.

SHIH I, CHEN L, WU J. Levan production using *Bacillus subtilis* natto cells immobilized on alginate. *Carb. Pol.*, v.82, p. 111–117, 2010.

TAKETANI NF. Degradação de hidrocarbonetos em solo multicontaminado com níquel e alteração na comunidade bacteriana. Rio de Janeiro. Tese de doutorado. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2016.