

PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS EM MEIOS CONTENDO HIDROLISADO DE ARROZ E MILHO COMO FONTE DE CARBONO: PRODUÇÃO E RENDIMENTO DAS CELULOSES PRODUZIDAS PELAS BACTÉRIAS *Gluconacetobacter hansenii* E *Komagataeibacter rhaeticus*.

SANTOS, Gabriela Rodrigues dos ^{1C}; VINHAS, Glória Maria ^{2D}; SOUZA, Karina Carvalho ^{3C}; OLIVEIRA, Paulo Henrique Marrocos de ^{4C}; AIRES, Raiane Souza ^{5C}

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Engenharia Química (UFPE), Recife, Pernambuco, gabisantos.k@hotmail.com; ²Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Engenharia Química (UFPE), Recife, Pernambuco, gmvinhas@yahoo.com.br; ³Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química (UFRPE), Recife, Pernambuco, Karinacar_souza@hotmail.com; ⁴Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Engenharia Química (UFPE), Recife, Pernambuco, phmarrocos@gmail.com; ⁵Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Engenharia Química (UFPE), Recife, Pernambuco, raianesouzaires@gmail.com.

RESUMO

A celulose, um polissacarídeo, pode ter origem vegetal ou microbiana. Sua produção por via bacteriana mostra-se promissora em soluções para indústria médica e de tecidos. Neste trabalho foram analisados os rendimentos e fatores que influenciaram os biopolímeros obtidos na produção de celulose pelos microrganismos *Gluconacetobacter hansenii* e *Komagataeibacter rhaeticus* utilizando amido (arroz e flocos de milho) como fontes de carbono. O amido foi hidrolisado pelo fungo *Aspergillus oryzae* para a produção de glicose em meios com diferentes suplementações. Ao final do estudo obteve-se um rendimento máximo de 8,1 g.L⁻¹ através do meio de arroz hidrolisado e suplementado de meio Hestrin e glicose utilizando a bactéria *K. rhaeticus*. Com o arroz foi possível obter também um rendimento de 3,0 g.L⁻¹ utilizando apenas Glicose e Fosfato como suplementação. Para o milho, no entanto, foi obtido um rendimento máximo de apenas 1.3 g.L⁻¹ através da *K. rhaeticus* suplementado de glicose e meio Hestrin.

PALAVRAS-CHAVE: Celulose bacteriana, Arroz, Milho.

1. INTRODUÇÃO

A celulose, representada pela forma (C₆H₁₀O₅)_n, é um polissacarídeo de origem vegetal que é constituído por unidades de β-D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas β-(1→4). Ela pode ser encontrada em diferentes formas de vida como em plantas verdes, fungos, protozoários e procariontes.¹ Esse biopolímero, não tóxico,² possui grande capacidade de retenção de líquidos, propriedade importante para aplicações médicas e de engenharia de tecidos.³ Além disso, apresenta características similares ao polímero de origem vegetal, porém difere no grau de polimerização e também pela produção de fibras mais estáveis e resistentes, dada pela sua estrutura reticular ultrafina, alta cristalinidade, força de tensão, elasticidade e durabilidade.⁴

As bactérias do gênero *Gluconacetobacter* (anteriormente *Acetobacter*) são bactérias não patogênicas, comumente encontradas em frutas e vegetais, e apresentam a capacidade de produzir nanofibras de celulose pura.⁵ Essa produção ocorre a partir do consumo de glicose no meio, metabolizada em celulose pelos microrganismos. A glicose consumida pode ser obtida na forma de reagente ou produzida por microrganismos capazes de atuar na hidrólise do amido em glicose, partindo de uma fonte de carbono. Os fungos filamentosos, por exemplo, são os mais adaptáveis a crescerem em substratos sólidos, pois são capazes de crescer com pouca água e muitos sólidos presentes, além de sua forma de crescimento favorecer a colonização do meio.⁶ A escolha da fonte de carbono em conjunto com o microrganismo é feita de maneira a otimizar a produção com a menor quantidade de reagentes utilizados.

Diante disso, o principal objetivo deste artigo foi analisar a produção de celulose bacteriana pelos microrganismos *Gluconacetobacter hansenii* e *Komagataeibacter rhaeticus* utilizando arroz e flocos de milho hidrolisados pelo fungo *Aspergillus oryzae* para produzir glicose em meios com diferentes suplementações.

2. METODOLOGIA

Para a produção de glicose através da hidrólise do amido, foram preparados dois inóculos de 50ml, ambos contendo Meio CZ modificados (milho ou arroz como fonte de carbono) de acordo com a seguinte composição: 3,0 g.L⁻¹ de NaNO₃; 0,01 g.L⁻¹ de FeSO₄.7 H₂O; 0,5 g.L⁻¹ de KCl; 1,0 g.L⁻¹ de K₂HPO₄; 0,5 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 12,0 g.L⁻¹ de Milho (flocos de milho) ou Arroz (tipo 2 parboilizado) triturados e água destilada. Em seguida, o fungo (*Aspergillus oryzae*) foi introduzido para o seu crescimento por três dias de incubação. Cada inóculo foi adicionado a um erlenmeyer de 500 ml contendo 40g de milho e outro contendo 40g de arroz triturados, ambos previamente autoclavados em temperatura de 121° C e pressão 1 atm por 15 minutos.

Após 3 dias sob uma temperatura de 28 °C, adicionou-se 400 ml de água destilada em ambos os Erlenmeyers, os quais, posteriormente, foram aquecidos a 45 °C através de banho-maria durante 60 minutos, sofrendo vigorosas agitações a cada 10 minutos. Em seguida, os meios foram autoclavados (30 minutos a 121 °C e pressão 1 atm) e filtrados. Nas porções líquidas obtidas, foram realizadas medições das concentrações de glicose (método DNS) e reservadas para produção dos biopolímeros.

Na etapa de produção dos polímeros, os meios obtidos foram suplementados com glicose até a concentração 20 g.L⁻¹ e divididos em 8 amostras de 50 ml, totalizando 16 amostras. A suplementação de fosfato foi feita com Na₂HPO₄ em uma concentração de 2,7 g.L⁻¹ e o meio Hestrin utilizado foi: peptona 5 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹ e Na₂HPO₄ 2,7 g.L⁻¹. Ao final das suplementações, as 16 amostras foram autoclavadas (15 minutos a 121 °C e pressão 1 atm). A distribuição das bactérias e do modo de suplementação está indicado na Tabela 1, na qual cada experimento foi realizado em duplicata, e as bactérias foram introduzidas nos meios através de alçadas.

Tabela 1- Distribuição das bactérias utilizadas e das suplementações

Bactéria	Arroz	Milho
	Suplementação	Suplementação
K. rhaeticus	Glicose + Fosfato	Glicose
G. hansenii	Glicose + Fosfato	Glicose
K. rhaeticus	Glicose + Meio Hestrin	Glicose + Meio Hestrin
G. hansenii	Glicose + Meio Hestrin	Glicose + Meio Hestrin

Após 17 dias sob condições de 28 °C, os polímeros produzidos foram tratados com 15 ml de solução NaOH 0,1 M a 80 °C em banho-maria por 20 minutos. Em seguida eles foram transferidos para placas de Petri e foram submetidos a uma temperatura de -2 °C até a secagem. Por fim, foram pesadas as massas produzidas de cada polímero e medidas as concentrações de glicose remanescentes pelo método DNS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados exibidos na tabela 2, inferimos que a hidrólise do amido a partir do arroz obteve maior concentração de glicose livre, bem como, maior produção dos biopolímeros (8,1 g.L⁻¹). Comparando os resultados, com relação aos rendimentos, é possível observar a influência positiva do meio Hestrin na produção dos polímeros. No entanto, com relação aos custos para produção dos mesmos, o meio de arroz, com apenas suplementação de glicose e fosfato obteve um rendimento de 3,0 g. L⁻¹, indicando que é possível produzir celulose utilizando apenas amido hidrolisado pelo fungo *Aspergillus oryzae* como fonte de nutrientes. Quando se compara a uma produção de celulose bacteriana utilizando um método baseado naquele descrito por Hestrin e Schramm,⁷ em que, sob condições semelhantes, se produz uma média de 0,90 g.L⁻¹,⁸ nota-se que todos os resultados obtidos se encontram razoavelmente acima, mesmo aqueles sem suplementação do meio Hestrin.

Tabela 2 - Valores da média das massas de polímero produzidas de acordo com o tipo de amostra e bactéria utilizada.

Amostra	Glicose obtida na hidrólise (g L ⁻¹)	Bactéria	Suplementação	Massa Produzida (g)	Rendimento Biopolímeros (g.L ⁻¹)
Arroz	12,91	K. rhaeticus	Glicose + Fosfato	0,1475	2,9500
		K. rhaeticus	Glicose + M. Hestrin	0,4050	8,1000
		G. hansenii	Glicose + Fosfato	0,1235	2,4700
		G. hansenii	Glicose + M. Hestrin	0,3340	6,6800
Milho	6,61	K. rhaeticus	Glicose	0,0370	0,7400
		K. rhaeticus	Glicose + M. Hestrin	0,0635	1,2700
		G. hansenii	Glicose	0,0335	0,6700
		G. hansenii	Glicose + M. Hestrin	0,0205	0,4100

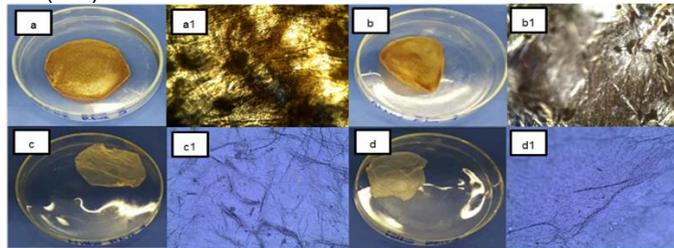
Para o milho, os resultados não são tão satisfatórios quanto os do arroz: o primeiro indicativo é a concentração de glicose baixa obtida através da hidrólise, o segundo, o aspecto visualmente mais frágil do polímero produzido (Figura 1). Esse resultado pode estar associado à natureza do milho: como os nutrientes

interessantes para tanto o fungo quanto as bactérias utilizadas se encontram no interior do milho,⁹ o método utilizado não foi suficiente para extrair esses nutrientes de modo a serem aproveitados pelos microrganismos.

De fato, durante a hidrólise do arroz pelo fungo, várias substâncias são produzidas a partir do seu metabolismo, como o sorbitol, glicerol e xylitol, além de aminoácidos que surgem pelas proteases sintetizadas pelo *A. oryzae*. Esses alcoóis, podem favorecer diretamente a fermentação das bactérias, assim como os aminoácidos produzidos. Portanto, através dessas substâncias, é possível que as bactérias no meio contendo arroz possuam mais recursos para a síntese da celulose bacteriana.¹⁰

A Figura 1 exibe os polímeros produzidos para as condições que deram o melhor resultado, além de imagens tiradas através de um microscópio. Nota-se que a bactéria *K. rhaeticus* obteve melhor rendimento que a *G. hansenii* em todas os ambientes testados, estando de acordo com os resultados obtidos pela literatura.¹¹

Figura 1 - Os polímeros produzidos sob as condições de maiores rendimentos: (a) é o polímero produzido a partir da bactéria *K. rhaeticus* utilizando arroz com suplementação glicose + meio Hestrin; (b) é o polímero produzido a partir da bactéria *K. rhaeticus* utilizando arroz com suplementação glicose + fosfato; (c) é o polímero produzido a partir da bactéria *K. rhaeticus* utilizando milho com suplementação glicose + meio Hestrin; (d) é o polímero produzido a partir da bactéria *K. rhaeticus* utilizando milho com suplementação glicose. Em (a1), (b1), (c1) e (d1) tem-se a microscopia óptica (10x)



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados analisados, o meio produzido a partir do arroz mostrou-se uma alternativa para a produção da celulose bacteriana, apresentando o maior rendimento ($8,1 \text{ g.L}^{-1}$), quando suplementado de Glicose e meio Hestrin. Para o meio utilizando arroz hidrolisado e suplementado apenas com Glicose e Fosfato, obteve-se uma produção de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de biopolímeros, mostrando ser possível a produção com meio contendo apenas amido hidrolisado por *Aspergillus oryzae*, diminuindo assim o custo para a síntese dos polímeros. Com relação a produção a partir do milho, o rendimento obtido não foi suficientemente satisfatório (máximo de $1,3 \text{ g.L}^{-1}$). No entanto, como o milho possui um alto valor de nutrientes, o baixo rendimento da síntese pode ser consequência do método utilizado. Além disso, os resultados demonstram a maior eficiência da bactéria *K. rhaeticus* sob as condições nas quais foi submetida, quando comparado à bactéria *G. hansenii*.

5. REFERÊNCIAS

1. I.A.N. Donini; D.T.B. Salvi; F.K. Fukumoto; W.R. Lustri; H.S. Barude; R. Marchetto; Y. Messaddeq; S.J.L. Ribeiro. *Eclat, Quím* 2010, 35, n.4, 165-178.
2. R. S. Kerbel; H. Kobayashi; C. H. Graham. *J. of Cell. Biochem*, 1994, 37-47.
3. B. Palsson; S. Bhatia. *Tissue Engineering*, Pearson Prentice Hall, 2004..
4. D. M. Almeida; R. A. Prestes; A. F. da Fonseca; A. L. Woiciechowski; G. Wosiacki. *Braz. J. Microbiol.* 2013, 44, 1.
5. A. J. Brown. *Journal of Chemical Society*. 1986, 49, 432-439.
6. A. Durand. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, 13, n.2/3, 113-125.
7. S. Hestrin; M. Schramm *Biochem. J.* 1954, 58, 345.
8. H. L. S. Lima; E. S. Nascimento; F. K. Andrade; A. I. S. Brígida; M. F. Borges; A. R. Cassales; C. R. Muniz; M. de S. M. Souza Filho; J. P. S. Moraes; M. de F. Rosa *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2017, 34, 671.
9. J. Pereira, Tese de especialização, Universidade Federal de Lavras, 2006.
10. D. E. Lee; S. Lee; E. S. Jang; H. W. Shin; B. S. Moon; C. H. Lee *Molecules* 2016, 21(6), 773.
11. P. Semjonovs; M. Ruklisha; L. Paegle; M. Saka; R. Treimane; M. Skute; L. Rozenberga; L. Vikele; M. Sabovics; I. Cleenwerck *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 101, 1003.



4º. Encontro Nordeste de Ciência e Tecnologia de Polímeros
27 e 28 de Setembro de 2018, Aracaju SE
Local: Universidade Tiradentes - UNIT