

Avaliação da taxa de acumulação de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia solanacearum* utilizando diferentes fontes de carbono

MATHEUS MARQUES TORRES¹; CAMILA RIOS PIECHA²; MARIANE IGANSI ALVES³; KARINE LASTE MACAGNAN⁴; ANGELITA DA SILVEIRA MOREIRA⁵; PATRÍCIA DIAZ DE OLIVEIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – matheus_mmt@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – camilapiecha@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – marianeigansialves@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – karinemacagnan@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – angelitadasilveiramoreira@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O uso dos plásticos derivados de materiais petroquímicos tem crescido consideravelmente. Esta matriz plástica pode compor inúmeros tipos de produtos, que vão desde materiais cirúrgicos até embalagens descartáveis (COUTINHO, 2014). Apesar dos benefícios que o plástico petroquímico traz, existem também problemas associados com sua utilização, principalmente no momento de descarte. Por ter uma baixa taxa de degradação, os plásticos provenientes desse tipo de matriz podem demorar muito tempo para se degradar no ambiente. Quando o descarte é feito de modo incorreto, ele se acumula em solos e veios d'água, podendo fragmentar-se, mas não se degradar. Mesmo quando o descarte é feito de modo correto, seu acúmulo em aterros sanitários é uma preocupação devido ao seu acúmulo exacerbado (CORDOVA, 2013).

Para contornar esse tipo de problema uma das estratégias é substituir a matriz do plástico por uma que origine plásticos que possuam as mesmas características, mas que tenha um tempo de degradação menor. Dentro dessa temática temos os microrganismos que sintetizam bioplásticos, polímeros derivados de fontes renováveis como óleos, biomassa, amidos e outros. Um dos bioplásticos pesquisados é o poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)], um polímero bacteriano da classe dos polihidroxialcanoatos que possui algumas características físicas similares ao polipropileno, tais como: termoplasticidade, cristalinidade, tensão de cisalhamento, dentre outros (WENG et al., 2013).

O P(3HB) é sintetizado por fermentações submersas e as condições do processo devem ser ajustadas a fim de que a produção seja otimizada. Por ser um polímero de reserva de energia, o qual é biosintetizado sob condições de alta concentração de carbono e baixas concentrações de nutrientes essenciais tais como nitrogênio, fósforo e oxigênio. Com o propósito de gerar o máximo de acúmulo possível e minimizar os gastos com a produção, o tipo de fonte de carbono utilizado deve ser levado em consideração (REDDY et al., 2003).

Diversos tipos de fonte de carbono podem ser utilizados na produção do P(3HB) incluindo açúcares como sacarose, frutose, glicose e glicerol (MACAGNAN, 2014; RAMADAS et al., 2009; LEE et al., 2008). Analisando esse tema, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de P(3HB) por *Ralstonia solanacearum*, utilizando duas fontes de carbono diferentes: sacarose e sucralose.

2. METODOLOGIA

As fermentações submersas utilizando biorreator de bancada foram conduzidas no Laboratório de Biopolímeros utilizando a bactéria *Ralstonia solanacearum* cepa RS, isolada da biodiversidade local. A bactéria foi preservada

por repiques mensais em placas com meio sólido NYA (SCHAAD et al., 2001) e liofilização, mantidas em 4°C e -8°C, respectivamente.

Para a fase de crescimento celular, repiques multiplicativos foram transferidos para Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio YM líquido (JEANES, 1974), incubados em agitador orbital a 32 °C e 150 rpm por 24 horas.

Para a fase de produção de polímero, o inóculo ($DO_{600nm} = 6$) foi transferido para o meio mineral F4, em Erlenmeyers de 500 mL contendo volume final de 200 mL. Dois tipos de meio mineral F4 foram utilizados, o primeiro meio foi acrescido de Sacarose (40 g/L) e o segundo foi acrescido de sucralose (40 g/L) sem alterar o volume final. Os Erlenmeyers, em triplicata para cada tratamento, foram incubados em agitador orbital a 32 °C e 200 rpm por 72 horas. Alíquotas foram retiradas de cada Erlenmeyer nos tempos de 24, 48 e 72 horas para análise de densidade óptica (DO).

Para análise de acúmulo do biopolímero, as alíquotas do caldo fermentado foram centrifugadas a 10000 x g e o pellet ressuspensão em solução salina 0,89% e centrifugado, sendo seco em estufa a 56 °C até peso constante.

Para a extração do biopolímero, a massa celular seca foi ressuspensa em clorofórmio em uma proporção de 1:40 (m/v), e aquecida por 30 min a 58 °C sob agitação. A solução foi transferida para funil de separação, onde o mesmo volume de água destilada, em relação ao clorofórmio, foi adicionado. A fase inferior orgânica foi vertida em placas de Petri semiabertas para lenta evaporação do solvente e formação do filme em capela de exaustão, que após seco, foi analisado quanto a sua massa gravimetricamente.

A análise estatística foi conduzida com o auxílio do programa GraphPad Prism 7.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de densidade óptica e a taxa de acúmulo do polímero obtidas nos dois meios suplementados com fontes de carbono diferentes estão apresentados na figura 1.

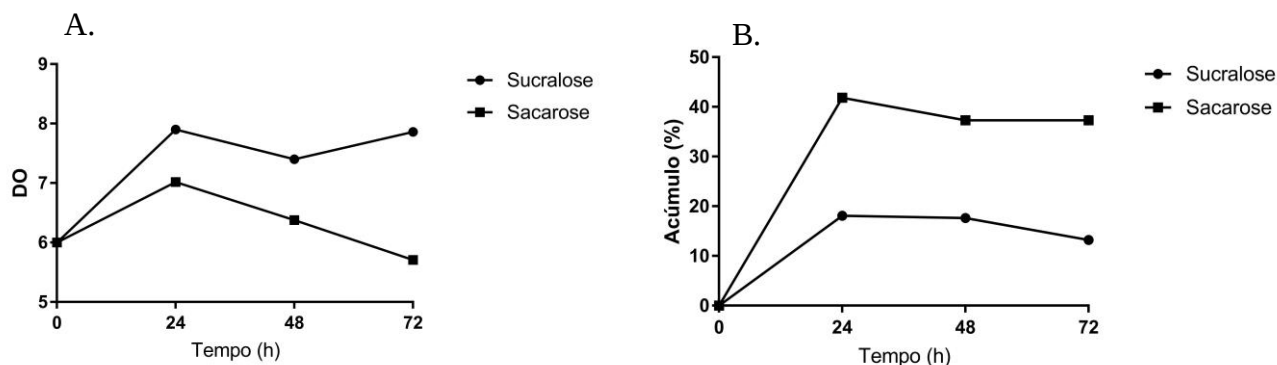


Figura 1. Produção de P(3HB) em meio de cultivo F4 com diferentes fontes de carbono. A) Densidade óptica e B) acúmulo de P(3HB).

Apesar de terem a DO inicial igual, os diferentes tipos de suplementação de açúcar promoveram um crescimento diferenciado do inóculo no meio de produção. O meio suplementado com sucralose obteve as maiores taxas de DO se comparado com o meio suplementado com sacarose, mesmo com a taxa do primeiro tendo um decréscimo em 48 h, todos os valores de DO superam o do segundo. Em 24 h os inóculos atingiram a sua concentração celular máxima, evidenciado pelo pico da figura 1A. Após isso, nenhum valor dentro do mesmo meio suplementado atingiu uma taxa similar.

No entanto, ainda que o meio de produção com sucralose tenha obtido as maiores taxas de DO, o microrganismo *R. solanacearum* não obteve a mesma taxa elevada de acúmulo do polímero neste meio, sendo superado em todos os tempos pelo meio de produção com sacarose. Possivelmente indicando que a sacarose é mais eficientemente convertida pelo microrganismo, que pode ter o metabolismo estimulado para a acumulação do biopolímero do que em multiplicação celular. A figura 1B demonstra que o pico máximo de acumulação intracelular é de 24 h, e após esse tempo a taxa diminui e mantém-se igual até 72 h, o que pode sugerir o consumo do biopolímero pela bactéria. No ponto que representa o tempo inicial, o valor demonstrado é figurativo, uma vez que seja possível que o microrganismo esteja acumulando um percentual de polímero intracelular no inóculo, tendo, portanto, uma taxa de acumulação maior do que 0%. Isto poderia explicar a razão do acúmulo ser mais alto em 24 h, a bactéria conseguiria ter uma taxa de acumulação mais elevada no inóculo do que no meio de produção, e este, funciona apenas como um meio estressante em que *R. solanacearum* consome o polímero acumulado como meio de sobrevivência. Entretanto, o presente estudo não tencionou avaliar a acumulação polimérica no inóculo.

A literatura relata diferentes valores de acúmulo de P(3HB), que variam de acordo com o microrganismo, o meio de cultivo e a concentração da fonte de carbono aplicada. Entretanto, tendo a sacarose como fonte de carbono observa-se para o *Bacillus mycoides* cepa RLJ B-17 o acúmulo de 69,4% (BORAH et al., 2002), para a *Burkholderia sacchari* cepa IPT 189 o acúmulo de 42% (TAN et al., 2011) e para *Bacillus megaterium* cepa BA-019 com adição de sacarose e sulfato de amônia, acúmulo de 28,57% e com sacarose e ureia acúmulo de 30,2% (KANJANACHUMPOL et al., 2013). Os valores determinados no presente estudo foram em torno de 40% nos três tempos avaliados, corroborando com os resultados descritos na literatura. Na revisão bibliográfica apresentada por Alves et al. (2017) que aborda as diferentes fontes de carbono utilizadas em fermentações para a produção do P(3HB), não há relatos de uso da sucralose como fonte de carbono. Entretanto evidencia o uso de glicose, frutose e glicerol, os quais apresentam acúmulos superiores aos determinados nesse estudo para a sucralose, mostrando que esta fonte de carbono não é adequada ao acúmulo de P(3HB), mas sim para a multiplicação celular.

4. CONCLUSÕES

Portanto, de acordo com os resultados obtidos, a sacarose pode ser indicada como potencial fonte de carbono para acumulação de polímero, em comparação com a sucralose. Futuras pesquisas deverão comparar ainda mais fontes de carbono, e também a acumulação de P(3HB) na fase de inóculo. Além disso, poderão também avaliar a produção do polímero, utilizando como fonte de carbono no inóculo a sucralose, visto que esse açúcar obteve valores de DO elevados e poderia elevar o número de células viáveis em um tempo menor.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M.I.; MACAGNAN, K.L.; RODRIGUES, A.A.; ASSIS, D.A.; TORRES, M.M.; OLIVEIRA, P.D.; FURLAN, L.; VENDRUSCOLO, C.T.; MOREIRA, A.S. **Poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB): Review of Production Process Technology.** Industrial Biotechnology, v. 13, n°4, p. 192-208, 2017.

SCHAAD, N. W; JONES, J. B; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.** St. Paul: APS Press, 2001.

JEANES, A. **Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry.** Food Technology, v. 28, p. 34-40, 1974.

MACAGNAN, K. L. **Otimização de metodologia de extração química clássica de Poli(3-hidroxibutirato)** (2014). Dissertação (mestrado em biotecnologia). Curso de Pós-graduação em biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

CORDOVA, L; MEZA, C; GONZALEZ, G; GONZALEZ R. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, 2013, 77-115.

CASARIN, S. A; AGNELLI, J. A. M; MALMONGE, S. M; ROSÁRIO, F. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, vol.23, n.1, p.115-122, 2013.

ARAÚJO, R. DE J.; CONCEIÇÃO, I. D. DA; CARVALHO, L. H. DE; ALVES, T. S.; BARBOSA, R. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, vol.25, n.5, p.483-491, 2015.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R; KALIA, V. C. **Polyhydroxyalkanoates: an overview.** Bioresource Technology, v. 87, p. 137-146. 2003.

B C COUTINHO, G B MIRANDA, G R SAMPAIO, L B S DE SOUZA, W J SANTANA, H D M COUTINHO **A importância e as vantagens do polihidroxibutirato (plástico biodegradável).** [2004]. 06 p. Pesquisa (Biodegradação)- Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte, Juazeiro do Norte, BR, 2005.

WENG, Yun-Xuan; WANG Lei; ZHANG Min; WANG Xiu-Li; WANG Yu-Zhong, 2013. **Biodegradation behavior of P(3HB,4HB)/PLA blends in real soil environment.** Polymer Testing, no. 32, pp. 60-70.

RAMADAS NH, SINGH SK, SOCCOL CR, PANDEY A. **Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by Bacillus sphaericus NCIM 5149.** Brazilian Arch Biol Technol 2009;1(52):17–23.

LEE WH, LOO CY, NOMURA CT, SUDESH K. **Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors.** Bioresour Technol 2008;15(99):6844–6851.

BORAH B, THAKUR PS, NIGAM JN. **The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in Bacillus mycoides RLJ B-017.** J App Microbiol 2002;4(92):776–783.

TAN D, XUE Y S, AIBAUDULA G, CHEN GQ. **Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by Halamonas TD01.** Bioresour Technol 2011;17(102):8130–8136.

KANJANACHUMPOL P, KULPREECHA S, TOLIENG V, THONGCHUL N. **Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of Bacillus megaterium BA-019.** Bioprocess Biosyst Eng 2013;10(36): 1463–1474.