

PRODUÇÃO DE BIOMASSA POR *Ralstonia solanacearum* EM BIORREATOR DE BANCADA SOB DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO VISANDO ACÚMULO DE P(3HB)

Mariane Igansi Alves¹; Karine Laste Macagnan²; Amanda Ávila Rodrigues²; Matheus Marques Torres²; Patrícia Diaz de Oliveira²; Angelita da Silveira Moreira³

¹PPGCTA- Universidade Federal de Pelotas – marianeigansialves@hotmail.com

²CDTec- Universidade Federal de Pelotas – karinemacagnan@hotmail.com;
amanda.bio2005@gmail.com; matheus_mmt@hotmail.com; bilicadiaz@yahoo.com.br

³CCQFA- Universidade Federal de Pelotas – angelitadasilveiramoreira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O consumo de plásticos não biodegradáveis *per capita* mundial no ano de 2015 foi de 45Kg/habitante, e o Brasil superou a média, com 46Kg/habitante. O consumo brasileiro ainda pode ser considerado modesto em comparação ao consumo dos países desenvolvidos, já que em 2005 o consumo local era de cerca de 25% do consumo *per capita* dos habitantes do Nafta (Estados Unidos, Canadá e México) e da Europa, a perspectiva de crescimento no seu consumo entre 2005 e 2015, de 100%, é igualada apenas àquela da Europa Oriental, ainda em processo de industrialização; e mesmo após esse crescimento ocorrer, o consumo per capita brasileiro deverá alcançar apenas 33% do consumo nos países desenvolvidos (BRASIL, 2016). Mas esses dados não são alentadores, pois demonstram que o país ainda encontra-se em fase de crescimento desse nocivo consumo, enquanto é grande produtor dos principais recursos renováveis utilizados na produção de plásticos biodegradáveis ambientalmente amigáveis. Nesse cenário, a produção e utilização de biopolímeros está se tornando cada vez mais interessante como alternativa à substituição de plásticos convencionais não biodegradáveis e poluentes, devido a sua principal característica - a biodegradabilidade - e os produtos que a reação de degradação gera - água (H₂O) e gás carbônico (CO₂) (LUVIZETTO, 2007). A rápida degradação, através da ação enzimática microbiana sob condições ambientais favoráveis, e as características de termoplaticidade e biocompatibilidade fazem com que os bioplásticos tipo polihidroxialcanoatos sejam cada vez mais estudados (PIEMOLINI, 2004).

PHAs são bioplásticos tipo poliésteres produzidos a partir de fontes renováveis e acumulados no citoplasma bacteriano como material de reserva de energia e carbono, são termoplásticos e atóxicos (PIEMOLINI, 2004). Dentre os PHAs, o Poli(3-hidroxibutirato) ou P(3HB) é o mais estudado. Apresenta, em alguns aspectos, propriedades e características semelhantes àsquelas do polipropileno: termoplástico insolúvel em água com temperatura de fusão semelhante, normalmente altamente cristalino e com elevado grau de polimerização (GOMES; BUENO NETTO, 1997).

A produção de P(3HB) ocorre da seguinte forma: primeiramente há uma fase de crescimento em condições não limitantes, com o objetivo de crescimento celular, seguida da produção do polímero e seu acúmulo, que ocorre somente em condições de limitação de algum nutriente essencial como P, Fe, Mg, N, ou mesmo O, com excesso de C (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005). Nessas condições, o microrganismo cresce e multiplica-se rapidamente até o consumo total de carbono inicial e esgotamento dos nutrientes essenciais; na ausência de um destes, o crescimento celular é limitado e o carbono que foi adicionado será convertido em PHA (CALVÃO, 2009). Dado que a síntese de P(3HB) é conhecida

por ser favorecida por estresses ambientais, principalmente limitação de nutrientes (BRAUNEGG et al., 1998), tal estratégia vem sendo amplamente utilizada. Entretanto, outros fatores corroboram para um processo mais eficiente de conversão de substrato em produto, como temperatura e pH. O uso de meios alternativos, como resíduos da agroindústria tem sido bastante pesquisado como forma de baratear o custo de produção.

Ralstonia solanacearum é um bacilo Gram-negativo amplamente distribuído em nossa região, naturalmente habitante do solo e da água. Favoravelmente, é aeróbico e não formador de esporos, e os isolados virulentos são aflagelados e imóveis, enquanto os avirulentos têm alta motilidade, possuindo de 1 a 4 flagelos. É tolerante a sais e cresce em ampla faixa de temperatura, de 25 a 35 °C, de acordo com o isolado, e acumula P(3HB) como reserva de carbono e energia (MEHAN et al., 1994).

Com isso, o objetivo do trabalho foi dar continuidade à pesquisa, estudando a influência do meio de cultivo para a produção do P(3HB) avaliando sua biomassa celular seca (BCS) em biorreator de bancada.

2. METODOLOGIA

Foi utilizado a linhagem *Ralstonia solanacearum*, RS pertencente à coleção de culturas de microrganismos do laboratório de Biopolímeros da unidade de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas.

A linhagem RS foi primeiramente incubada a 32 °C, durante 24 h, em meio sólido *Nutritive Yeast Agar* (AYN) (extrato de levedura: 3g/L; extrato de malte: 3g/L; glicose: 10g/L; peptona: 5g/L) (PAGGE, 1982). Depois, as células foram suspensas em meio líquido YM (10mL) (JEANS, 1974). Após, porções de 200mL da suspensão bacteriana foram colocados em frascos de *Erlenmeyers* de 500mL. As condições de incubação foram 32 °C, 150rpm durante 24h. Para a fase de produção de 8L, foi utilizado o biorreator de bancada (BIOSTAT®B), 1vvm, pH 7, 250rpm, até 72hs contendo o meio líquido de produção F4 (ureia: 3g/L; ácido cítrico: 0,36g/L; citrato de sódio 4g/L; glicose: 40g/L) (OLIVEIRA, 2010) e meio alternativo produzido a partir de resíduo da industrialização do arroz, rico em fósforo (RODRIGUES, 2016; dados não publicados). Para a determinação da biomassa celular seca (BCS), os cultivos foram transferidos para tubos Falcon e submetidos a centrifugação em centrífuga Kendro®, modelo Sorvall RC- 6, a 10000g por 15min a 4 °C. O sobrenadante foi separado e o *pellet* ou biomassa seca em estufa à temperatura de 56 °C por 48h (MACAGNAN, 2014).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos de BCS para produção do bioplástico em meios de cultivo diferentes, pode ser apresentado na Tab. 1.

Tabela 1. Biomassa celular seca (BCS) de *Ralstonia solanacearum* obtida em biorreator com diferentes meios de produção, a 32°C, 1vvm e 250rpm.

Meio de cultivo	BCS (g/L)
Alternativo	4,3
F4	1,15

Pode-se observar, pela Tab. 1, que o meio alternativo a partir do resíduo industrial apresentou resultado favorável para a produção do bioplástico apresentando uma BCS superior ao resultado com meio de cultivo F4.

Kulpreecha e colaboradores (2009) avaliaram o efeito do pH (6,0; 7,0 e 8,0) e da concentração de oxigênio dissolvido (OD) (40, 60 e 80% de saturação) no meio de cultivo para fermentação em batelada de *Bacillus megaterium* BA-019. Para o rendimento de biomassa o melhor resultado (9,7g/L) foi obtido na fermentação sem controle de pH e com nível de OD saturado de 60%, porém não diferiu estatisticamente do resultado obtido com pH 8,0 e saturação de 80% (9,5g/L). Considerando o rendimento de P(3HB) acumulado na célula, a combinação de pH 7,0 e saturação de 60% permitiu acúmulo de 61,6% em relação a massa celular seca.

Martínez et al. (2004) avaliaram o efeito do pH (6,0; 6,8 e 7,4), da agitação (300 e 700rpm) e da aeração (0,25 e 1vvm) para o microrganismo *Azospirillum brasilense* cepa 7 utilizando extrato de tomate como fonte de carbono. Obtiveram o rendimento máximo de biomassa de 1,67g/L e P(3HB) de 0,16g/L, em pH de 6,8. Agitação de 500rpm e aeração de 0,5vvm se mostrou a melhor combinação para biomassa (1,2g/L), porém para obter maior rendimento de P(3HB) (4,9g/L) o cultivo foi mantido em maior agitação (700rpm) e menor aeração (0,25vvm).

Ramadas e colaboradores (2009), além de testar diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono, testaram diferentes valores de pH (5,0 a 8,0) para o cultivo da linhagem *Bacillus sphaericus* 5149. A alteração inicial do pH no meio de cultivo mostrou uma forte influência sobre a produção de P(3HB). Mesmo uma pequena diferença de pH do ponto ideal causou uma redução brusca no acúmulo. Nesse trabalho, o meio com pH inicial de 7,5 resultou no aumento máximo de P(3HB) de 25%.

A produção do Biopolímero do tipo Poli(3-hidroxibutirato) por microrganismo recombinante em substrato de baixo custo, analisando as possíveis alterações em parâmetros físico- químicos apresentado por Arruda (2003), resultou em uma massa celular seca de 2,67g/L para o meio mineral e 2,23g/L para o meio complexo concluindo que é possível produzir um polímero com características similares a dos polímeros comerciais utilizando um substrato de baixo custo.

4. CONCLUSÕES

O uso do meio de cultivo alternativo influencia positivamente no rendimento da biomassa celular seca e, possivelmente, no acúmulo de PHB.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRUDA, J. C. de; **Produção do Biopolímero do tipo Poli(3-hidroxibutirato) por microrganismo recombinante em substrato de baixo custo: análise de possíveis alterações em parâmetros físico- químicos**; Monografia (Conclusão do curso); Química; UFSC; Centro de Ciências Físicas e Matemáticas- 34f- Florianópolis, 2003.
- BRASIL. BNDES. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. Disponível em: http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3804.pdf, acesso em 30/07/2016.
- BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. **J. Biotechnol.**, n. 65, p. 127-161, 1998.
- CALVÃO, P. S. **Obtenção e caracterização de misturas do polímero degradável P[3HB] e seu copolímero P[3HB-co-3HV] com elastômeros.**

Tese(Doutorado em Engenharia). Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo-150f-, São Paulo, 2009.

GOMES, J.G.C.; BUENO NETTO, C.L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Rev. Brasil. de Eng. Quím.**, v. 17, p. 24-29, 1997.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607-619, 2005.

JEANS, A. Extracellular microbial polysaccharides- New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, p. 34-40, 1975.

KULPRECHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N.; Inexpensive fed-batch cultivation for high for poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 3, p. 240-245, 2009.

LUVIZETTO, D. J. **Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero Poli(3-hidroxibutirato) e modelagem matemática do bioprocesso**. Dissertação (Mestrado em Engenharia). PPEQ. UFRGS-119f.-, Porto Alegre, 2007.

MACAGNAN, K. L. **Otimização de metodologia de extração química clássica de poli(3-hidroxibutirato) sintetizado por *Ralstonia solanacearum***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). PPGB. UFPel, Pelotas. 69f. 2014.

MARTÍNEZ, J.; RODRÍGUEZ, M.; FERNÁNDEZ, A. L.; VILLAVERDE, M. J.; LÓPEZ, A.; MARÍN, D.; NÚÑEZ, R.; GALEGO, N.; CARBALLO, E. M.; Producción de polihidroxialcanoatos em bacterias diazotrofas. I. Influencia de la aeración em la síntesis de poli B hidroxibutirato em *Azospirillum brasilense* Cepa 7. **Revista Biología**, v.18, n.1, p.87-95, 2004.

MEHAN, V.K.; LIAO, B.S.; TAN, Y.J.; ROBINSON-SMITH, A.; McDONALD, D. & HAYWARD, A.C. Bacterial wilt of Groundnut. Patancheru: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. *Information Bulletin*, v. 35, p. 28, 1994.

OLIVEIRA, C. **Produção de polihidroxibutirato: bioprospecção de *Beijerinckia* sp. da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CDTec - UFPel**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). PPGB. UFPel-96f.-, Pelotas, 2010.

PIEMOLINI, L. T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *C. violaceum* para estudos de mutação sítio-dirigida**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química e de Alimentos. UFSC-91f.-, Santa Catarina, 2004.

RAMADAS, N. H.; SINGH, S. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 52, n. 1, p. 17-23, 2009.