

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NO CRESCIMENTO BACTERIANO VISANDO OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)

MATHEUS MARQUES TORRES¹; CAMILA RIOS PIECHA²; MARIANE IGANSI ALVES³; KARINE LASTE MACAGNAN⁴; PATRÍCIA DIAZ DE OLIVEIRA⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – matheus_mmt@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – camilapiecha@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – marianeigansialves@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – karinemacagnan@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O uso de materiais plásticos derivados de produtos petroquímicos tem crescido consideravelmente. Devido as suas características de durabilidade, 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 problemas associados com sua utilização, principalmente no momento do descarte. Por possuírem uma taxa de degradação lenta, se comparado com outros materiais, esses plásticos podem levar anos para degradar-se completamente no ambiente. Quando o descarte é realizado de modo incorreto, este se acumula em solos e veios d'água, mesmo quando o descarte é correto, seu acúmulo em aterros sanitários ainda é uma preocupação (CORDOVA, 2013).

Para contornar esse tipo de problema uma das estratégias é substituir o plástico de origem petroquímica por um material que possua as mesmas características, mas que seja biodegradável. Uma das alternativas de substituição são os bioplásticos, polímeros derivados de fontes renováveis como óleos, biomassa, amidos e outros produtos (RAZA et al. 2018). Um dos bioplásticos mais pesquisados atualmente é o poli(3-hidroxibutirato)[P(3HB)], um polímero bacteriano da classe dos polihidroxialcanoatos que possui características físicas similares ao polipropileno, tais como termoplasticidade, cristalinidade, tensão de cisalhamento, dentre outros (WENG et al., 2013).

O P(3HB) é produzido por fermentação submersa e os parâmetros de cultivo devem ser otimizados para maior produtividade do bioplástico. Por ser um polímero de reserva de energia, é sintetizado sob condições de alta concentração de carbono e concentrações limitantes de sais essenciais para o microrganismo. 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 fermentação, de acordo com a literatura, incluindo açúcares como frutose e sacarose (MACAGNAN, 2014, ALTAEE et al., 2016; ALVES et al., 2017). Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de P(3HB) por *Ralstonia solanacearum* cepa RS e *Cupriavidus Necator* ATCC 17699, utilizando três fontes de carbono diferentes.

2. METODOLOGIA

As fermentações submersas utilizando agitador orbital (CERTOMAT BS-1, Germany) foram conduzidas no Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos

utilizando as bactérias *Ralstonia solanacearum* cepa RS e *Cupriavidus necator* ATCC 17699.

Para a fase de crescimento celular, repiques multiplicativos foram transferidos para Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio YM líquido modificado (Jeanes, 1974) composto de 2,7 g.L⁻¹ de extrato de levedura (Kasvi®), 2,7 g.L⁻¹ de extrato de malte (Kasvi®), 4,5 g.L⁻¹ de peptona (Kasvi®) e 35 g.L⁻¹ de diferentes fontes de carbono separadamente nos seguintes tratamentos: T1 – sacarose; T2 – lactose; e T3 - sucralose. Os Erlenmeyers foram então incubados em agitador orbital a 32 °C e 150 rpm por 24 horas.

Alíquotas em triplicata foram retiradas de cada Erlenmeyer no final das 24 horas para análise de densidade óptica (DO_{600 nm}). Para análise de massa celular seca, as alíquotas foram centrifugadas a 10.000 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 P(3HB), 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, que após seco, foi analisado quanto a sua massa gravimetricamente (MACAGNAN, 2017).

A concentração das fontes de carbono residuais após a fermentação foi determinada por DNS, para isso foi adicionado 0,75 mL do reagente DNS a 0,25 mL de cada amostra previamente diluída. A mistura foi mantida em banho-maria a 100 °C por 5 minutos e resfriada até temperatura ambiente. Após, 4 mL de água destilada foram adicionados e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm. Para o cálculo da concentração foram elaboradas curvas padrão para cada um dos açúcares utilizados, com soluções variando de 0,1 a 1 g.L⁻¹, seguindo o mesmo procedimento utilizado para as amostras.

Todas as médias foram calculadas a partir das triplicatas de cada tratamento e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5% usando o programa *Statistix* 8.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a fonte de carbono que promoveu maior crescimento microbiano, expresso pela DO_{600nm}, para bactéria *C. necator* foi a sucralose, enquanto que para a cepa de *R. solanacearum* foi a sacarose de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Valores de medição de DO utilizando diferentes tipos de fonte de carbono nos microrganismos

| | DO (600nm) | | |
|------------------------|------------|-----------|-----------|
| | Sacarose | Lactose | Sucralose |
| <i>R. solanacearum</i> | 10,28±0,4 | 9,33±0,5 | 6,26±0,1 |
| <i>C. necator</i> | 5,66±0,1 | 5,09±0,02 | 6,1±0,2 |

Os resultados de massa celular seca (Tabela 2) foram congruentes com os resultados da DO_{600nm} para a bactéria *C. necator* uma vez que se obteve o maior

resultado com a sucralose (2,3 g/L) e para a cepa de *R. solanacearum* RS, o maior valor obtido foi com sacarose, sendo 2,1 g/L.

Tabela 2: Valores de massa celular seca utilizando diferentes tipos de fonte de carbono nos microrganismos

| Massa Celular Seca (g/L) | | | |
|--------------------------|----------|----------|-----------|
| | Sacarose | Lactose | Sucralose |
| <i>R. solanacearum</i> | 2,1±0,05 | 1,9±0,08 | 1,6±0,1 |
| <i>C. necator</i> | 2±0,1 | 1,8±0,1 | 2,3±0,1 |

Na produção do polímero, como já estabelecido na literatura, a bactéria *C. necator*, pertencente ao grupo de microrganismos que apenas produz polímero na fase de produção, não produziu quantidades significativas de P(3HB) na fase de inóculo. Enquanto isso, o microrganismo *R. solanacearum* produziu P(3HB) em maior quantidade no tratamento utilizando sacarose, tendo um rendimento de 37%, valor aproximado com o mencionado na literatura (MACAGNAN et al., 2017).

A análise de DNS corroborou com os dados anteriores, tendo as mesmas taxas de consumo de açúcar pelo microrganismo proporcionais à taxa de crescimento, como demonstrado na Tabela 3. Diversos resultados foram relatados em relação ao tipo de açúcar utilizado para os gêneros de bactéria *Ralstonia* e *Cupriavidus*, como por exemplo: frutose, sacarose e glicerol (BARBOSA et al., 2005, KANJANACHUMPOL et al., 2013 e KULPREECHA et al., 2009), no entanto, não são relatadas as taxas de crescimento do microrganismo na fase de inóculo, e portanto, não é possível comparar com a literatura os valores encontrados no presente trabalho.

Tabela 3: Valores do consumo total de açúcar contido no meio, pelos microrganismos utilizados

| Consumo de açúcar total do meio (g/L) | | | |
|---------------------------------------|----------|----------|-----------|
| | Sacarose | Lactose | Sucralose |
| <i>R. solanacearum</i> | 20,6±0,9 | 17,5±0,6 | 20,4±0,7 |
| <i>C. necator</i> | 18,7±0,3 | 18,8±0,7 | 21,8±0,7 |

4. CONCLUSÕES

Portanto, de acordo com os resultados obtidos, a sucralose pode ser indicada para substituir a fonte de carbono utilizada em meios de crescimento para a fermentação da bactéria *Cupriavidus necator*, enquanto que para a *Ralstonia solanacearum*, a fonte de carbono mais indicada foi a sacarose. Futuras pesquisas deverão comparar ainda mais fontes de carbono, e ajustar outras variáveis do meio, como pH e balanço da razão carbono/nitrogênio.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

COUTINHO, B.C et al. 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.

Macagnan K, Rodrigues A, Alves M, Furlan L, Kesserlingh S, Moura A et al. Simplified recovery process of *Ralstonia solanacearum*-synthesized polyhydroxyalkanoates via chemical extraction complemented by liquid-liquid phase separation. **Quím Nova**. 2017.

Raza Z, Abid S, Banat I. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. **Int Biodeterior Biodegradation**. 2018;126:45-56.

Altaee N, El-Hiti G, Fahdil A, Sudesh K, Yousif E. Biodegradation of different formulations of polyhydroxybutyrate films in soil. **Springerplus**. 2016;5(1).

Alves M, Macagnan K, Rodrigues A, de Assis D, Torres M, de Oliveira P et al. Poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB): Review of Production Process Technology. **Ind Biotechnol**. 2017;13(4):192-208.

Barbosa M, Espinosa AH, Malagón DR, Moreno NS. Producción de poli-β-hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. *Universitas Scientiarum*. 2005; 10(1): 45–54.

Kanjanachumpol P, Kulpreecha S, Tolieng V, Thongchul N. Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. **Bioprocess Biosystems Engineering**. 2013; 36(10): 1463–1474.

Kulpreecha S, Boonruangthavorn A, Meksiriporn B, Thongchul N. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 2009; 107(3): 240–245.

Macagnan, K. L., Alves, M. I., Rodrigues, A. Á., Furlan, L., da Silva Rodrigues, R., Diaz de Oliveira, P., ... da Silveira Moreira, A. (2017). Complete factorial design to adjust pH and sugar concentrations in the inoculum phase of *Ralstonia solanacearum* to optimize P(3HB) production. **PLOS ONE**, 12(7), e0180563.