

PRODUÇÃO DE PHB EM MICRO-ESCALA POR *Pseudomonas* DEGRADADORA DE AGROTÓXICO: INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO

SANTOS, Bruna Coi¹; CROCHEMORE, Ane Gerber²; MATTOS, Maria Laura Turino³; PERALBA, Maria do Carmo Ruaro⁴, MOREIRA, Angelita da Silveira⁵; VENDRUSCULO, Claire Tondo⁶

¹Acadêmica em Biotecnologia – CDTec – UFPEl; ²Doutoranda PPG em Biotecnologia – CDTec – UFPEl; ³Pesquisadora Embrapa Clima Temperado – Pelotas; ⁴Instituto de Química – UFRGS – Porto Alegre; ⁵Professora do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA) e do PPG em Ciência e Tecnologia Agroindustrial (PPGCTA); ⁶Professora do CCQFA, do PPGCTA e do PPGB/CDTec. claire.vendruscolo@pq.cnpq.br ou bruna_coi@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos têm papel fundamental na sociedade, com diversas finalidades e amplo mercado, constantemente em crescimento. Grandes problemas ambientais surgiram devido ao uso excessivo de plásticos derivados do petróleo, principalmente devido sua rápida descartabilidade e lenta degradação, afetando a qualidade de vida da população atual. A reciclagem e a incineração do plástico são alternativas para tais problemas, porém a quantidade de material plástico reciclado é ineficiente em relação ao seu consumo, impossibilitando a recuperação de energia, liberando gás carbônico e outras substâncias nocivas à atmosfera (TORIKAI, 1999).

Frente a tais problemas, os plásticos biodegradáveis produzidos com biopolímeros bacterianos tornam-se uma alternativa viável para contornar essa situação ambiental, podendo assim resolver ou minimizar os problemas gerados pelos plásticos derivados de petróleo.

Poli-hidroxicarboxilatos (PHAs) são uma grande família de poliésteres, intracelulares, acumulados na forma de grânulos por diversas bactérias a partir de substratos de fontes renováveis, que são totalmente biodegradáveis em ambiente microbiologicamente ativo (HOLMES, 1985). O poli-hidroxi-butarato (PHB) é o polímero bacteriano mais estudado dessa família de poliésteres (SALEHIZADEH; van LOOSDRECHT, 2004 *apud* CHAKRABARTI et al; 2007). Levando em consideração a semelhança das propriedades físicas do PHB às do polipropileno, como cristalinidade e ponto de fusão em torno de 180°C, a aplicação dos plásticos biodegradáveis pode ser tão ampla quanto a dos petroquímicos (HOLMES, 1985).

Diversos microrganismos acumulam PHB, entretanto são poucos os que o produzem em quantidades suficientes para serem utilizados em processos industriais (LEE, 1996). Com isso, a seleção de microrganismos, com capacidade de crescerem e acumularem elevados níveis do polímero utilizando substratos renováveis e econômicos e a otimização do processo ainda é importante.

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência da fonte de carbono do meio de cultura na multiplicação celular e na produção, em micro-escala, de PHB por *Pseudomonas* degradadora de carbofurano, através da determinação da Massa Celular Seca e da produção de PHB. Visto que, devido o PHB ser um biopolímero intracelular, é necessário o estabelecimento de condições operacionais que privilegiem em uma primeira fase a maior multiplicação de células possível. Posteriormente, faz-se a otimização das condições de cultivo da fase de produção do polímero, propriamente dita.

2 METODOLOGIA

2.1 Condução dos processos fermentativos

Foi utilizado o acesso CMM43 de *Pseudomonas* sp., com base em trabalhos prévios realizados com os acessos da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Clima Temperado, caracterizado como PHA positivo por Crochemore (2010). O microrganismo foi cultivado em meio Agar Nutritivo (AN), contendo peptona, 5,0; glicose, 5,0; extrato de levedura, 1,0; extrato de carne, 3,0 e agar, 15,0 (g.L^{-1}), a 28°C por 18h. O inóculo foi preparado a partir de suspensão de colônias bacterianas, crescidas em meio sólido, em *Erlenmeyers* de 250mL contendo 50mL de caldo suplementado com sacarose ou glicose, em pH 5,5, em agitador orbital a 28°C, 150rpm por 24h, em triplicata. Ao final do processo foram separadas amostras para determinação da Massa Celular Seca (MCS), por gravimetria e para quantificação da produção de PHB através de Cromatografia Gasosa.

2.2 Determinação da Massa Celular Seca (MCS)

Amostras de 25mL de caldo fermentado foram centrifugadas a 6000xg, o *pellet* ressuspenso com solução salina 0,89% e as células centrifugadas novamente em mesma condição. O sobrenadante foi descartado e as células secas em estufa a 56°C até peso constante. A MCS foi expressa em g.L^{-1} .

2.3 Determinação da produção de PHB

A produção de PHB foi determinada por Cromatografia Gasosa. Amostras foram preparadas por metanólise, segundo metodologia de Braunegg et al. (1978) modificada por Brandl et al. (1988). Alíquotas de 10mg de MCS, obtidas conforme item 2.2, foram transferidas para tubos de ensaio com vedação e adicionadas de 2mL de metanol acidificado 15% (H_2SO_4), contendo ácido benzóico $0,4\text{g.L}^{-1}$, e 2mL de clorofórmio. Os tubos foram agitados e aquecidos em banho-maria a 100°C por 140min. Os tubos foram transferidos para banho de gelo, adicionados de 1mL de água destilada e agitados em agitador de tubos por 10s. Após decantação dos restos celulares e formação das fases, a fase inferior, com o éster solubilizado no clorofórmio, foi transferida para *vials* e as amostras armazenadas sob refrigeração e enviadas para análise por Cromatografia Gasosa, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2.4 Análise estatística

Os resultados obtidos, com base em três repetições, foram tratados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A habilidade da célula em utilizar fontes de carbono econômicas, juntamente com elevadas taxas de crescimento e de síntese do polímero são fatores importantes a se considerar na seleção de microrganismos para a produção de PHAs (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005). Os resultados dispostos na Tab. 1 demonstram que o acesso CMM43 multiplica-se eficientemente, e acumula PHB com as duas fontes de carbono estudadas. Os maiores resultados de MCS obtidos neste estudo foram em cultivo suplementado com glicose, mesma condição que resultou em menor acúmulo de PHB. Khanna e Srivastava (2005) e Crochemore (2010) relatam sobre a dificuldade de diversos microrganismos em converter carboidratos como fonte de carbono, principalmente a sacarose, em PHB, o que demonstra a relevância dos resultados.

Tabela 1. Resultados de MCS (g.L^{-1}), PHB (%) em cultivos suplementados com sacarose ou glicose.

Suplementação	MCS 24h (g.L^{-1})	PHB % 24h
+ SACAROSE	6,12 ^b	35,5 ^a
+ GLICOSE	7,28 ^a	23,5 ^b

* Letras distintas na mesma coluna representam diferença estatística das médias analisadas por Tukey $\alpha = 0,05$.

Na fase de multiplicação celular é desejável que se obtenha grande geração de biomassa bacteriana, com pouco acúmulo de polímero, síntese que ocorre geralmente em uma segunda fase de cultivo, com limitação de um nutriente essencial ao crescimento celular e excesso da fonte de carbono, favorecendo a produção de PHB (FORMOLO et al., 2003). Em condições de excesso de carbono, o crescimento celular torna-se normalmente desequilibrado, sendo o substrato convertido em polímero intracelular, desfavorecendo a multiplicação celular (BECCARI et al., 1998). Sabe-se que a produção de PHB é parcialmente dependente da quantidade de células, pois a produção e acúmulo do polímero são intracelulares, como pode ser observado no trabalho de Oliveira (2010), onde cultivos com resultados semelhantes de MCS tiveram resultados diferenciados para percentual de PHB, conforme o meio utilizado.

Considerando os valores de porcentagem de PHB obtido no cultivo suplementado com sacarose, fonte de carbono econômica no Brasil, e o respectivo valor de massa celular seca, entende-se que o acesso CMM43 de *Pseudomonas* é promissor para aplicação em estudos que visem a fase de produção suplementada com sacarose. As condições utilizadas parecem ter direcionado a uma produção precoce de PHB, o que pode acarretar na degradação deste polímero também em curto tempo. Entretanto, a multiplicação celular foi elevada e ajustes nas condições operacionais podem direcionar uma alta produção de polímero para a fase de acúmulo de PHB, principalmente quando suplementado com sacarose.

4 CONCLUSÃO

Através das análises realizadas conclui-se que o acesso CMM43 de *Pseudomonas*, nas condições e tempo utilizados, resulta em maior concentração de massa celular quando crescido em meio suplementado com glicose, possibilitando o

que é esperado conforme a literatura, alta multiplicação celular e menor produção de PHB, para a fase de multiplicação celular. Entretanto, a utilização de sacarose também mostrou-se viável.

5 REFERÊNCIAS

BECCARI, M., MAJONE, M., MASSANISSO, P., RAMADORI, R., 1998. A bulking sludge with high storage response selected under intermittent feeding. **Water Research**, v. 32 p. 3403-3413.

BRANDL, H., GROSS, R. A., LENZ, R. W., FULLER R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly(β -Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1977-1982, 1988.

BRAUNEGG, G., SONNLEITNER, B., LAFFERTY, R.M. A rapid gas chromatographic method for determination of Poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p. 29-37, 1978.

CROCHEMORE, A. **Bioprospecção de espécies de *Pseudomonas* isoladas de solo de várzea subtropical do RS para produção de polihidroxibutirato**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

CHARKABARTI, T., MUDLIAR, S.N., KUMAR, M.S., KHARDENAVIS, A.A. Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, polyhydroxybutyrate. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3579-3584, 2007.

FORMOLO, M.C.; SCHNEIDER A.L.; DUARTE, M.A.T.; PEZZIN, A.P.T. Polihidroxialcanoatos: biopolímeros produzidos a partir de fontes renováveis, **Revista Saúde e Meio Ambiente**. n. 2, v. 4, p. 14-21, 2003.

HOLMES, P. A. Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physical Technology**, Vol. 16, p. 32-36, 1985.

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

LEE, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 1-14, 1996.

OLIVEIRA, C. **Produção de polihidroxibutirato: bioprospecção de *Beijerinckia* sp. da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CDTec - UFPEl**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

TORIKAI, A., HASEGAWA, H. Accelerated photodegradation of poly(vinyl chloride). **Polymer Degradation and Stability**. V. 63. p. 441-445, 1999.