

Produção de exopolissacarídeos (EPS) por *Paenibacillus sp.* visando aplicação biotecnológica

Production of exopolysaccharides (EPS) by *Paenibacillus sp.* for biotechnological application

Diogo Simas Bernardes Dias
Bolsista PCI, Eng. Químico, D.Sc.

Cláudia Duarte da Cunha
Supervisora, Eng. Química, D.Sc.

Resumo

Um dos problemas ecológicos mais graves atualmente está associado à atividade extrativa mineral devido à poluição ambiental produzida no decorrer do tempo após a deposição de rejeitos de processamento de minério e rochas residuais. Uma nova abordagem visa à utilização de métodos baseados na química verde, com uma visão biotecnológica, para aplicações na remediação, recuperação ou redução da toxicidade destes ambientes. Alguns mecanismos promissores de imobilização envolvem o uso de microrganismos, ou de seus metabólitos através da bioadsorção, sendo ligados a peptídeos, proteínas, polissacarídeos e outras biomoléculas. *Paenibacillus polymyxa* tem recebido grande atenção para produção de Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPS) por possuir várias características que são adequadas às necessidades industriais. O presente trabalho visa avaliar a produção EPS por uma estirpe de *P. polymyxa* a partir de diferentes fontes de carbono (frutose, galactose, glicose, glicerol e sacarose) e avaliar a construção da isoterma de adsorção de níquel. Em todos os casos ocorreram a produção de EPS, sendo a maior produção de 48 g/L utilizando a sacarose como fonte de carbono. O maior crescimento celular foi com o uso de frutose e galactose obtendo-se 1,39 e 1,24 g/L, respectivamente. A Isoterma de adsorção de níquel apresentou valores de $q_{m\acute{a}x}$ de 316 mg/g e constante b de 0,00054. A partir de todas as fontes de carbono foi possível produzir EPS demonstrando assim a versatilidade do *P. polymyxa*. Os valores de $q_{m\acute{a}x}$ estão acima dos citados na literatura indicando alto potencial para utilização da EPS na bioadsorção.

Palavras chave: *Paenibacillus polymyxa*; Isoterma de níquel; Biobeneficiamento; Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPS).

Abstract

One of the most serious ecological problems currently is associated with mineral extraction activity due to environmental pollution produced in the course of time after the deposition of processing rejects from ore and waste rock. A new approach aims at using methods based on green chemistry, with a biotechnological view, for applications in remediation, recovery or reduction of toxicity of these environments. Some promising mechanisms of immobilization involve the use of microorganisms, or their metabolites through biosorption, being linked to peptides, proteins, polysaccharides and other biomolecules. *Paenibacillus polymyxa* has received great attention

for the production of Extracellular Polymeric Substances (EPS) because it has several characteristics that are suitable for industrial needs. The present work aims to evaluate the EPS production by a *P. polymyxa* strain from different carbon sources (fructose, galactose, glucose, glycerol and sucrose) and to evaluate the construction of the nickel adsorption isotherm. In all cases EPS production occurred, being the highest production of 48 g/L using sucrose as carbon source. The highest cell growth was with the use of fructose and galactose obtaining 1.39 and 1.24 g/L, respectively. The nickel adsorption isotherm presented values of q_{max} of 316 mg/g and constant b of 0.00054. From all carbon sources it was possible to produce EPS thus demonstrating the versatility of *P. polymyxa*. The q_{max} values are above those quoted in the literature indicating a high potential for using EPS in biosorption.

Key words: *Paenibacillus polymyxa*; Nickel isotherm; Bio-beneficiation; Extracellular Polymeric Substances (EPS)

1. Introdução

A indústria extrativa mineral tem um papel estratégico no desenvolvimento econômico de todos os países, ao mesmo tempo se apresenta como uma grande ameaça ao meio ambiente. De fato, a atividade mineradora gera um dos maiores fluxos de resíduos sendo responsável por cerca de 20% dos resíduos totais no mundo. Em particular, um dos problemas ecológicos mais graves está associado à poluição ambiental produzida no decorrer do tempo após a deposição dos rejeitos de processamento de minério e rochas residuais. Para superar esses problemas, as indústrias de mineração têm feito enormes esforços para reduzir esses efeitos negativos através da racionalização de etapas de processamento (químicas e físicas) de minério e seus resíduos. A nova abordagem utiliza métodos baseados na química verde, com uma visão biotecnológica, oferecendo aplicações na remediação, recuperação ou redução/remoção da toxicidade. Alguns mecanismos promissores de imobilização dos metais envolvem a biossorção e a ligação dos componentes da solução com peptídeos, proteínas, polissacarídeos e outras biomoléculas (RAO et al., 2010).

As EPS (Substâncias Poliméricas Extracelulares), também denominadas exopolissacarídeos, produzidas por microrganismos são significativamente influenciadas por diferentes fatores, tais como temperatura, pH, composição do meio, concentração de oxigênio, concentração de sal e/ou metais pesados. A síntese ocorre especialmente sob estresse celular, relacionado à concentração de nutrientes, em especial, excesso de fonte de carbono e limitação de nitrogênio, potássio ou fosfato. Sob condições limitantes de crescimento, a fonte de carbono é levada para a síntese de polissacarídeos. Contudo, isto é importante pra definir a faixa apropriada da quantidade de substrato, pois dentro de certas condições a síntese de EPS pode ser impedida. Com a presença de nitrogênio em grande quantidade, o crescimento celular é favorecido, frequentemente diminuindo a produção de EPS. Em contraste, a disponibilidade de nitrogênio estimula a produção de levana por *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus sp.* 2H2, pois a enzima requerida para a produção de polímeros é sintetizada concomitantemente ao crescimento celular (RÜTERING, 2020; LING; WANG, 2015).

A bactéria *Paenibacillus polymyxa* vem se apresentando como eficaz no beneficiamento mineral onde várias estirpes e seus metabólitos extracelulares (EPS) estão associadas à ação sobre a superfície da calcita, hematita, corindo, caulinita e quartzo. Esses minerais interagem mais com os microrganismos, quando há crescimento no meio com produção de EPS, além disso, em alguns casos são usados biorreagentes com potencial para aplicação em algumas técnicas como na flotação. Além da curdlana, outras substâncias produzidas por *P. polymyxa* são descritas na literatura, principalmente o 2,3-butanediol e acetoina. Das EPS produzidas, há uma grande variedade relatada atualmente, onde há a descrição de inúmeras contendo levana, com grande concentração de frutose, bem como há diversas EPS contendo heteropolissacarídeos, que incluem glicose, galactose, manose, raminose, xilose, sorbose, fucose, frutose, entre outras (RÜTERING, 2020).

Seguindo as diretrizes do Ministério de Minas e Energia, no atual programa de mineração e desenvolvimento de 28 de setembro de 2020 (portaria MME nº 354), que busca o desenvolvimento tecnológico e a aplicação nas cadeias produtivas de metais e minerais para inovação tecnológica, há o interesse estratégico, que incentiva a obtenção de nióbio, níquel, cobalto, enxofre, grafite, lítio, silício, tântalo, terras raras, titânio, tungstênio, urânio, vanádio e Zinco. Neste contexto o presente trabalho, objetivou explorar a versatilidade da estirpe bacteriana de *Paenibacillus polymyxa* utilizando diversas fontes de carbono, identificando em qual há maior potencial de produção das biomoléculas. A partir da maior produção de EPS foi construída a isoterma de adsorção níquel. Com os resultados pretende-se expandir a pesquisa para novos metais de interesse.

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar o potencial da estirpe de *Paenibacillus polymyxa* na produção de EPS utilizando diversas fontes de carbono e em seguida avaliar a capacidade de adsorção de níquel pela EPS obtida em maior concentração.

2.1. Objetivos específicos

(i) Investigar o potencial de produção de EPS e o crescimento celular utilizando frutose, galactose, glicose, glicerol e sacarose, bem como realizar o monitoramento do pH. (ii) Construir as isotermas de adsorção de níquel da EPS produzida em maior concentração utilizando o modelo de Langmuir.

3. Material e Métodos

3.1. Etapas de Produção de EPS

3.1.1. Ativação e propagação do microrganismo *Paenibacillus polymyxa*

A estirpe de *Paenibacillus polymyxa* foi conservada em microtubos Eppendorf contendo solução 20% glicerol em água destilada e estocada a -22°C. Sua ativação foi feita em 100 mL de meio contendo extrato de levedura (5 g/L); sacarose (100 g/L), peptona de carne (5 g/L), fosfato de potássio dibásico (3 g/L), fosfato monobásico (1 g/L) e Sulfato de magnésio heptahidratado (1,025 g/L), em frascos Erlenmeyers de 500 mL, pH 7,00, sob

agitação de 150 rpm, durante 48 horas. Em seguida foi realizada a propagação, adicionando volume de 10% (v/v) em 100 mL do mesmo meio de cultivo, ou seja, em meio de produção, durante 24 horas, 30°C e 150 rpm, com a finalidade de obtenção do inóculo.

3.1.2. Produção de EPS, quantificação e separação da fração celular

Foi realizada a produção de EPS em frascos Erlenmeyers de 100 mL com diferentes fontes de carbono (na concentração de 100 g/L) a saber: frutose, galactose, glicose, glicerol, sacarose, esse último, além de usar na concentração de 100 g/L foi utilizado na concentração de 300 g/L. Adicionalmente, o meio de produção continha extrato de levedura (5 g/L), peptona de carne (5 g/L), fosfato de potássio dibásico (3 g/L), fosfato de potássio monobásico (1 g/L) e Sulfato de magnésio heptahidratado (1,025 g/L), com volume final de 50 mL, pH 7,00, incubado sob agitação, durante 24 horas (Liu et al., 2009). Ao final de cada processo o cultivo foi mantido em banho Maria a 70°C por 15 min para liberar o EPS da superfície celular, e em seguida realizou-se a centrifugação a 4.000 rpm para a remoção da fração celular. Após essa etapa foi adicionado etanol gelado na proporção 3:1 (etanol: sobrenadante) para a precipitação da EPS. Esta mistura foi mantida refrigerada a 4°C por 24 horas. Ao final deste período, foi separado o precipitado e incubado a 60°C até atingir peso constante. À fração celular foi adicionada água destilada (10 mL), em seguida levada ao vortex e por fim centrifugada a 4000 rpm. Por fim, foi conduzida a filtração em membrana de 0,22 µm e posteriormente foi colocada em estufa a 100°C até peso constante.

3.2. Isoterma de níquel

Com o intuito de avaliar a capacidade de sorção de níquel pela EPS, foi realizada a construção da isoterma de sorção segundo o modelo de Langmuir. Utilizou-se 50 mL de solução de cloreto de níquel nos Erlenmeyers em diferentes concentrações, a saber, 1, 10, 50, 100, 150 e 200 mg/L, partindo de uma solução concentrada de 400 mg/L. A concentração utilizada da EPS foi de 1,0 g/L. Os frascos foram colocados sob agitação de 150 rpm em agitador rotatório, a 30°C, durante 24 horas. Em seguida foram realizadas duas filtrações sucessivas por pressão positiva, em membranas de 0,45 µ e 100 kDa, respectivamente. O meio foi acidulado com ácido nítrico e enviado para quantificação por espectrometria de absorção atômica. Por fim, foi utilizado o *software* Statistica 13 e o dados foram ajustados de acordo com a equação de modelo de Langmuir, $q = b \cdot C_f \cdot q_{\text{máx}} / (1 + b \cdot C_f)$, onde foram estimadas a constante b e o valor de $q_{\text{máx}}$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Produção de EPS

A biossíntese de exopolissacarídeos é um processo que envolve muitas etapas, onde se inicia com uma síntese intracelular de açúcares precursores de nucleotídeos, que servem como doadores ativos para posterior construção da EPS. Dependendo do mecanismo usado, as unidades de repetição de oligossacarídeos ou toda a cadeia dos polímeros são montadas a partir dos precursores pela ação de uma ou mais glicosiltransferases.

Seguindo as montagens das unidades de monossacarídeos, a EPS é secretada para o espaço extracelular. Em contraste com a enorme diversidade estrutural dos polissacarídeos, o número de mecanismos moleculares subjacentes à biossíntese de EPS é limitado. Atualmente quatro diferentes caminhos são descritos pelos quais os biopolímeros são estruturados, sendo três desses mecanismos descritos são intracelulares (Wzx/Wzy-rota dependente, ABC-rota dependente do transportador e síntese-rota dependente) e um é catalisado de forma extracelular mediado por uma enzima (síntese extracelular catalisada por sacarases). As levanas que estão presentes na EPS produzida neste trabalho utilizando a sacarose como fonte de carbono (SOUZA et al., aceito para publicação, 2020) são conhecidas por serem produzidas por essa última rota. A síntese destas EPS ocorre por ação de sacarases que são secretadas ou ligadas à parede da célula. Ao contrário das vias intracelulares, as sacarases não exigem precursores de nucleotídeos. Estas enzimas aceitam di ou trissacarídeos como sacarose, como substrato, e transferem diretamente uma das porções do açúcar para uma cadeia crescente de polímeros pelo uso da energia obtida a partir da ligação glicosídica clivada (RÜTERING, 2020; SHUKLA et al., 2019).

Em geral a fonte de carbono é o nutriente mais crítico e a fonte de energia para o crescimento celular, e diferentes fontes de carbono podem ter diferentes efeitos de repressão catabólica sobre o metabolismo. Para selecionar a adequada fonte de carbono para crescimento e produção de EPS, vários substratos foram testados na concentração de 100 g/L. Como apresentado na Tabela 1 a fonte de carbono mais adequada para a produção da EPS foi a sacarose, cujo resultado está de acordo com outros estudos (LIU et al, 2009; SHUKLA et al., 2019; Grinev et al., 2020), bem como com resultados obtidos neste projeto (Jornada PCI VII e VIII). Os melhores valores de crescimento dos microrganismos foram obtidos na presença de frutose e galactose. Há uma relação linear entre a produção de EPS e o crescimento, porém essa relação não é sempre a mesma para o microrganismo, podendo ser influenciada pela fonte de carbono. No presente trabalho, com a modificação da fonte de carbono para sacarose houve um menor crescimento e devido ao estresse sofrido foi produzida uma maior concentração de EPS (SHUKLA et al., 2019). O que tem sido reportado é que *Paenibacillus polymyxa* tem alta atividade de levanasacarase induzida pela presença de sacarose, no qual são responsáveis pelas altas produções de EPS durante o crescimento celular (RÜTERING, 2020; GRINEV et al., 2020). O pH é um parâmetro crucial para o processo fermentativo, onde muitos microrganismos requerem pH neutro. Adicionalmente ao valor de pH inicial neutro de um meio de cultivo, a mudança do valor durante o ensaio pode afetar a membrana celular, a morfologia e estrutura da célula, a absorção de vários nutrientes e a biossíntese das EPS. Normalmente o pH ótimo para a produção de EPS por *Paenibacillus polymyxa* deve ser mantido próximo da neutralidade (LIU et al, 2009; SHUKLA et al., 2019), conforme no presente trabalho.

Tabela 1. Efeitos da fonte de carbono sobre o pH, a produção de biomassa e a produção de EPS por *Paenibacillus polymyxa*.

Fonte de Carbono	pH final	Peso seco (g/L)	Concentração de EPS obtida (g/L)
Frutose (100 g/L)	5,80 ± 0,19	1,39 ± 0,056	7,78 ± 0,39
Galactose (100 g/L)	6,10 ± 0,03	1,24 ± 0,012	9,25 ± 1,03
Glicose (100 g/L)	6,15 ± 0,09	0,742 ± 0,039	9,21 ± 0,37
Glicerol (100 g/L)	5,92 ± 0,01	0,841 ± 0,028	1,96 ± 0,68
Sacarose (100 g/L)	6,12 ± 0,02	0,366 ± 0,164	37,28 ± 1,03
Sacarose (300 g/L)	6,07 ± 0,03	0,155 ± 0,004	48,25 ± 1,35

4.2. Isoterma de adsorção de níquel

Os polissacarídeos do tipo levana têm atraído cada vez mais atenção devido as suas promissoras propriedades físico-químicas, seus efeitos fisiológicos, de biodegradabilidade e biocompatibilidade. Esses polímeros podem ter diversos usos (como antivirais, antitumorais, anti-inflamatório, na agricultura, biomineração, dentre outras aplicações) e vem ganhando destaque principalmente para a redução da biotoxicidade de diversos metais pesados. Desta forma, os polímeros de levana são potencialmente efetivos e acessíveis como biossorventes para remoção de metais (GRINEV et al., 2020; DAVE, SODHA & TIPRE, 2018), bem como na biomineração (SUKLA, PATTANAIK & PRADHAN, 2019). A Figura 1 apresenta os valores da concentração do equilíbrio (C_f) e da relação massa adsorvida (mg)/g da EPS (q), necessários para construção da isoterma de adsorção de níquel com intuito de estimar os valores de $q_{\text{máx}}$ e a constante b , que são usados para comparação de seu potencial de aplicação em relação à literatura.

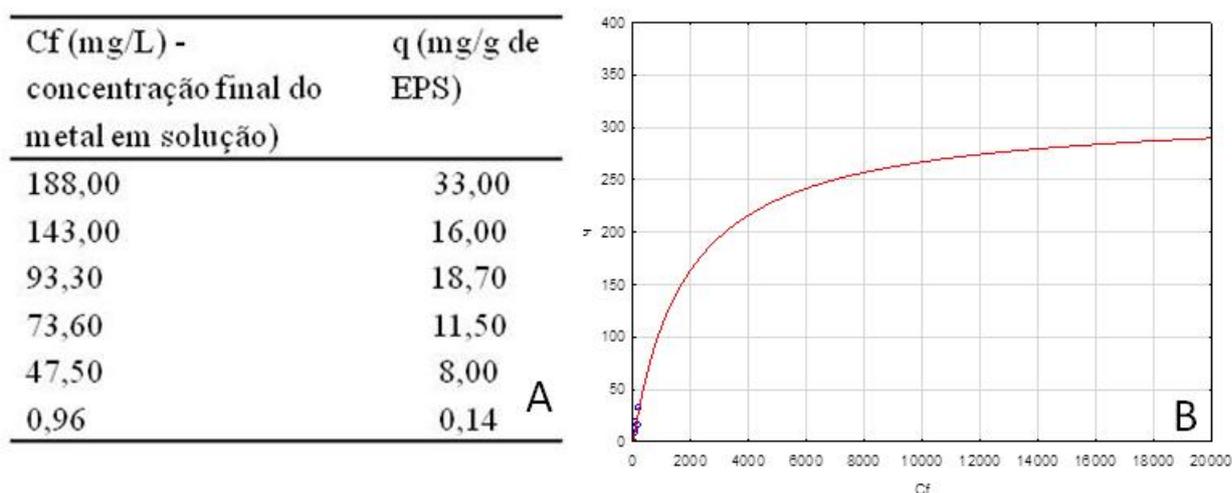


Figura 1. (A) Quadro dos valores de Concentração do equilíbrio (C_f) x massa adsorvida (mg)/g de EPS (q). (B) Isoterma de níquel para experimentos conduzido utilizando concentração de EPS 1 g/L.

A avaliação da adsorção de níquel pela EPS foi construída baseada no modelo de Langmuir, cujo $q_{\text{máx}}$ é a capacidade máxima de adsorção e a constante b indica a interação adsorvato/adsorvente, ou seja, a afinidade do bioadsorvente pelo metal. Os valores estimados pelo modelo foram $b = 0,00054$ e $q_{\text{máx}} = 316,6$ mg/g de EPS, sendo $R^2 = 0,91$ (valor esse aceito para processos biológicos) indicando que o modelo como adequado. Comparando a valores da literatura (KARAKAGH et al., 2012; MORILLO et al., 2008) o valor de $q_{\text{máx}}$ foi superior e os valor de b foi menor. Com os resultados obtidos, a EPS indicou potencial para o uso na bioadsorção, sendo o valor de $q_{\text{máx}}$ obtido para níquel próximo aos melhores citados pela literatura especializada. Desta forma, a pesquisa é suportada para realizar isotermas de adsorção de outros elementos químicos de interesse.

5. Conclusão

A produção de EPS por *Paenibacillus polymyxa* foi obtida a partir de todas as fontes de carbono testadas, demonstrando assim a grande versatilidade desse microrganismo. A maior produção foi encontrada usando a sacarose (em torno de 48 g/L). O fato desta rota utilizar as levanasacarases indica ser a produção extracelular, o que facilita a recuperação das EPS, trazendo vantagem econômica ao processo. O modelo de Langmuir foi adequado para esta isoterma de adsorção de níquel, obtendo $q_{\text{máx}}$ de 316 mg/g de EPS, sendo melhor do que os apresentados pela literatura. Portanto, a EPS apresenta potencial para aplicação da bioadsorção de níquel e ainda pode ser avaliado para outros elementos químicos de interesse do CETEM.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo suporte financeiro da pesquisa. Ao Instituto de Macromoléculas Heloisa Mano por iniciar a parceria para o desenvolvimento deste projeto através do professor Fernando Gomes. A COAMI através técnica Kátia que realizou as análises de adsorção atômica.

7. Referências Bibliográficas

DAVE, S. R.; SODHA, A. B.; TIPRE, D. R. Microbial technology for metal recovery from e-waste printed circuit boards. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, v. 6, p. 241 – 247, 2018.

GRINEV, V. S.; TREGUBOVA, K. V.; ANIS'KOV, A. A.; SIGIDA, E. N.; SHIROV, A. A.; FEDONENKO, Y. P.; YERGORENKOVA, I. V. Isolation, structure, and potential biotechnological applications of the exopolysaccharide from *Paenibacillus polymyxa* 92. *Carbohydrate Polymers*, v. 232, 2020.

RAO, K. H.; VILINSKA, A.; CHERNYSHOVA, I. V. Minerals bioprocessing: R & D needs in mineral biobeneficiation. *Hydrometallurgy*, v. 104, p. 465-470, 2010.

KARAKAGH, R. M. Biosorption of Cd and Ni by inactivated bacteria isolated from agricultural soil treated with sewage sludge. *Ecohydrology & Hydrobiology*, v.12, p. 91–198, 2012. LIANG, T.; WANG, S. Recent advances in exopolysaccharides from *Paenibacillus spp.*: Production, Isolation, structure, and Bioactivities. *Marine drugs*, v.13, p.1847-1863, 2015.

LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; SUN, Y.; LU, Z.; ZENG, X. Production, characterization and antioxidant activities in vitro of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3, v. 78, p. 275-281, 2009.

MORILLO, J. A. P.; GÁRCIA-RIBERA, R.; QUESADA, T.; AGUILERA, M.; RAMOS-CORMENZANA, A.; MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M. Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*. *World Journal Microbial Biotechnol*, v.24, p. 2699-2704, 2008.

RÜTERING, M. P. Exopolysaccharides by *Paenibacilli*: from Genetic Strain Engineering to Industrial Application. Dissertation. 2020.

SHUKLA, A. MEHTA, K.; PARMAR, J., PANDYA, J.; SARAF, M. Depicting the exemplary knowledge of microbial exopolysaccharides in a nutshell. *European Polymer Journal*, v. 119, p. 298-310, 2019.

SUKLA, L. B.; PATTANAİK, A.; PRADHAN, D. Bio-beneficiation possibility of low-grade bauxite. 2019.