

Engenharia de Alimentos

INFLUÊNCIA DO pH e DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR NO CRESCIMENTO CELULAR DE *Ralstonia solanacearum* PARA PRODUÇÃO DE P(3HB)

Karine Laste Macagnan, Dener Acosta de Assis*, Mariane Igansi Alves, Amanda Ávila Rodrigues, Ana Cláudia da Silva Pôrto, Fernanda Germano Alves-Gautério, Patrícia Diaz de Oliveira, Angelita da Silveira Moreira, Claire Tondo Vendruscolo

Laboratório de Biopolímeros, Centro de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

**E-mail: dener.acosta@bol.com.br*

RESUMO – Poli(3-hidroxi-butirato) ou P(3HB) é um biopolímero plástico biodegradável acumulado no citoplasma bacteriano de alguns microrganismos como inclusões lipofílicas. O processo biotecnológico de síntese de P(3HB) ocorre em duas etapas, sendo a primeira de crescimento celular, em meio de cultura complexo, seguida de uma fase de acúmulo de polímero, que ocorre, normalmente, sob a condição de excesso de fonte de carbono. O objetivo do trabalho foi avaliar diferentes concentrações de sacarose e pH no meio de cultivo na fase de inóculo de *Ralstonia solanacearum*, visando elevar o rendimento em biomassa para se obter, consequentemente, maior rendimento de P(3HB). Os meios de cultivo foram formulados segundo o Planejamento Experimental tipo delineamento composto central rotacional 2^2 , tendo como variáveis fixas as condições de incubação: temperatura de 32 °C e agitação de 150 rpm. As variáveis independentes foram pH e concentração de sacarose. A variável dependente foi a concentração bacteriana avaliada em triplicata nos tempos de 18, 20, 22 e 24 h. Obteve-se maior crescimento celular em 24 h de cultivo para a maioria dos tratamentos, sendo o maior crescimento celular obtido com os meios de cultivo em pH básico (8) com sacarose em baixa concentração (10 g/L) e em pH ácido (5) associado a alta concentração de açúcar (50 g/L). Apenas para o tempo de 18 h obteve-se modelo preditivo, para os cultivos com os tempos posteriores devem-se realocar os valores mínimos e máximos de concentração de açúcar, pois o modelo foi não preditivo, assim não foram geradas as superfícies de resposta correspondentes.

Palavras-chave: Poli(3-hidroxi-butirato), Polihidroxialcanoato, Biopolímero, *Ralstonia solanacearum*.

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos convencionais, obtidos a partir do petróleo, devido a sua durabilidade e resistência, têm sido, por décadas, usados indiscriminadamente (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006). Esses materiais têm

despertado preocupação devido a sua rápida descartabilidade e a lenta degradação, por não reagirem quimicamente com a maioria das substâncias, provocando problemas nos aterros sanitários, dificultando a troca de gases e a decomposição de outros compostos (LUENGO et al., 2003). O crescente interesse científico pela área ambiental, associado ao ainda crescente consumo de plásticos têm tornado necessário a pesquisa e o desenvolvimento de substitutos ecologicamente corretos. É uma das principais linhas de pesquisa desses novos materiais que tem despertado interesse é a obtenção de biopolímeros biodegradáveis, produzidos por microrganismos com o uso de fontes renováveis, com características térmicas e mecânicas relevantes que permitam a sua industrialização (VINHAS et al., 2007).

Bioprocessos podem ser empregados como ferramenta para obtenção de polímeros biodegradáveis como os da família dos polihidroxialcanoatos (PHAs). PHAs são acumulados no citoplasma bacteriano como inclusões de poliésteres insolúveis em água e utilizados como material de reserva intracelular de energia e carbono (KUNASUNDARI e SUDESH, 2011). Esses bioplásticos se degradam completamente em curto período de tempo pela ação enzimática de microrganismos e sob condições apropriadas no meio ambiente, sendo esta a principal característica desses materiais; além disso, são termoplásticos e biocompatíveis ao ser humano (PIEMOLINI, 2004). Por possuir propriedades físicas comparáveis ao polipropileno (PP), o poli(3-hidroxibutirato) P(3HB) é o biopolímero mais estudado e utilizado dentre os PHAs (HOLMES, 1985).

Os PHAs possuem grande potencial biotecnológico, tendo aplicações não somente em embalagens biodegradáveis, mas também em fios de suturas e próteses na área médica e na agricultura como veículo para inoculante e matriz para liberação controlada de agrotóxicos (CHANPRATEEP, 2010). O processo de síntese desse biopolímero ocorre, normalmente, em duas etapas: primeiramente uma etapa inicial de crescimento celular utilizando meio de cultura complexo, sem limitação de nutrientes no cultivo, seguida de uma fase de produção e acúmulo de polímero, a qual ocorre sob a condição de excesso de fonte de carbono e, geralmente, associada à limitação de um nutriente essencial como P, Fe, Mg ou N (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005). A seleção do microrganismo para produção industrial de PHA é baseada em vários fatores como alta velocidade de crescimento, utilização de diferentes substratos, principalmente de baixo custo, capacidade de acumular grande quantidade de polímero, e que haja um fator de conversão do substrato em biopolímero bastante elevado (LEE, 1996).

O objetivo do trabalho foi avaliar diferentes concentrações de sacarose e pH no meio de cultivo na fase de inóculo de *Ralstonia solanacearum* visando maior rendimento em biomassa para se obter maior rendimento de P(3HB).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

Foi utilizada linhagem de *Ralstonia solanacearum* cepa RS, cedida pelo Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. A bactéria tem sido preservada por meio das técnicas de liofilização e repiques mensais em *Nutritive Yest Agar* (NYA), com composição em g/L, de peptona, 5,0 g; glicose, 5,0 g; extrato de levedura, 1,0 g; extrato de carne, 3,0 g e agar, 15,0 g (SCHAAD et al.,

2001, modificado) estocadas sob congelamento a $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ e refrigeração a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

2.2 Produção de inóculo

O inóculo foi realizado segundo o Planejamento Experimental utilizado, em incubador agitador orbital, tendo como variáveis fixas o meio de cultivo F1/YF (OLIVEIRA, 2010), $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ e agitação de 150 rpm. As variáveis independentes foram pH e concentração do açúcar sacarose (fonte de carbono). Os inóculos foram produzidos em frascos Erlenmeyers de 500 mL, a partir de pré-inóculos formados pela mistura de meio F1/YF, modificado em relação à concentração de sacarose e pH, e suspensão de células crescidas em meio sólido durante 48 h a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, perfazendo concentração de biomassa (DO) inicial de 0,5. A variável dependente foi a concentração bacteriana, mensurada por análise da concentração de biomassa (DO), avaliada em triplicata nos tempos de 18, 20, 22 e 24 h.

O experimento foi desenvolvido conforme o delineamento fatorial completo 2^2 (Tabela 1), composto de 2 variáveis independentes ($x = \text{pH}$, $y = \text{concentração de açúcar}$), 3 repetições no ponto central e adicionado de 4 pontos axiais, totalizando 11 tratamentos.

Tabela 1. Delineamento experimental fatorial completo 2^2 , para determinação do efeito do pH e concentração de açúcar sobre a densidade óptica (DO) de inóculo de *Ralstonia solanacearum*.

Tratamentos	Níveis Codificados		Níveis Reais	
	X	Y	pH	[Açúcar]
1	-1	-1	5	10
2	+1	-1	8	10
3	-1	+1	5	50
4	+1	+1	8	50
5	$-\alpha$	0	4,4	30
6	$+\alpha$	0	8,6	30
7	0	$-\alpha$	6,5	1,8
8	0	$+\alpha$	6,5	58,2
9	0	0	6,5	30
10	0	0	6,5	30
11	0	0	6,5	30

[Açúcar]: Concentração de açúcar; (0): ponto central; $+\alpha$: pontos axiais.

2.3 Determinação de crescimento celular

O crescimento celular foi determinado pela concentração de biomassa (DO) analisada por espectrofotometria a 600 nm de amostras de 2 mL coletadas em 18, 20, 22 e 24 h de cultivo. A análise estatística dos dados foi feita através de análise de variância (ANOVA), e as superfícies de resposta geradas utilizando-se o *software Statistica* versão 7.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 2 estão apresentados os resultados do experimento, nos quatro tempos de avaliação, gerados pela aplicação do delineamento estatístico Composto Central Rotacional de segunda ordem (DCCR 2²) com base na Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), o qual foi utilizado para avaliar o efeito da concentração de sacarose e pH no meio de cultivo visando aumento da multiplicação celular de *Rastonia solanacearum*.

Tabela 2. Matriz do planejamento experimental DCCR 2² com valores codificados e reais e variáveis respostas obtidas para os inóculos de *R. solanacearum* incubados a 36°C e 150 rpm por diferentes tempos.

Tratamentos	Variáveis		DO			
	pH	[Açúcar]	18 h	20 h	22 h	24 h
1	-1 (5)	-1 (10)	6,73	7,03	6,80	7,63
2	+1 (8)	-1 (10)	8,07	8,30	8,53	9,03
3	-1 (5)	+1 (50)	7,83	7,67	8,50	9,60
4	+1 (8)	+1 (50)	7,17	7,43	7,33	8,00
5	-α (4,4)	0 (30)	0,61	0,81	0,68	0,67
6	+α (8,6)	0 (30)	6,47	6,33	6,77	6,67
7	0 (6,5)	-α (1,8)	5,60	5,90	6,07	6,17
8	0 (6,5)	+α (58,2)	7,97	7,93	8,07	8,20
9	0 (6,5)	0 (30)	6,67	6,33	6,83	6,83
10	0 (6,5)	0 (30)	7,07	7,57	7,40	7,77
11	0 (6,5)	0 (30)	6,03	5,93	6,20	6,70

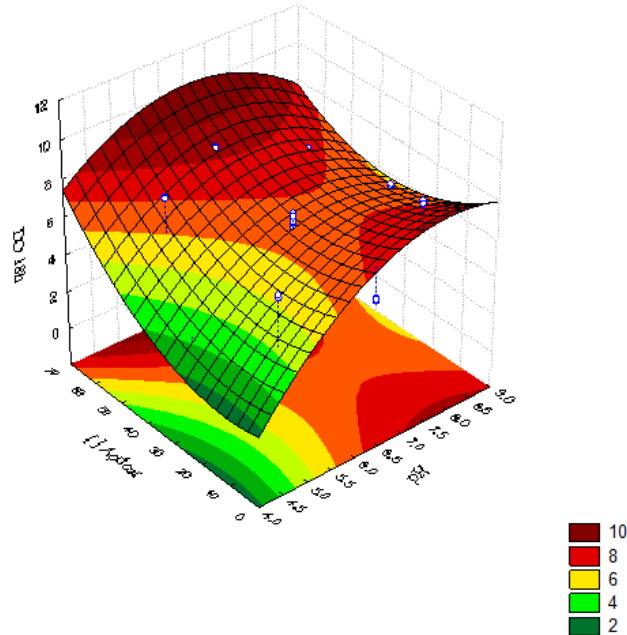
O modelo matemático foi significativo, com 95% de confiança para todos os tempos analisados, porém foi preditivo apenas para o tempo de 18h, gerando o coeficiente de determinação (R²) 0,60, indicando que o modelo explicou 60% da variação dos dados observados; assim, apenas foi gerada a superfície de resposta para esse tempo de cultivo (Figura 1). Segundo autores, modelos com R² < 0,60 devem ser usados somente como indicadores de tendência, nunca para fins preditivos (20h r=53%; 22h r=54%; 24h r=45%).

É possível notar, a partir da tabela 2, que o maior crescimento celular foi obtido em 24 h de cultivo para os diferentes tratamentos, com exceção dos tratamentos 5 e 6, nos quais utilizaram-se meios com pHs extremos, 4,4 e 8,6, respectivamente, e concentração de sacarose no ponto central (30 g/L). A maior DO foi verificada nos tratamentos 2 e 3, com meio de cultivo em pH básico (8) e sacarose em baixa concentração (10 g/L) e em pH ácido (5) associado a alta concentração de açúcar (50 g/L), respectivamente.

A partir da superfície de resposta (Figura 1) estima-se que o maior crescimento celular no tempo de 18 h pode ser alcançado com baixa concentração de açúcar (1,8 g/L) e em pH mais elevado (7,5 - 8,5), além desse ponto pode ser verificado outro momento de elevada DO, aumentada proporcionalmente com a concentração de açúcar e pH entre 5 e 8. Para centralizar os melhores resultados na superfície de resposta, devem-se realocar os

valores mínimos e máximos de fonte de carbono na matriz do delineamento experimental, uma vez que, os melhores resultados foram obtidos a partir do $+α$ (58,2 g/L) e $-α$ (1,8 g/L).

Figura 1. Superfície de resposta referente à concentração de biomassa (DO) obtida no cultivo de 18h relacionada com a concentração de açúcar e pH.



A literatura relata, para o gênero *Ralstonia*, o uso do pH 7 para meio de cultivo na fase de inóculo (BARBOSA et al., 2005, RODRÍGUEZ-CONTRERAS et al., 2015). Entretanto, pode ser verificado, no presente trabalho, que o pH adequado é dependente da concentração de açúcar. Em relação à concentração de açúcar, a literatura relata a utilização de meios de cultura compostos por uma concentração inferior à encontrada nos resultados, como por exemplo, o meio TFY, composto por frutose 1 g/L (BARBOSA et al., 2005), e YM composto por glicose 10 g/L (RODRIGUES et al., 2012). Assim, pode-se estimar que o aumento do crescimento celular em concentração alta de açúcar esteja relacionado com outros fatores, que não o consumo direto do substrato para multiplicação do microrganismo.

4 CONCLUSÃO

Com as faixas utilizadas de pH e concentração de açúcar obteve-se modelo preditivo apenas para 18h e, segundo o mesmo, o maior crescimento celular seria obtido com baixa concentração de açúcar (1,8 g/L) e em pH mais elevado (7,5 - 8,5); além dessa, outra faixa favorável seria a combinação de alta concentração e açúcar (58,2 g/L) e pH entre 5 e 8 para o cultivo de 18 h. Para os cultivos com os tempos posteriores (20, 22 e 24 h) devem-se realocar os valores mínimos e máximos de concentração de açúcar, pois o modelo foi não preditivo, assim não foram geradas as superfícies de resposta correspondentes. Entretanto, os maiores valores de DO foram obtidos em 24h, com os meios de cultivo em pH básico (8) com sacarose em baixa concentração (10 g/L) e em pH ácido (5) associado a alta concentração de açúcar (50 g/L).

5 AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico Unidade de Biotecnologia - UFPel, e às agências de fomento FAPERGS e CNPq.

6 REFERÊNCIAS

- BARBOSA, M.; ESPINOSA, H. A.; MALAGÓN, R. D.; MORENO, S. N. Producción de poli-b-hidroxibutirato (phb) por *Ralstonia eutropha* atcc 17697. **Universitas Scientiarum**, v. 10, n. 1, p. 45-54, 2005.
- CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621-632, 2010.
- FRANCHETTI, S. M.; MARCONATO, J. C. Biodegradable polymers - A partial way for decreasing the amount of plastic waste. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.
- HOLMES, P. A. Applications of PHB – A microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physical Technology**, v. 16, p. 32-36, 1985.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607-619, 2005.
- KUNASUNDARI, B.; SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Express Polymer Letters**, v. 5, n. 7, p. 620–634, 2011.
- LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 1-14, 1996.
- LUENGO, J.M.; GARCÍA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARROY, G.; OLIVEIRA, E.R. Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 251–260, 2003.
- OLIVEIRA, C. **Produção de polihidroxibutirato: bioprospecção de Beijerinckiasp. da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CDTec - UFPel**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, 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, Florianópolis, 2004.
- RODRIGUES, A. A.; MACAGNAN, K. L.; SILVA, C. S.; SANTOS, B. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Meios de cultura para inóculo visando a produção de polihidroxialcanoatos. **VI Simpósio de Microbiologia Aplicada e II Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada**, 2012.
- RODRÍGUEZ-CONTRERAS A.; KOLLER M.; DIAS M. M. S.; CALAFELL-MONFORT M.; BRAUNEGG G.; MARQUÉS-CALVO M. S. Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 94, p. 50–57, 2015.
- SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3ª Ed. APS Press, 373 p, 2001.
- VINHAS, G.M.; ALMEIDA, Y.M.B.; LIMA, M.A.G.A. Estudo das propriedades e biodegradabilidade de blendas de poliéster/amido submetidas ao ataque microbiano. **Química Nova**, v. 6, p. 15