

DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 2² PARA AJUSTE DE pH E CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NA FASE DE INÓCULO DE *Ralstonia solanacearum* PARA PRODUÇÃO DE P(3HB)

KARINE LASTE MACAGNAN¹; MARIANE IGANSI ALVES²; ROSANE RODRIGUES DE SOUZA³; PATRÍCIA DIAZ DE OLIVEIRA⁴; ANGELITA DA SILVEIRA MOREIRA⁵; CLAIRE TONDO VENDRUSCOLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – karinemacagnan@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – marianeigansialves@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fragatao@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – angelitadasilveiramoreira@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – clairevendruscolo@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Polihidroxicanoatos (PHAs) são biopolímeros plásticos biodegradáveis acumulados no citoplasma bacteriano de alguns microrganismos na forma de inclusões lipofílicas (KUNASUNDARI; SUDESH, 2011). Esses bioplásticos se degradam completamente em curto período de tempo pela ação enzimática de microrganismos quando em condições apropriadas no meio ambiente, sendo esta a principal característica desses materiais; além disso, são termoplásticos e biocompatíveis ao ser humano, podendo ser utilizados, por exemplo, em artigos descartáveis e em próteses (PIEMOLINI, 2004). Dentre os PHAs, o P(3HB) é o biopolímero mais utilizado na produção de plásticos biodegradáveis, pois possui propriedades físicas, como ponto de fusão, grau de cristalinidade e temperatura de transição vítrea, comparáveis ao polipropileno (PP) (CHANPRATEEP, 2010); podendo ser, assim, um potencial substituto para os plásticos petroquímicos.

O processo de produção do P(3HB) ocorre em duas etapas, sendo a primeira de crescimento celular ou de inóculo, em meio de cultura complexo, seguida da fase final de acúmulo de polímero, que ocorre, normalmente, sob a condição de excesso de fonte de carbono (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005). Assim, a eficiência da segunda fase é dependente da primeira.

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da concentração da fonte de carbono glicose e do pH no meio de cultivo na fase de inóculo da bactéria fitopatogênica produtora de P(3HB) *Ralstonia solanacearum*, visando elevar o rendimento em biomassa para se obter, conseqüentemente, maior rendimento de P(3HB).

2. METODOLOGIA

2.1 Microrganismo

Foi utilizada a linhagem de *Ralstonia solanacearum* cedida pelo Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. A bactéria está sendo preservada por meio das técnicas de liofilização e repiques mensais em *Nutritive Yest Agar* (NYA) (SCHAAD et.al, 2001); estocadas sob congelamento a -8 °C e refrigeração a 4 °C, respectivamente.

2.2 Preparo do inóculo

Para o estudo da fase de inóculo foi desenvolvido o delineamento fatorial completo tipo DCCR 2², compostos de 2 variáveis independentes (x= pH, y= concentração de açúcar), 3 repetições no ponto central e adicionados de 4 pontos axiais, totalizando 11 tratamentos. A fase de inóculo foi realizada em incubador

agitador orbital, utilizando frascos *Erlenmeyers* aletados de 500 mL, segundo o DCCR 2², em meio de cultivo F1/YF (OLIVEIRA, 2010), a 32 °C e agitação de 250 rpm, partindo de pré-inóculo formado pela suspensão de células obtida a partir de placas multiplicativas (meio NYA sólido, 48 h a 32 °C), perfazendo concentração de biomassa (DO_{600nm}) inicial de 0,5. As variáveis independentes foram pH (5,5 a 9,5) e concentração de glicose (G) (10 a 50 g/L). As variáveis dependentes foram a densidade óptica (DO_{600nm}) e massa celular seca (MCS), representativas do crescimento celular e avaliadas em triplicata no tempo de 24 h.

2.3 Determinação de crescimento celular

O crescimento celular foi determinado pela DO_{600nm}, analisada por espectrofotometria a 600 nm, e pela concentração de MCS, determinada por gravimetria. As médias foram comparadas e analisadas estatisticamente pelo teste ANOVA $p < 0,05$ no programa *Statistica 7.0*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 estão apresentados os resultados do experimento gerados pela aplicação do delineamento estatístico Composto Central Rotacional de segunda ordem (DCCR 2²).

Tabela 1. Matriz do planejamento experimental DCCR 2² com valores codificados e reais e variáveis dependentes obtidas para os inóculos de *R. solanacearum*.

Tratamentos	Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes	
	pH	[Glicose]	DO _{600nm}	MCS
1	-1 (5,5)	-1 (10)	12,5	2,74
2	+1 (9,5)	-1 (10)	7,7	1,68
3	-1 (5,5)	+1 (50)	3,0	0,22
4	+1 (9,5)	+1 (50)	1,9	0,40
5	-α (5,2)	0 (30)	8,8	1,56
6	+α (9,8)	0 (30)	3,0	0,48
7	0 (7,5)	-α (7,2)	11,4	2,69
8	0 (7,5)	+α (52,8)	1,7	0,78
9	0 (7,5)	0 (30)	10,3	2,38
10	0 (7,5)	0 (30)	10,6	2,48
11	0 (7,5)	0 (30)	10,8	2,53

O maior crescimento celular, estimado por DO_{600nm} (12,5) e MCS (2,74), foi obtido no tratamento 1 (combinação -1/-1), utilizando pH ácido e baixa concentração de açúcar, seguido do tratamento 7 (0/-α), com pH neutro e mais baixa concentração de açúcar.

O modelo matemático foi significativo, com 95% de confiança, e preditivo, gerando os coeficientes de determinação (R²) 0,95 e 0,97 para as variáveis dependes DO_{600nm} e MCS, respectivamente. Pela análise estatística, os coeficientes de regressão significativos a 95% foram considerados nos modelos matemáticos propostos para representar as Equações 1 (DO_{600nm}) e 2 (MCS) dos cultivos em função do pH e concentração de glicose.

$$DO_{600nm} = 10,13 - 3,78 \times PH - 4,95 \times PH^2 - 7,99 \times G - 4,01 \times G^2 + 1,85 \times PH \times G \quad (1)$$

$$MCS = 2,38 - 0,64 \times PH - 1,78 \times PH^2 - 1,81 \times G - 0,70 \times G^2 + 0,62 \times PH \times G \quad (2)$$

As superfícies de respostas e de contornos baseadas no modelo gerado pelas Equações 1 e 2 estão ilustradas nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

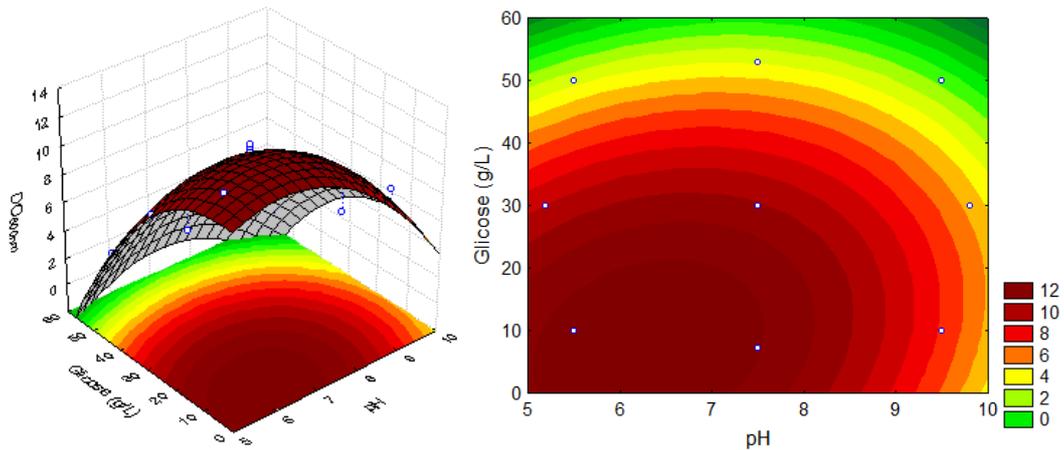


Figura 1. Superfície de resposta e de contorno referente à concentração de biomassa (DO_{600nm}) obtida no cultivo com glicose relacionada com a concentração de açúcar e pH.

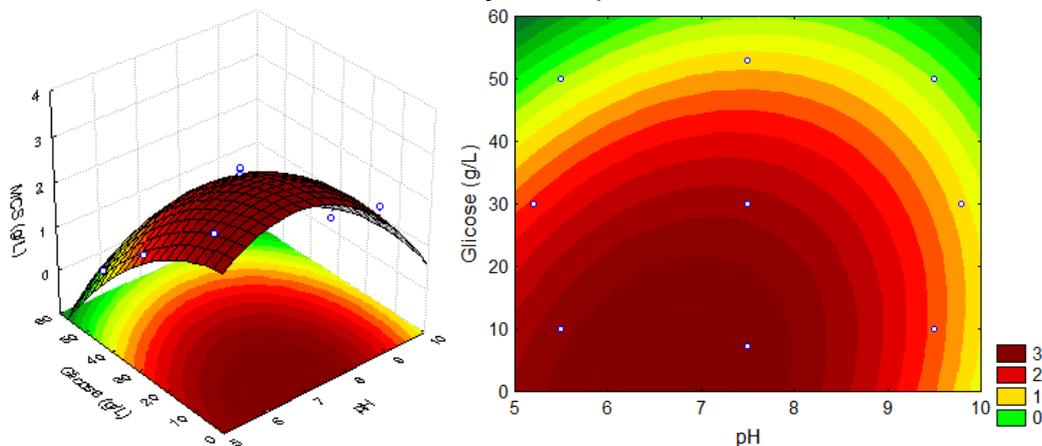


Figura 2. Superfície de resposta e contorno referente à concentração de biomassa (MCS) obtida no cultivo com glicose relacionada com a concentração de açúcar e pH.

Estima-se que a maior DO_{600nm} 12 (Figura 1), no cultivo utilizando glicose e demais condições fixadas (32 °C e 250 rpm), pode ser alcançada com baixa concentração de açúcar (0 – 18 g/L) e em pH ácido até próximo à neutralidade (5,0 – 7,5). Já a maior MCS 3 g/L (Figura 2) estima-se que pode ser alcançada com a mesma faixa de concentração de açúcar (0 – 18g/L) e faixa de pH levemente superior (5,4 – 7,9). Assim, glicose entre 0 – 18 g/L e pH de 5,4 – 7,5 favoreceriam ambas as variáveis determinantes de crescimento celular analisadas. 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.

No planejamento experimental substituíram-se as variáveis independentes pelos valores codificados, para obtenção dos valores preditivos e dos desvios padrão (Tabela 2). Analisando-se os resultados das equações de modelo predito e os resultados experimentais, para as respostas de DO_{600nm} e MCS, encontrou-se respostas nos pontos centrais muito próximos e com baixo desvio padrão, o que indica a validade do modelo. Pode-se considerar baixo o desvio encontrado no tratamento 1, onde obteve-se maior concentração de biomassa, combinando-se os valores mínimos das variáveis independentes.

Tabela 2. Respostas do DCCR 2² referente a DO_{600nm} e MCS, observadas experimentalmente e previstas pelo modelo, e desvio padrão.

Trat.	Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes					
	pH	[Glic.]	DO _{600nm}			MCS		
			Obs.	Mod.Pre	DP (%)	Obs.	Mod.Pre	DP (%)
1	-1	-1	12,5	14,79	-18,3	2,74	2,97	-8,4
2	+1	-1	7,7	3,53	54,2	1,68	0,45	73,2
3	-1	+1	3,0	-4,89	263,0	0,22	-1,89	959,1
4	+1	+1	1,9	-8,75	560,5	0,40	-1,93	582,5
5	-1,14	0	8,8	8,01	9,0	1,56	1,08	30,8
6	+1,14	0	3,0	-0,61	120,3	0,48	-0,38	179,2
7	0	-1,14	11,4	14,03	-23,1	2,69	3,53	-31,2
8	0	+1,14	1,7	-4,19	346,5	0,78	-0,59	175,6
9	0	0	10,3	10,13	1,7	2,38	2,38	0,0
10	0	0	10,6	10,13	4,4	2,48	2,38	4,0
11	0	0	10,8	10,13	6,2	2,53	2,38	5,9

Trat. = Tratamento; [Glic.] = Concentração de glicose; Obser. = resultados das respostas observadas experimentalmente; Mod. Pre. = resultados do modelo preditivo; e DP = desvio padrão relativo dos resultados.

4. CONCLUSÕES

O crescimento celular no inóculo pode ser otimizado fixando-se as variáveis independentes pH entre 5,4 – 7,5 e concentração de açúcar entre 0 – 18 g/L na região da faixa de otimização.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, M.; ESPINOSA, A.H.; MALAGÓN, D.R.; MORENO, N.S. Producción de poli-β-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.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A.K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v.40, n.2, 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.
- OLIVEIRA, C. **Produção de polihidroxibutirato: bioprospecção de *Beijerinckia* sp. da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CDTec - UFPEL**. 2010. 96f. Dissertação (Mest. em Biotecnologia) – PPGB, UFPEL.
- PIEMOLINI, L.T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *Chromobacterium violaceum* para estudos de mutação sítio-dirigida**. 2004. 79f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – DEQEA, UFSC.
- 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**. APS Press, 2001, 3ª Ed.