

Influência do pH e fonte de carbono na fase de multiplicação celular para a produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* CN3

MARIANE IGANSI ALVES¹; KARINE LASTE MACAGNAN², CAMILA RIOS
PIECHA², MATHEUS MARQUES TORRES², PATRÍCIA DIAZ DE OLIVEIRA^{1,2},
ANGELITA DA SILVEIRA MOREIRA^{1,2,3*}

¹PPGCTA- Universidade Federal de Pelotas – marianeigansialves@hotmail.com

²CDTec- Universidade Federal de Pelotas – karinemacagnan@hotmail.com;
camilapiecha@gmail.com; matheus_mtt@hotmail.com; bilicadiaz@yahoo.com.br;
angelitadasilveiramoreira@gmail.com

³CCQFA- Universidade Federal de Pelotas – angelitadasilveiramoreira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A ampliação das áreas urbanas vem, cada vez mais, impactando negativamente o ambiente. Em tais áreas, aspectos culturais, como consumo exagerado de produtos industrializados e água potável, aliados à elevada produção de resíduos, causam graves prejuízos e impactos ambientais (MUCELIN e BELLINI, 2008). O crescente interesse científico e popular pela área de preservação ambiental, associado ao da área industrial pela continuidade do crescimento de consumo de plásticos, têm tornado necessários a pesquisa e o desenvolvimento de substitutos ecologicamente corretos (LUVIZETTO, 2007).

Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres biodegradáveis sintetizados por inúmeros microrganismos e armazenados em formas de inclusões citoplasmáticas para a reserva de energia (HOLMES, 1985). São plásticos de elevado ponto de fusão, baixa rigidez, alta resistência à pressão, resistência ao alongamento antes da ruptura e forte resistência ao impacto, de variada aplicação (POIRIER et al., 1995). O Poli(3-hidroxibutirato) [(P3HB)] é o PHA mais estudado (CHANPRATEEP, 2010). PHAs podem ser obtidos em grande escala através de bioprocessos (PIEMOLINI, 2004). Porém, a produção de PHAs em escala para aplicação industrial não é, ainda, economicamente favorável para substituir os plásticos derivados do petróleo na maioria das suas aplicações (KHANNA & SRIVASTAVA, 2005; LU et al., 2009; REDDY et al., 2009).

Bacillus megaterium foi o primeiro microrganismo no qual foi identificado corpos de inclusão constituídos de PHAs, mais especificamente P(3HB). Tem sido amplamente utilizado para a produção de diferentes bioprodutos, como a penicilina sintética e a vitamina B₁₂ (FACCIN, 2012). Pode ser encontrado em abundância em solos diversos e possui a grande vantagem de crescer em diversas fontes de carbono e também ser capaz de produzir o bioplástico utilizando resíduos agroindustriais (LUVIZETTO, 2007). *B. megaterium* apresenta características interessantes para sua utilização no processo de produção industrial de bioplástico, tais como a tolerância às altas temperaturas e pressão osmótica, tornando o processo mais estável, ainda que com pequenos distúrbios, e rápido crescimento celular (FACCIN, 2013).

Com isso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do pH inicial e a fonte de carbono (sacarose ou glicose) na fase de multiplicação celular para posterior utilização na produção de P(3HB) por *B. megaterium* CN3.

2. METODOLOGIA

A cepa de *B. megaterium* CN3 usada foi isolada no Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas. A bactéria foi preservada por técnicas de liofilização a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e também por requipes mensais utilizando *Nutritive Yest Agar* (NYA) (SCHAAD, 2001) composto por: peptona (Kasvi®), $5,0\text{ g.L}^{-1}$; extrato de levedura (Kasvi®), $1,0\text{ g.L}^{-1}$; extrato de malte (Kasvi®), $3,0\text{ g.L}^{-1}$; glicose (Synth®) $5,0\text{ g.L}^{-1}$; ágar (Kasvi®), 15 g.L^{-1} , sob refrigeração a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O processo foi conduzido em Erlenmeyer de 250 mL totalizando um volume de 100 mL com o meio de cultivo YM modificado (JEANS, 1974) composto por: extrato de levedura (Kasvi®) $2,7\text{ g.L}^{-1}$; extrato de malte (Kasvi®), $2,7\text{ g.L}^{-1}$; peptona (Kasvi®), $4,5\text{ g.L}^{-1}$. O inóculo, com a densidade óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 0,5 abs, foi obtido através da suspensão das células frescas oriundas do repique multiplicativo com NYA sólido por 72 h a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$. O experimento foi conduzido em agitador incubador orbital a 250 rpm por 24 h.

No experimento foi avaliado a fonte de carbono (sacarose ou glicose) e o pH inicial para a fase de multiplicação celular. As concentrações de sacarose selecionada foram: 15, 30 e 45 g.L^{-1} com um pH inicial de 7,2. Já para a glicose foram selecionados a concentração de 10, 30 e 50 g.L^{-1} , com pH inicial de 5,5 (MACAGNAN et al., 2017) e nitrogênio inicial de $0,15\text{ g.L}^{-1}$. O ajuste do pH foi realizado utilizando quando necessário uma solução de 2M de HCl ou NaOH. Ao final do processo, as análises realizadas foram de $\text{DO}_{600\text{nm}}$, utilizando o espectrofotômetro (Ultrospec10®, Reino Unido), pH (Tecnopom® mPA 210, Brasil), redução de açúcares utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959) expresso em g.L^{-1} e nitrogênio residual, utilizando kit comercial Urea CE (LabTest®), expresso em g.L^{-1} . Todo o experimento foi realizado em triplicata. Para a análise estatística foi utilizado o teste de ANOVA (Statistix 9.0) considerando com significância pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os resultados após 24h de fermentação.

Tabela 1. $\text{DO}_{600\text{nm}}$, pH final, açúcar e nitrogênio residuais na fase de multiplicação celular após 24h, usando fonte de carbono e pH inicial diferentes.

Fonte de carbono (g.L^{-1})	pH	$\text{DO}_{600\text{nm}}$ (abs)	pH final	Açúcar residual (g.L^{-1})	Nitrogênio residual (g.L^{-1})
[Sacarose]	15	$6,1^{\text{d}} \pm 0,09$	$4,7^{\text{a}} \pm 0,01$	$8,5^{\text{c}} \pm 0,01$	$0,13^{\text{c}} \pm 0,01$
	30 7,2	$8,2^{\text{a}} \pm 0,08$	$4,7^{\text{a}} \pm 0,01$	$13,2^{\text{a}} \pm 0$	$0,10^{\text{c}} \pm 0$
	45	$6,7^{\text{c}} \pm 0$	$4,7^{\text{a}} \pm 0,01$	$9,4^{\text{ab}} \pm 0,02$	$0,10^{\text{bc}} \pm 0,02$
[Glicose]	10	$7,0^{\text{b}} \pm 0,01$	$4,3^{\text{b}} \pm 0,03$	$9,8^{\text{bc}} \pm 0,02$	$0,005^{\text{ab}} \pm 0$
	30 5,5	$5,7^{\text{e}} \pm 0,01$	$4,1^{\text{b}} \pm 0,03$	$13,2^{\text{a}} \pm 0$	$0,005^{\text{a}} \pm 0,01$
	50	$2,2^{\text{f}} \pm 0,01$	$4,3^{\text{b}} \pm 0,03$	$10,0^{\text{bc}} \pm 0,01$	$0,004^{\text{abc}} \pm 0,02$

*Letras sobrescritas iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística pelo teste de Tukey $p > 0,05$.

A $\text{DO}_{600\text{nm}}$, foi maior quando utilizou-se a concentração mediana de sacarose, 30 g.L^{-1} ($8,2 \pm 0,08$ abs), e menor com a maior concentração de glicose, 50 g.L^{-1} ($2,2 \pm 0,01$ abs). Em todas as condições testadas, o pH diminuiu ao final das 24 h, porém houve menor redução (pH final $4,7 \pm 0,01$) quando utilizado a

sacarose como fonte de carbono. Não observou-se relação entre a DO_{600nm} e a redução do pH. O açúcar residual foi bastante semelhante em ambas fontes de carbono, tendo os resíduos variado de $13,2 \pm 0 \text{ g.L}^{-1}$ (sacarose e glicose) até $8,5 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$ (sacarose). O nitrogênio residual foi baixo em todas as situações, especialmente o se utilizar glicose, ficando em torno de $0,005 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$.

Os dados encontrados na literatura, em sua maioria são referentes à fase de produção do biopolímero, e não à fase de crescimento celular, com isso não é possível uma comparação adequada. Mas para *Ralstonia solanacearum* RS, Macagnan e colaboradores (2011) utilizaram um delineamento composto central rotacional 2^2 (DCCR 2^2) para avaliarem a influência do pH e das fontes de carbono sacarose ou glicose na fase de multiplicação celular para posterior produção de P(3HB). Semelhantemente, também verificaram que a sacarose ocasionou os melhores resultados, sendo a concentração de 40 g.L^{-1} e pH 6,0 a melhor combinação. Ao avaliar o crescimento de linhagens de *Burkholderia sacchari* em meio não definido suplementado com diferentes açúcares, Souza, et.al (2011) observaram resultados equivalentes ao usarem glicose e sacarose. A linhagem LFM 026 teve DO_{600nm} mais elevada, sendo 13,71 e 13,63, para glicose e sacarose, respectivamente. Já a linhagem LFM 101 resultou em valores menores, 5,40 na glicose e 6,61 na sacarose.

Quanto ao pH inicial, Ramadas e colaboradores (2009), além de testar diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono, testaram diferentes valores de pH (5,0 a 8,0) para o cultivo da linhagem *Bacillus sphaericus* 5149. A alteração inicial do pH no meio de cultivo mostrou uma forte influência sobre a produção de P(3HB). Mesmo uma pequena diferença de pH do ponto ideal causou uma redução brusca no acúmulo. Nesse trabalho, o meio com pH inicial de 7,5 resultou em aumento de P(3HB) de até 25%. Assim, outras faixas de pH serão avaliadas para o microrganismo do nosso estudo, *B. megaterium* CN3.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a melhor concentração da fonte de carbono para a fase de multiplicação celular para a produção de P(3HB) por *B. megaterium* CN3 é a sacarose na concentração mediana de 30 g.L^{-1} .

Futuramente serão avaliadas outras faixas de pH inicial e os dados obtidos serão utilizados para o estudo na fase de produção do biopolímero.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621-632, 2010.
- FACCIN, D. J. L.; RECH, R.; SECCHI, A. R.; CARDOZO, N. S. M.; AYUB, M. A. Z.; Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 420–425, 2013.
- FACCIN, D. J. L. **Avaliação de condições de cultivo para aumento de produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* e modelagem do bioprocesso**. Tese (Doutorado em Engenharia). Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, -160f-Porto Alegre, 2012.

- HOLMES, P. A. Applications of PHB- A microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physical Technology**, v. 16, p. 32-36, 1985.
- JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, p. 34-40, 1974.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A.K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607-619, 2005.
- LU, J. N.; TAPPEL, R. C.; NOMURA, C. T. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). **Polymer Reviews**. v.49, n. 3. p. 226-248, 2009.
- LUVIZETTO, D. J. **Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero Poli(3-hidroxibutirato) e modelagem matemática do bioprocesso**. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS-119f.-, Porto Alegre, 2007.
- MACAGNAN, K. L.; ALVES, M. I.; RODRIGUES, A. A.; FURLAN, L.; RODRIGUES, R. S. da.; OLIVEIRA, P. D. de.; VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S. da. Complete factorial design to adjust pH and sugar concentrations in the inoculum phase of *Ralstonia solanacearum* to optimize P(3HB) production, **Plos One**, v. 12, p. e0180563, 2017.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959
- MUCELIN, C. A.; BELLINI, M. Lixo e impactos ambientais perceptíveis no ecossistema urbano. **Sociedade & Natureza**, v. 20; n. 1, p. 111-124, 2008.
- 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, Santa Catarina, 2004.
- POIRIER, Y.; NAWRATH, C.; SOMERVILLE, C. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers in bacteria and plants. **Biotechnology**, v.13, p.142-150, 1995.
- RAMADAS, N. H.; SINGH, S. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 52, n. 1, p. 17-23, 2009.
- REDDY, S.; THIRUMALA, M.; MAHMOOD, S. A novel *Bacillus* sp. Accumulating poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from a single carbon substrate. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 837-843, 2009.
- SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. **APS Press**, pp. 373, 2001.
- SOUZA, E. L.; GONÇALVES, F. A.; FONSECA, G. G.; **Avaliação do crescimento de *Burkholderia sacchari* em diferentes açúcares**; II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – II SIGERA; 15-17 de Março de 2011; Foz do Iguaçu- PR.