

Efeito do pH e sacarose no acúmulo de P(3HB) por *Bacillus megaterium* CN3 utilizando DCCR 2²

Mariane Igansi Alves¹; Karine Laste Macagnan²; Camila Rios Piecha²; Matheus Marques Torres²; Rosane da Silva Rodrigues³; Angelita da Silveira Moreira^{1,2,3}

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

² CDTec- Universidade Federal de Pelotas– karinemacagan@hotmail.com;
camilapiecha@gmail.com; matheus_mmt@hotmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

Produtos de origem petroquímica estão entre os maiores causadores de poluição ambiental (CAMPOS et al., 2014). Devido a esse sério problema, medidas de conscientização global estão sendo encorajadas para que o processo de obtenção e os produtos sejam mais sustentáveis, como foi o caso da França em 2016, que proibiu os materiais plásticos que não continham no mínimo 50 % da sua composição biodegradável (FRANÇA, 2016); e o Brasil que recentemente através do projeto de lei nº 92 de 2018 tem como objetivo a completa eliminação do plástico destinado ao acondicionamento e ao manejo de alimentos prontos para o consumo (BRASIL, 2018).

Entre os biopolímeros estudados ao longo dos anos, o poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)], poliéster microbiano intracelular utilizado como reserva de energia e produzido usando fontes de carbono renováveis, vem recebendo destaque por ser bom substituto dos plásticos de origem petroquímica, juntamente com outros polihidroxialcanoatos (PHAs) (KULPREECHA et al., 2009; PANDIAN et al., 2010). Além de serem biodegradáveis, possuem características mecânicas similares aos inúmeros termoplásticos utilizados atualmente (FACCIN et al., 2013; ALVES et al., 2017).

Bacillus megaterium foi o primeiro microrganismo no qual foi identificado corpos de inclusão constituídos de PHAs, mais especificamente P(3HB). 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).

Existem vários fatores que influenciam no processo de produção de P(3HB), desde os componentes de meio de cultura até as condições operacionais de cultivo, como pH, temperatura, entre outros. Para auxiliar na melhoria desses bioprocessos, os Delineamentos Compostos Centrais Rotacionais (DCCR) permitem testar um maior número de variáveis em menor tempo, aumento a eficiência dos experimentos.

Com isso, o objetivo do trabalho foi melhorar a produção do P(3HB) utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR 2²) avaliando o efeito do pH e sacarose na fase de crescimento celular.

2. METODOLOGIA

Utilizou-se *Bacillus megaterium* CN3, isolada de solo, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Biopolímeros da unidade de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico- CDTec da Universidade Federal de Pelotas. A

bactéria tem sido preservada por dois métodos: liofilização e congelamento a -80°C .

Foi realizado um DCCR 2², com quatro pontos axiais e três pontos centrais, totalizando 11 tratamentos (Tabela 1). Inoculou-se o pré-inóculo, com 0,5 abs ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de suspensão bacteriana crescidas por 72 h à 36°C no meio de cultivo *Nutritive Yest Agar* (NYA) (SCHAAD et al., 2001), em frascos *Erlenmeyers* de 250 mL com um volume total de meio de cultivo de 100 mL de *Yest Malt* (YM) (JEANES, 1974). Incubou-se nas condições de 36°C a 150 rpm por 24 h em agitador incubador orbital (Certomat® BS-1, Alemanha) avaliando ao final do processo a densidade óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$), utilizando o espectrofotômetro (Ultrospec10®, Reino Unido), o pH (Tecnopom® mPA 210, Brasil), a redução de açúcares utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959) expresso em g L^{-1} , a massa celular seca (MCS) por gravimetria e o 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 apresenta os resultados do crescimento celular ($\text{DO}_{600\text{nm}}$, pH, MCS, consumo de açúcar e nitrogênio) obtidos no DCCR 2² com pH (5,7 e 7,3) e fonte de carbono sacarose (15 e 45 g L^{-1}).

Tabela 1. Matriz do planejamento experimental DCCR 2² usando sacarose obtidas na fase de crescimento celular de *B. megaterium* CN3 durante 24 h a 36°C com diferentes variações no meio de cultivo YM modificado.

Trat.	Variáveis independentes			Variáveis dependentes			
	pH inicial	[Sacarose] (g L^{-1})	pH final	$\text{DO}_{600\text{nm}}$	MCS (g L^{-1})	Consumo de açúcar (g L^{-1})	Consumo de nitrogênio (g L^{-1})
1	-1 (5,8)	-1 (15)	4,5	4,4	0,15	8,9	0,11
2	+1 (7,2)	-1 (15)	4,7	6,7	1,2	8,46	0,13
3	-1 (5,8)	+1 (45)	4,4	5,0	1,2	12,4	0,11
4	+1 (7,2)	+1 (45)	4,7	8,2	2,2	13,2	0,09
5	-1.41 (5,7)	0 (30)	4,5	5,4	0,9	11,5	0,10
6	+1.41 (7,3)	0 (30)	4,7	6,7	1,3	9,4	0,09
7	0 (6,5)	-1.41 (12,9)	4,7	3,6	1,0	8,5	0,11
8	0 (6,5)	+1.41 (47,1)	4,9	8,8	2,8	13,4	0,13
9	0 (6,5)	0 (30)	5,0	6,4	2,5	12,1	0,10
10	0 (6,5)	0 (30)	5,0	6,7	2,6	12,1	0,09
11	0 (6,5)	0 (30)	4,7	6,5	2,5	11,5	0,10

De acordo com a Tabela 1, quando o pH inicial encontrava-se mais perto da neutralidade foram obtidos valores de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ mais elevados, sendo que os tratamentos 4 (+1, +1) e 8 (0, +1,41) tiveram as maiores absorbâncias, 8,2 e 8,8 abs, respectivamente. A MCS variou de $0,15 \text{ g L}^{-1}$, no tratamento 1 (-1,-1), a $2,8 \text{ g L}^{-1}$, no tratamento 8 (0, +1.41). De modo geral, os níveis -1.41 e -1 de pH e/ou sacarose foram desfavoráveis à MCS, e houve uma correlação direta entre $\text{DO}_{600\text{nm}}$ e MCS. Pode-se observar que em todos os tratamentos houve uma redução do pH

ao final do processo comparativamente ao pH inicial, com pequena variação entre os valores finais (4,4 a 5,0). O consumo de açúcar ao final das 24 h variou entre 8,46 g L⁻¹ (+1,-1) e 13,4 g L⁻¹ (0, +1,41), sendo favorecido por uma maior concentração inicial. Os maiores consumos de açúcar foram observados nos tratamentos que resultaram em maiores DO_{600nm}. O consumo de nitrogênio foi baixo, variando entre 0,09 g L⁻¹ e 0,13 g L⁻¹, sem aparente relação com as variáveis concentração de açúcar e pH iniciais.

A concentração do substrato (sacarose) foi o fator determinante ($p \leq 0,05$) da DO_{600nm}, MCS e consumo de açúcar, influenciando positivamente essas respostas; apenas as variáveis dependentes pH final e consumo de nitrogênio não foram afetadas de forma significativa pelas variáveis de pH e concentração de sacarose iniciais, nem sua combinação, com base nos modelos linear e quadrático, não ultrapassando a linha de significância (Figura 1).

Em países como o Brasil, onde a cana-de-açúcar é abundante, a sacarose e seus derivados são substratos de baixo custo e sua utilização como fonte de carbono na produção de PHAs significa economia nos custos de produção (SQUIO e ARAGÃO, 2004), o que torna interessante os resultados utilizando a sacarose como fonte de carbono na fase de multiplicação celular.

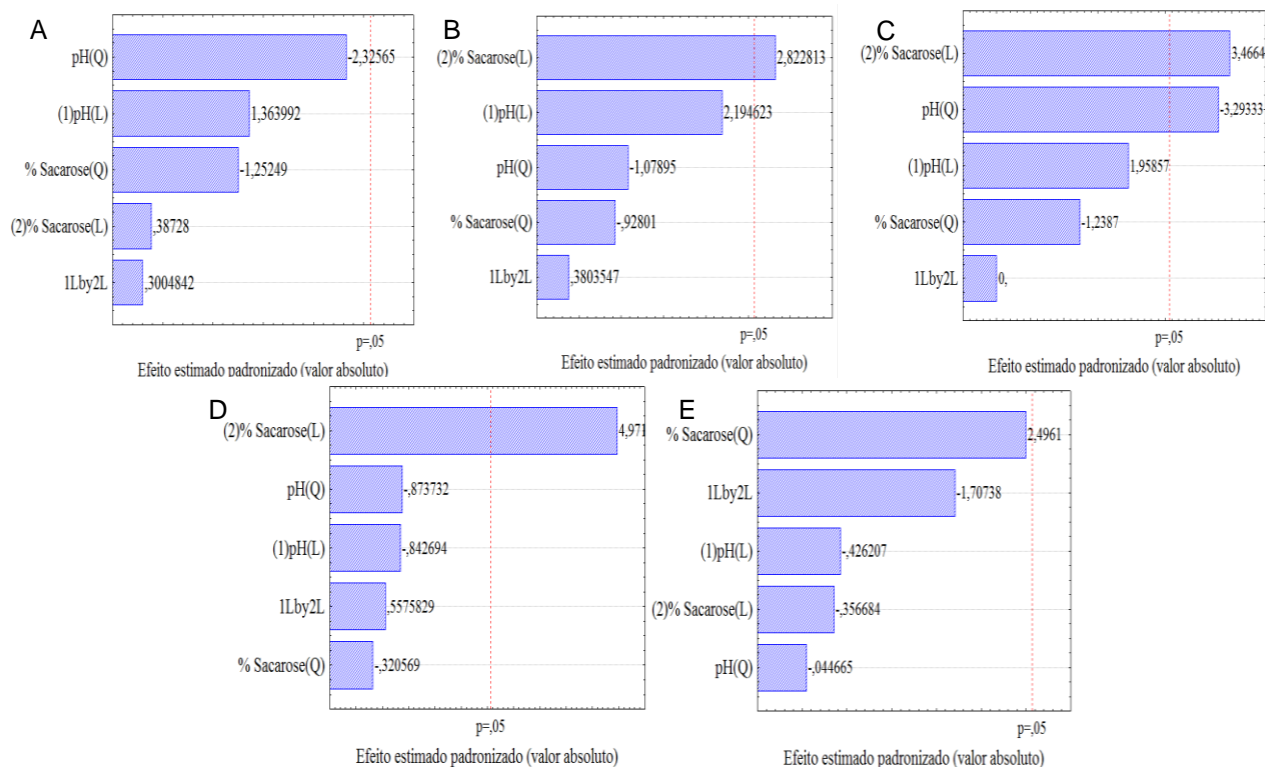


Figura 1. Gráfico de Pareto para (A) pH final, (B) DO_{600nm}, (C) MCS, (D) consumo de açúcar e (E) nitrogênio em função das variáveis independentes pH e concentração de sacarose.

O Gráfico de Pareto é uma técnica utilizada para registrar e analisar informações que permitem a priorização da tomada de decisão. Sua utilização é muito interessante porque sugere em quais erros, atividades ou recursos devem ser prioritariamente concentradas as ações de melhoria (BONDUELLE, 2007).

4. CONCLUSÕES

Na fase de multiplicação celular, o meio de cultivo com a combinação sacarose 47,1 g L⁻¹ e pH 7,2 proporcionou os melhores resultados, DO_{600nm} (8,8 abs) e MCS (2,8 g L⁻¹). Futuramente serão analisados outras fontes de carbono e pH iniciais para o estudo da fase de crescimento, assim como a produção do biopolímero.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M. I.; MACAGNAN, K. L.; RODRIGUES, A. A.; ASSIS, D. A. de, TORRES, M. M.; de OLIVEIRA, P.D.; FURLAN, L.; VENDRUSCOLO, C.T.; MOREIRA, A da S. Poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB): Review of production process Techniques. **Industrial Biotechnology**, v.13, n. 4, p.192-208, 2017.
- BONDUELLE, G. **Qualidade total na gestão florestal. Material didático do curso de especialização à distância em gestão florestal**. Universidade Federal do Paraná, PECCA, Curitiba, p. 205, 2007.
- BRASIL. Decreto nº 92 de 07 de março de 2018. Disponível em: <<https://legis.senado.leg.br/sdleg-getter/documento?dm=7642998&ts=1548944486331&disposition=inline>>, acesso em 12/09/2019.
- CAMPOS, M. I.; FIGUEIREDO, T. V. B.; SOUSA, L. S.; DRUZIAN, J. I. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations. **Industrial crops and products**, v, 52, p. 338-346, 2014.
- 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.
- FRANÇA. Decreto nº 2016-1170 de 30 de agosto de 2016. Disponível em: <<https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2016/8/30/DEVP1604757D/jo/texte>>, acesso em 12/09/2019.
- JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides- New hydrocolloids of 19 interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, pp. 34-40, 1975.
- 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.
- KULPREECHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N.; Inexpensive fed-batch cultivation for high for poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 3, p. 240-245, 2009.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.
- PANDIAN, S. R.; DEEPAK, V.; KALISHWARALAL, K.; RAMESHKUMAR, N.; JEYAREAI, M.; GURUNATHAN, S. (2010). Optimization and fed-batch production of P3HB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. **Bioresource Technology**, v. 2, n. 101, p. 705-711, 2010.
- SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. **APS Press**, p. 373, 2001.
- SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M. F. Cultivation strategies for production of the biodegradable plastics poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by bacteria. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 615-622, 2004.