

# INFLUÊNCIA DE ESTRATÉGIAS TAMPONANTES NA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO P(3HB) POR *Prestia megaterium*

X. RODRIGUEZ<sup>1</sup>, P.A MORAES<sup>1</sup>, D. J. L. FACCIN<sup>1</sup>, N. S. M. CARDOZO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Engenharia Química  
E-mail para contato: xilena.rodriguez@ufrgs.br

**RESUMO** – O poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) é um biopolímero biodegradável de base biológica produzido por diversas bactérias. Considerando-se que o pH do meio de cultivo é um fator que influencia diretamente na atividade enzimática, e portanto, na taxa de crescimento e produção de metabólitos, avaliou-se estratégias de tamponamento, visando determinar a melhor condição de pH que favoreça a síntese do P(3HB) por *P. megaterium*. Para isso, foram realizados cultivos em estufa incubadora rotatória com diferentes estratégias de tamponamento. As estratégias de tamponamento utilizadas foram: pH inicial de 7 e pH inicial de 6, testando-se nos dois casos duas concentrações iniciais de tampão, tendo uma o dobro do poder tamponante da outra. Os resultados deste trabalho mostram que a melhor estratégia tamponante entre as testadas foi a correspondente pH inicial de 7 com quantidade menor de tampão, que apresentou a maior produção de P(3HB) por *P. megaterium* com 56,3 % em 20 horas de cultivo.

## 1 INTRODUÇÃO

O poli(3-hidroxibutirato), P(3HB), é um poliéster de base biológica biocompatível e biodegradável, pertencente aos polihidroxialcanoatos (PHAs). Este é acumulado intracelularmente por uma ampla gama de gêneros microbianos como fonte de carbono/energia. O P(3HB) representa uma alternativa promissora e sustentável frente aos plásticos de origem petroquímica. No entanto, o custo elevado de produção ainda representa uma barreira para o uso mais extensivo do P(3HB) e outros biopolímeros.

Diversos microrganismos possuem a capacidade de sintetizar PHA na última fase do crescimento celular. Estes corpos de inclusão têm sido investigados em diferentes isolados bacterianos, tanto em bactérias Gram positivas como Gram negativas (Rehm, 2003), das quais se destaca *Prestia megaterium*, antigamente *Bacillus megaterium* (Gupta et al., 2020), devido a sua estabilidade genética e capacidade de produção de P(3HB) em diversos substratos. No caso da produção de P(3HB) por *Prestia megaterium*, o pH do meio de cultivo é uma variável importante no processo, pois influencia diretamente a atividade enzimática. Sabendo-se que: este microrganismo pode produzir P(3HB) em uma ampla faixa de pH (6–9); em certas faixas de pH, uma parcela do polímero produzido pode ser consumido para formação de esporos (Mohanrasu et al., 2020; Bhatia et al., 2018). Uma das formas de manter o pH do meio

adequado é através de diferentes estratégias de tamponamento, auxiliando na estabilidade para a síntese do P(3HB).

Assim, esforços visando o conhecimento da influência do pH, assim como de outros parâmetros de processo (temperatura, velocidade de agitação, etc.), podem desempenhar um papel crucial na otimização do bioprocessamento e, desta forma, no aumento da competitividade de biopolímeros via redução do custo de produção. Até o momento, a influência do tampão nos cultivos ainda carece de estudos. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência do tampão em cultivos para produção de P(3HB) por *P. megaterium* por meio de variações nas estratégias de tamponamento em cultivos para a produção de P(3HB).

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Microrganismo e meio de cultivo mineral

Neste estudo foi utilizada a bactéria *Priestia megaterium* DSM 32T. A cepa foi armazenada e congelada em solução crioprotetora 25% de glicerol. A reativação celular, pré-inóculo, foi efetuada em cultivo por 16 h. O meio mineral (Lee, 1996) foi composto por:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 9  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,01  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; ácido cítrico, 0,1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , suplementado com 1 mL de solução de micronutrientes (  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,03  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,3  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,01  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,03  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,03  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{NiSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,03  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Sacarose (16  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e sulfato de amônio (2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) foram suplementados como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente (Faccin *et al.*, 2009).

### 2.2 Experimentos em estufa incubadora

Os experimentos em estufa incubadora rotatória foram realizadas em frascos contendo 50 mL de meio mineral estéril, utilizando alíquotas de inóculo padronizadas, na proporção de 2% em volume de meio de cultivo. Os frascos inoculados, continham diferentes quantidades de sais de fosfato a fim de se obter composições adequadas para as diversas estratégias de tamponamento, sendo elas: (i) pH inicial de 7  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  nas concentrações utilizadas em trabalhos prévios de nosso grupo (25,36/11,02 mM ou 3,60/1,50 g); (ii) pH inicial de 7 com o dobro do poder tamponante, com proporção  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  de 52,6/19,7 mM ou 7,47/2,68 g; (iii) pH inicial de 6 com proporção  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  de 7,11/29,19 mM ou 1,01/3,97 g; e (iv) pH inicial de 6 com o dobro do poder tamponante, com proporção  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  de 16,22/56,38 mM ou 2,30/7,67 g. Para facilidade de referência, os experimentos realizados de acordo a estas estratégias de tamponamento serão, deste ponto em diante, designados como pH inicial 7, pH inicial 7 dobro, pH inicial 6 e pH inicial 6 dobro, respectivamente. Todos experimentos foram realizados em duplicata com velocidade de agitação de 180 rpm, a temperatura foi mantida a 30 °C, por períodos de 18, 20, 22, 24 e 26 horas.

### 2.3 Procedimentos analíticos

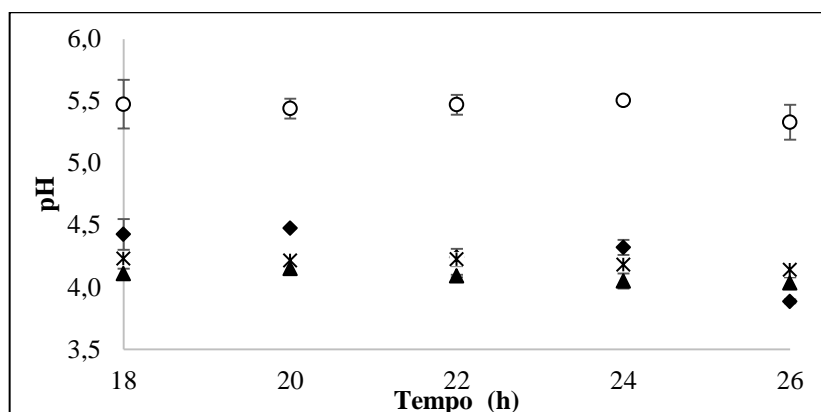
A biomassa total foi determinada por meio de medidas gravimétricas, utilizando-se 15 mL de solução do meio de cultivo, centrifugados a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, posteriormente lavadas com água destilada e secadas até peso constante a 80 °C. A determinação de pH foi realizada imediatamente após a retirada das amostras da estufa incubadora. Para a quantificação da sacarose foi realizada a determinação das concentrações de frutose e glicose, dada a clivagem da sacarose, por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), utilizando coluna Rezex RHM H+ e detector de índice de refração. O

nitrogênio consumido foi determinado pela reação fenol-hipoclorito (Weatherburn, 1967) com leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda 625 nm. O P(3HB) produzido foi quantificado pelo método descrito por Karr, Waters e Emerich (1983), que consiste na dissolução da membrana celular e hidrólise do P(3HB) a ácido crotonico identificado por detector de arranjo de diodo (DAD), utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Agilent, modelo 1200 Infinity, com uma coluna Rezex RHM H+, utilizando como eluente solução de ácido sulfúrico (4 mM) a 60 °C. A biomassa residual foi estimada pela diferença entre a biomassa total e o teor de P(3HB). Todos os procedimentos analíticos foram realizados em duplicata.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação das curvas de pH observamos que em 18 h de cultivo o pH atingiu um valor aproximadamente constante, sendo maior para a condição de pH inicial 7 dobro. Este resultado pode ser explicado dado o mecanismo de atuação do tampão, visto que, com o dobro do poder tamponante, a solução tem capacidade de neutralizar uma maior quantidade de ácido. O desvio máximo para os dados de pH foi de 0,195. Na Figura 1 são apresentados os valores médios de pH entre as duplicatas para cada cultivo e o desvio padrão.

Figura 1: Evolução do pH com o tempo de cultivo (♦)pH inicial 7 (○)pH inicial 7 com dobro de poder de tamponamento (\*)pH inicial 6 (▲)pH inicial 6 com dobro de poder de tamponamento.

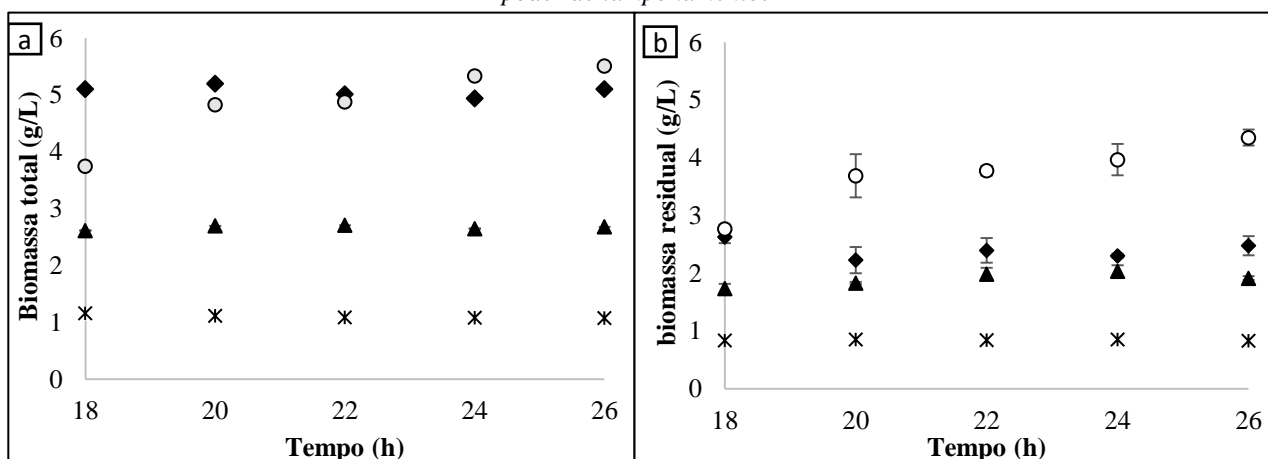


O crescimento celular no meio, durante o cultivo, foi avaliado por intermédio das curvas de concentração de biomassa total e biomassa residual em função do tempo, mostradas na Figura 2a e 2b, respectivamente. A biomassa residual corresponde à diferença entre a quantidade de biomassa total e a de P(3HB) contido nesta. O desvio padrão máximo para os dados de biomassa total e biomassa residual, foram de 0,0081 g/L e 0,3736 g/L, respectivamente.

Por meio da Figura 2a, podemos observar que, para os cultivos com o pH inicial 7 e pH inicial 7 dobro, foram obtidas concentrações semelhantes de biomassa total, sendo estas maiores que em ambos cultivos com pH inicial 6. Cabe salientar que no caso do pH inicial 7 dobro, essa concentração apresenta uma tendência de subida, evidenciando que esta condição não está causando limitação de crescimento, efeito mais pronunciado na curva de biomassa residual. Também, pela análise dos resultados apresentados na Figura 2b, nota-se que a biomassa residual no cultivo com pH inicial 7 dobro é maior. Justifica-se isso pela manutenção em pH adequado para crescimento por tempo superior, dado o efeito do tampão. Para os casos de pH 6, observamos que o crescimento celular também é maior na condição com o dobro do poder tamponante. Isto pode ser atribuído a que nesta condição o meio

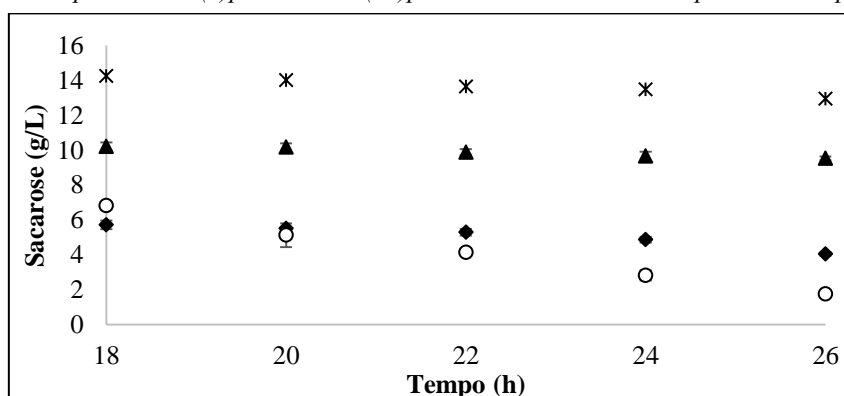
mantém o pH mais afastado da condição limite por período mais longo de cultivo, mesmo que a partir do tempo onde iniciaram-se as coletas das amostras (18 h), os valores de pH alcançados estejam muito próximos (Figura 1).

Figura 2: Evolução da concentração de biomassa total e biomassa residual com o tempo de cultivo (♦)pH inicial 7 (○)pH inicial 7 com dobro de poder de tamponamento (\*)pH inicial 6 (▲)pH inicial 6 com dobro de poder de tamponamento.



Para os aspectos que tangem as concentrações de açúcares remanescentes no meio de cultivo após as 18 horas de cultivo (Figura 3), o desvio padrão máximo foi de 0,6772 g/L. Observa-se que o consumo de sacarose foi maior para a estratégia de pH inicial 7 dobro, pois a *P. megaterium* utiliza a maior parte do açúcar disponível para a via metabólica de crescimento celular, já que manteve uma condição de pH ideal para o crescimento. Na condição de pH inicial 7, o consumo de sacarose foi menor, o que pode ser atribuído a que em um pH menor (condição mais estressante para o microrganismo) a sacarose disponível no meio é utilizada para produzir P(3HB) intracelularmente como reserva de carbono e energia. Já nas estratégias de tamponamento para pH 6, observamos um consumo maior do açúcar na condição com o dobro de poder tamponante, condizente com a diferença apresentada no crescimento de microrganismo nos cultivos com pH inicial 6.

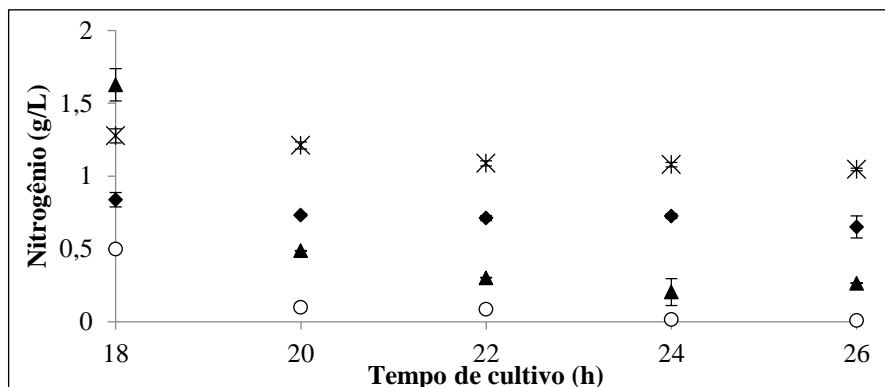
Figura 3: Evolução do consumo de sacarose com o tempo de cultivo (♦)pH inicial 7 (○)pH inicial 7 com dobro de poder de tamponamento (\*)pH inicial 6 (▲)pH inicial 6 com dobro de poder de tamponamento.



Os valores obtidos para o consumo de nitrogênio nas diferentes estratégias de tamponamento são mostradas na Figura 4, onde é possível observar que ocorreu limitação de nitrogênio no cultivo com pH inicial 7 dobro. Na estratégia de pH inicial 6 dobro se observa um maior consumo de nitrogênio comparado com as estratégias de pH inicial 7 e pH inicial 6,

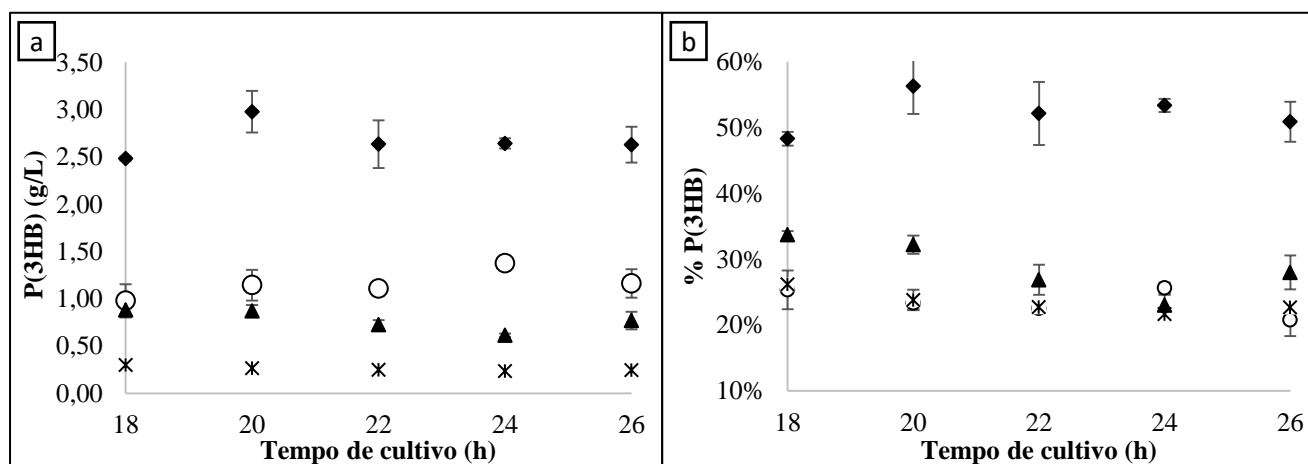
sendo que este último apresentou o menor consumo de nitrogênio presente no meio de cultivo.

Figura 4: Consumo de nitrogênio com o tempo de cultivo (♦)pH inicial 7 (○)pH inicial 7 com dobro de poder de tamponamento (\*)pH inicial 6 (▲)pH inicial 6 com dobro de poder de tamponamento.



Os valores obtidos de acúmulo de P(3HB) para cada condição de pH estão apresentados na Figura 5, sendo expressos em termos de concentração de espécie (Figura 5a) e percentual (Figura 5b) de P(3HB) acumulado na célula. Os desvios padrões médios obtidos foram de 0,2511 g·L<sup>-1</sup> e 4,80 %, para os dados de concentração e porcentagem do P(3HB), respectivamente. Observa-se que a maior produção foi alcançada para o cultivo com pH inicial 7, com uma produção de 2,8 g·L<sup>-1</sup> e 56,3% de polímero acumulado em 20 horas de cultivo, contrariamente ao resultado observado para a biomassa residual, onde o maior resultado foi alcançado pelo pH inicial 7 dobro, que apresentou uma produção de 1,37 g·L<sup>-1</sup> e 25,6% de acúmulo de polímero em 24 horas de cultivo. Isto indica que embora a biomassa total para os cultivos com pH inicial 7 e 7 com dobro de poder tamponante tenham sido semelhantes, para fins de produção de P(3HB) a estratégia com pH inicial 7 é mais adequada. Para os resultados de produção de P(3HB) para as estratégias com pH inicial 6 e pH inicial 6 dobro, o maior acúmulo de P(3HB) foi 26,2% e 33,7% em 18 horas de cultivo respectivamente.

Figura 5: Evolução da concentração e percentual de P(3HB) com o tempo de cultivo (♦)pH inicial 7 (○)pH inicial 7 com dobro de poder de tamponamento (\*)pH inicial 6 (▲)pH inicial 6 com dobro de poder de tamponamento.



Analisando-se os gráficos em conjunto observa-se que o valor de pH baixo alcançado no cultivo com pH inicial 7, quando comparado ao cultivo de pH inicial 7 dobro, pode gerar

uma condição de estresse para o microrganismo. Tal condição poderia explicar um desvio de acetil coenzima-A maior para a via responsável pela síntese de P(3HB), como forma de reserva de energia, em detrimento do consumo de carbono para crescimento celular. No caso do pH inicial 7 dobro, o microrganismo se encontra em um pH menos estressante, permanecendo com prioridade para via metabólica de crescimento, consumindo a sacarose e gerando células, e assim, sintetizando uma quantidade menor de P(3HB) (Figura 3, Figura 4). A menor produção de P(3HB) nos cultivos com pH inicial 6 e pH inicial 6 dobro indica que o maior afastamento da condição ideal de pH geraria um estresse excessivamente elevado, desviando o metabolismo restringindo e reduzindo a produção de biomassa.

## 4 CONCLUSÃO

Foram testadas quatro diferentes estratégias de tamponamento. A maior produção de P(3HB) foi obtida avaliado foi na condição de pH inicial 7 com 36.4 mM de poder tamponante, enquanto a condição inicial mais favorável para produção de biomassa foi a de pH inicial 7 com 72.3 mM de poder tamponante. Estas diferenças entre as diferentes estratégias de tamponamento podem ser atribuídas às mudanças de rota metabólica da bactéria em função do pH. Provavelmente, o microrganismo consegue utilizar a fonte de carbono no meio para o crescimento celular enquanto a quantidade de tampão utilizada é capaz de manter o pH em uma faixa próxima da neutra. Em seguida, à medida que a fonte de carbono e nitrogênio são esgotadas e o pH vai diminuindo, é gerada uma situação de maior estresse para o microrganismo, que passa a priorizando a produção de polímero intracelularmente.

## 5 REFERÊNCIAS

- BHATIA SK, KIM JH, KIM MS, KIM J, HONG JW, HONG YG, *et al.* Production of (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) copolymer from coffee waste oil using engineered *Ralstonia eutropha*. *Bioprocess Biosyst Eng*, v. 41(2), p. 229–35, 2018.
- D.J.L. FACCIN, I. MARTINS, N.S.M. CARDOZO, R. RECH, M.A.Z. AYUB, T.L.M. ALVES, *et al.* Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. *J Chem Technol Biotechnol*, v. 84 , p. 1756-1761, 2009.
- GUPTA, R. S.; PATEL, S.; SAINI, N.; et al. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 70, n. 11, p. 5753–5798, 2020.
- KARR, D. B.; WATERS, J. K.; EMERICH, D. W. Analysis of poly-β-hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid-chromatography and uv detection. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 46, p. 1339-1344. 1983.
- LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, n. 1, p. 1–14, 1996.
- M.W. Weatherburn. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem*, v. 39 , p. 971-974, 1967.
- REHM, B. H. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Society*, p.15-33, 2003.