



## X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

*“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”*

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Universidade Severino Sombra  
Vassouras – RJ – Brasil

### **AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE *Cupriavidus necator* APÓS LIOFILIZAÇÃO UTILIZANDO LEITE DESNATADO COMO PROTETOR**

**STEFFEN<sup>1</sup>, W.F.; MARTINHAGO<sup>1</sup>, F.M.; SANTOS<sup>1</sup>, E.C.; QUINES<sup>2</sup>, L.K.M.; ZANFONATO<sup>2</sup>, K.; SCHIMIDT<sup>2</sup>, M.; ARAGÃO<sup>3</sup>, G.M.F.**

<sup>1</sup>Aluno do EQA/CTC/UFSC    <sup>2</sup>Doutorando do EQA/CTC/UFSC    <sup>3</sup>Professor do EQA/CTC/UFSC  
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – Centro Tecnológico  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Endereço – UFSC, Bairro Trindade, Florianópolis, CEP. 88.040-900, SC  
e-mail: glaucia@enq.ufsc.br

**RESUMO** - Este trabalho teve como objetivo comparar a viabilidade da preservação da bactéria *Cupriavidus necator*, utilizando como protetor leite desnatado longa vida esterilizado em autoclave (LDEA) e leite desnatado longa vida comercialmente estéril (LDCE). O leite desnatado longa vida foi esterilizado em autoclave (121 °C/1 minuto) e o leite desnatado longa vida comercialmente estéril foi utilizado diretamente da embalagem, aberto em condições assépticas. Alíquotas de 1 mL do caldo cultivado foram misturadas a um volume de leite, este representando 10 % do volume total, e acondicionados em tubos de vidro seláveis. Os tubos, contendo o caldo cultivado, permaneceram em freezer a -20 °C por 12 h e posteriormente foram liofilizados por 24 h. A viabilidade celular para o caldo protegido com LDEA foi de 7,0 % de sobrevivência, enquanto que para o caldo protegido com LDCE foi de 12,7 %. A viabilidade celular para o caldo cultivado sem adição de leite foi de 0,08 %. Pode-se concluir que o leite desnatado apresentou efeito protetor de *C. necator*. O LDCE possui maior capacidade de proteção durante a liofilização para o microrganismo estudado, mesmo apresentando, para as duas situações testadas, sobrevivência relativamente baixa quando comparada à literatura existente para outras culturas de microrganismos.

**Palavras chave:** preservação de microrganismos, secagem, congelamento.

## **INTRODUÇÃO**

A produção de biopolímeros, como os Poli-hidroxialcanoatos (PHAs), vem sendo amplamente estudada em resposta à preocupação causada pelo acúmulo de plásticos produzidos a partir de fontes não renováveis, como o petróleo. Dentre os PHAs, se destaca o Poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)),

devido às suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade (Rodríguez *et al.*, 2012).

Muitos microrganismos são capazes de sintetizar o P(3HB), sendo *C. necator* o que apresenta condições mais favoráveis à produção industrial, devido à sua capacidade de acumular até 80 % deste biopolímero e de assimilar diferentes fontes de carbono (Hafuka

*et al.*, 2011). Sua adequada preservação mostra-se de fundamental importância para os processos produtivos de P(3HB).

A preservação de microrganismos por diferentes metodologias, como armazenamento em nitrogênio líquido, congelamento e liofilização, é utilizada há décadas. Durante a preservação, é necessário que o microrganismo seja preservado durante um período de tempo tão longo quanto possível e por meio de um método que não permita ou que minimize as alterações em suas características fisiológicas (Cameotra, 2007). A liofilização consiste em uma técnica que utiliza métodos de congelamento e desidratação associados, sob condições de vácuo, removendo água e outros solventes do produto congelado pelo processo de sublimação (Miyamoto-Shinohara *et al.*, 2008).

A fase de crescimento em que a biomassa se encontra quando esta sofre o processo de preservação influencia na viabilidade das células, sendo que as células possuem maiores condições de sobrevivência à preservação na fase estacionária do crescimento, conforme estudo realizado por Corcoran *et al.* (2004).

Este trabalho teve como objetivo comparar a viabilidade da preservação de *Cupriavidus necator*, utilizando como protetores leite desnatado longa vida esterilizado em autoclave (LDEA) e leite desnatado longa vida comercialmente estéril (LDCE), em meio mineral e com as células em fase estacionária de crescimento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Estudo da Cinética do Crescimento em Meio Mineral

O microrganismo utilizado neste estudo foi *C. necator* DSM 545. As células (anteriormente armazenadas em glicerol a -80) foram inoculadas em 150 mL de caldo nutriente (CN), que contém em sua composição peptona de carne (5,0 g.L<sup>-1</sup>) e extrato de carne (3,0 g.L<sup>-1</sup>). Esta cultura foi incubada em agitador orbital, a 35 °C e agitação de 150 rpm. Após 24 horas, 10 % do volume desta foi transferido para uma segunda pré-cultura, que consistiu em CN com mesma composição e volume do primeiro, e incubado

durante 18 horas. Em seguida, uma alíquota de 40 mL serviu de inóculo para 400 mL de volume total de meio mineral, conforme descrito por Aragão (1996), com modificações.

O acompanhamento do crescimento em meio mineral foi realizado através da determinação da absorbância (600 nm) com intervalos de 2 a 4 horas, durante 43 horas, este acompanhamento teve como objetivo a determinação da fase estacionária de crescimento do microrganismo estudado. Plaqueamentos em profundidade foram realizados utilizando CN, estes em triplicata para uma diluição de até 1:10<sup>10</sup>. As placas foram incubadas em estufa microbiológica a 35 °C por 48 horas.

### Leite

O leite utilizado como protetor foi leite desnatado longa vida da marca Parmalat®. O LDEA foi obtido através da esterilização do leite em autoclave a 121 °C durante 1 minuto, e o LDCE foi empregado diretamente da embalagem longa vida, aberto em condições assépticas.

### Avaliação da Viabilidade Celular de *C. necator* Após Liofilização

Com a determinação da duração da fase estacionária de crescimento, um novo cultivo foi realizado (mesmas condições utilizadas para determinar o momento da fase estacionária). Alíquotas de 30 mL foram retiradas após 42 horas de cultivo. Estas amostras foram misturadas com LDEA e LDCE, de modo que o volume do leite representasse 10 % do volume final de mistura (leite + biomassa). Alíquotas de 1,11 mL destas misturas foram acondicionadas em tubos de vidro (8x120x1 mm). Para efeito comparativo da adição do leite no processo, 1 mL de caldo cultivado foi adicionado a tubos de vidro sem adição de leite.

Em seguida, os tubos de vidro permaneceram a -20 °C por 12 horas e posteriormente foram transferidos para câmara de secagem a -50 °C e pressão de 6 mmHg, por 24 horas. O equipamento utilizado foi o liofilizador L101 (Liobras). Após o processo de liofilização, os tubos foram selados com auxílio de maçarico.

Os plaqueamentos foram realizados nas seguintes etapas do processo: em meio mineral com 42 horas de cultivo (MM); após o congelamento (C) e após o processo de liofilização (L), esses plaqueamentos deram-se com o objetivo de determinar as Unidades Formadoras de Colônias por mL de caldo cultivado (UFC.mL<sup>-1</sup>) antes e imediatamente após o processo de liofilização.

A viabilidade celular expressa em % foi calculada através da Equação 1, que considera a população de microrganismos antes do processo, ou seja, o resultado obtido no plaqueamento em meio mineral, e a população de microrganismos depois do processo, tanto para o congelamento quanto para a secagem.

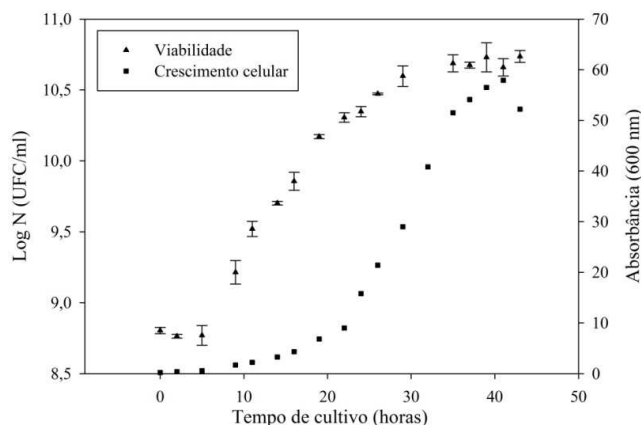
$$\text{Viabilidade}(\%) = \frac{\text{Pop. depois (UFC*ml}^{-1}\text{)}}{\text{Pop. antes (UFC*ml}^{-1}\text{)}} * 100 \quad (1)$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Estudo da Cinética de Crescimento em Meio Mineral

A cinética de crescimento de *C. necator* está apresentada na Figura 1. Observa-se que o início da fase estacionária ocorreu em aproximadamente 36 horas de cultivo e o término da mesma, em 42 horas. A partir de 36 horas, a viabilidade celular se manteve constante, próximo a  $5 \times 10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Conforme exposto por Corcoran *et al.* (2004), a partir do início da fase estacionária de cultivo, as células se encontram em condições mais adequadas para o posterior processo de liofilização, devido à alta concentração celular neste patamar.

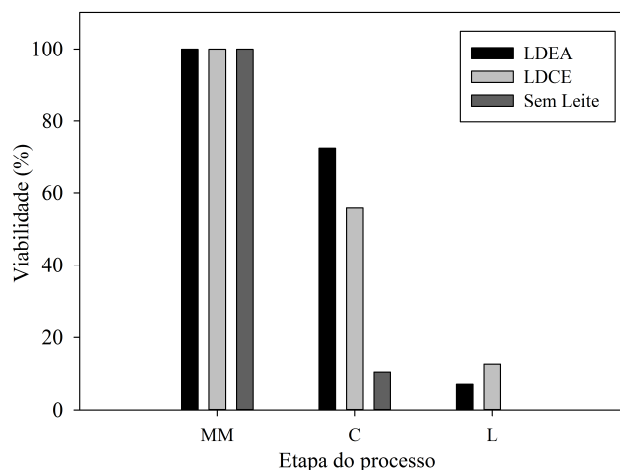
A fim de usar a máxima concentração celular no meio, definiu-se que o tempo de cultivo seria ao final da fase estacionária de crescimento, ou seja, em 42 horas.



**Figura 1– Evolução do crescimento de *C. necator* expressa em absorbância (600 nm) e contagem das células viáveis (UFC.mL<sup>-1</sup>) em meio mineral ao longo do tempo de cultivo.**

### Avaliação da Viabilidade Celular de *C. necator* Após Liofilização

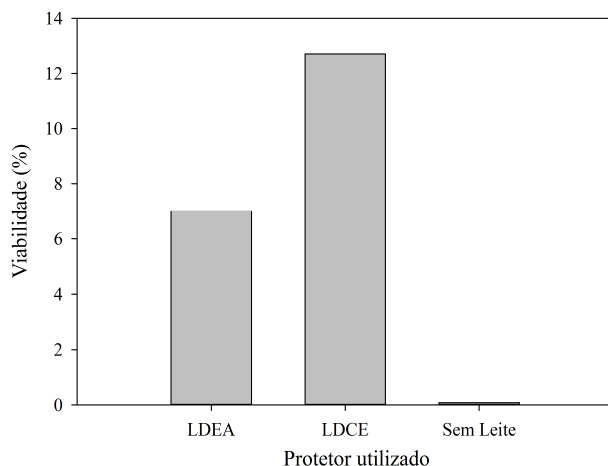
Os dados obtidos com os plaqueamentos realizados nas etapas da liofilização estão mostrados na Figura 2.



**Figura 2 – Viabilidade celular nas diferentes etapas do processo de liofilização: Meio mineral (MM), Após congelamento (C) e Após a liofilização (L).**

Para os plaqueamentos realizados antes do processo de liofilização, as viabilidades celulares obtidas para amostras utilizando LDEA, LDCE e Sem Leite, foram de 72,4 %, 55,9 % e 10,3 %, respectivamente. É possível observar que já no congelamento, o leite desnatado mostrou efeito positivo de proteção da biomassa, pois manteve viabilidade celular maior que a do caldo congelado sem adição de protetor.

Os resultados do plaqueamento realizado após o processo de liofilização estão apresentados na Figura 3. A viabilidade obtida para amostras utilizando LDEA, LDCE e Sem Leite, foram de 7,0 %, 12,7 % e 0,08 %, respectivamente.



**Figura 3 – Viabilidade celular de *C. necator* após o processo de liofilização para os diferentes protetores utilizados.**

Estes resultados mostraram que o leite desnatado possui efeito protetor sobre o microrganismo estudado e nas condições estudadas, uma vez que a viabilidade celular encontrada para os ensaios realizados sem a adição do mesmo resultou em viabilidade de 0,08 %, viabilidade inferior à obtida com a adição do leite em quaisquer condições utilizadas neste trabalho. Apesar de o LDEA ter apresentado melhor condição de proteção às células durante a fase de congelamento, o LDCE foi o que melhor protegeu as células durante o processo de secagem/liofilização.

A importância da realização de plaqueamentos após o congelamento serviu para indicar qual etapa do processo causa maiores danos à biomassa (morte celular), uma vez que a liofilização é a junção do processo de congelamento e do processo de secagem a baixas pressão e temperatura. O protetor celular utilizado no processo de liofilização deve proteger a célula tanto no congelamento, como na secagem (Morgan e Vesey, 2009; Berk, 2013).

É possível utilizar também uma combinação de protetores, visando melhor proteção das células durante as duas etapas da liofilização. A viabilidade máxima obtida neste trabalho (12,7 %) pode ainda ser

otimizada, através do estudo da quantidade ideal de protetor a ser utilizado.

Não há relatos na literatura consultada para a preservação de *C. necator* através de liofilização. Estudos realizados por Zayed e Roos (2004) mostraram que a preservação de *Lactobacillus salivarius* utilizando leite desnatado atingiu viabilidade celular de aproximadamente 22 %. Neste mesmo trabalho a utilização de outros protetores como trealose, sacarose, e a utilização de uma mistura destes protetores também foi analisada, condição em que se obteve cerca de 85 % de viabilidade celular. Ao comparar a viabilidade encontrada por esses autores com a viabilidade obtida neste trabalho, observa-se que esta viabilidade é relativamente baixa, apesar de se tratar de outro microrganismo.

## CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, conclui-se que o leite apresentou efeito protetor sobre *Cupriavidus necator* nas condições estudadas, e que o leite desnatado comercialmente estéril ofereceu maior proteção às células. Apesar da proteção demonstrada, o leite desnatado utilizado nas condições estudadas foi pouco eficiente no processo de liofilização. Estudos adicionais se fazem necessários para futuramente obter-se maior viabilidade deste microrganismo.

## REFERÊNCIAS

- ARAGÃO, G. M. F. (1996), “Production polyhydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l’optimisation de la mise en oeuvre des cultures”, L’institut National des Sciences appliquées de Toulouse, Toulouse (Doctorat spécialité: Biologie et génétique Moléculaires et Cellulaires – Biotechnologie).
- BERK, Z. (2013), “Freeze drying (lyophilization) and freeze concentration”, Food Process Engineering and Technology, 2<sup>th</sup> Academic Press, 567p.

- CAMEOTRA, S. S. (2007), "Preservation of microorganisms as deposits for patent application", Biochemical and Biophysical Research Communications, 353, 849 - 850.
- CORCORAN B. M., ROSS R. P., FITZGERALD G.F., STANTON C. (2004), "Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances", Journal of Applied Microbiology, 96, 1024–1039.
- HAFUKA, A., SAKAIDA, K., SATOH, H., TAKAHASHI, M., WATANABE, Y., OKABE, S. (2011), "Effect of feeding regimens on polyhydroxybutyrate production from food wastes by *Cupriavidus necator*", Bioresorce Technology, 102, 3551-3553.
- MIYAMOTO-SHINOHARA, Y., SUKENOBE, J., IMAIZUMI, T., NAKAHARA, T. (2008), "Survival of freeze-dried bacteria", Journal of General and Applied Microbiology, 54, 9 – 24.
- MORGAN, C., VESEY, G. (2009), "Freeze Drying of Microorganisms", Encyclopedia of Microbiology 3<sup>th</sup>, Academic Press, 162p.
- RODRÍGUEZ, A. C., CALAFELL, M. M., MARQUÉS, M. S. C. (2012), "Enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate) by a commercial lipase", Polymer Degradation and Stability, 97, 2473 - 2476.
- ZAYED, G., ROOS Y. H. (2004), "Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage", Process Biochemistry, 36, 1081 - 1086.