



AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS PELA FOTOFERMENTAÇÃO E SISTEMAS HÍBRIDOS POR *Rhodobacter capsulatus*

W. R. CUNHA¹, P. S. LAMOUNIER², F. S. PIO², V. L. CARDOSO² e J. S. FERREIRA²

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biotecnologia

² Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química
E-mail para contato: gmail.com

RESUMO – A *Rhodobacter capsulatus* é uma bactéria fototrófica facultativa capaz de crescer numa ampla variedade de condições ambientais e através do processo de fotofermentação ela consegue transformar compostos orgânicos em hidrogênio, ácidos carboxílicos, álcoois e outros metabólitos. O presente trabalho apresenta um estudo da produção de metabólitos produzidos por *Rhodobacter capsulatus*, consumo de açúcares e aumento na concentração celular quando cultivada em meio sintético RCV e em efluente da fermentação escura (EFE), ambos com suplementação de 20 g/L de melaço de soja. No ensaio 1 (meio RCV) o consumo de açúcares totais foi em torno de 32% e a produção de ácido acético e ácido propiônico atingiu 1,01 g/L e 1,01 g/L, respectivamente. A concentração celular atingiu 1,11 g/L e a razão C/N apresentou um aumento de 36% ao final do experimento. No ensaio 2 (meio EFE) o consumo de açúcares foi de 63% e a produção de ácido acético atingiu 2,42 g/L. A concentração celular foi de 1,49 g/L e a razão C/N se manteve durante o experimento. Com base nisso, afirma-se que a bactéria PNS *R. capsulatus* produziu ácidos acético e propiônico, sendo que a utilização do efluente da fermentação escura favoreceu a produção destes compostos, o crescimento celular e o consumo de açúcares em relação ao uso do meio sintético RCV.

1. INTRODUÇÃO

A *Rhodobacter capsulatus* é uma bactéria fototrófica facultativa capaz de crescer numa ampla variedade de condições ambientais (Gray *et al.* 1994). Essa bactéria metabolicamente versátil tem se mostrado extremamente valiosa em estudos de fotossíntese e fixação de nitrogênio, fornecendo conhecimentos extraordinários para esses processos com aplicações para outros organismos (Scolnik e Mars, 1987). As cepas de *R. capsulatus* é um tipo de bactéria púrpura não sulfurosa (PNS), que pode produzir hidrogênio, sob determinadas condições.

Nas últimas décadas, tem-se observado avanços significativos na produção de ácidos orgânicos pela transformação de biomassa via fermentação microbiana. Estes ácidos orgânicos podem ser usados diretamente, neste caso destaca-se o uso para a aplicação na indústria de alimentos, como também constituem moléculas chaves para a produção de outros compostos químicos.

A maior aplicação do ácido láctico e seus derivados é efetuada na indústria de alimentos, onde é utilizado com as funções de diminuição de pH; como agente antimicrobiano; adjuvante de sabor; solvente; estabilizador; umectante; emulsificador; plasticizante. De acordo com Sharpel (1985), o ácido butírico tem grandes aplicações nos gêneros alimentícios e de bebidas. Pode ser usado em sua forma pura na indústria de laticínios, ou na forma de ésteres como aditivo alimentar para aumentar o odor de frutas. O ácido propiônico tem muitos e variados usos, como agente antifúngico em alimentos e como ingrediente em termoplásticos, medicamentos antiartríticos, perfumes, sabores e solventes (Himmi *et al.* 2000).

Nesse contexto, o experimento realizado permitiu a quantificação do consumo de açúcares e a formação de ácidos orgânicos, presentes no meio RCV e no efluente da fermentação escura, utilizando melaço de soja como substrato.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para o seguinte trabalho foram utilizadas cepas de bactérias púrpuras não-sulfurosas (PNS), as *Rhodobacter capsulatus* (DSMZ - *German Collection of Microorganisms and Cell Culture*), no processo de fotofermentação. O cultivo foi realizado em meio basal RCV (Weaver *et al.*, 1975) com o pH ajustado para 6,8, em frascos Duran de 500 mL, no qual 70% foi preenchido com meio de cultura e inóculo, os 30% restante de *headspace* foi saturado com gás argônio. Os frascos foram mantidos em uma câmara de germinação a 30 ± 1 °C, com iluminação de 2200 lux. No período de 10 a 12 dias, as cepas foram centrifugadas e o sedimentado era suspenso em um novo meio de cultura.

O meio fermentescível utilizado nos experimentos de fotofermentação foi o próprio meio basal RCV e o efluente proveniente da fermentação escura por consórcio microbiano em reator UASB, produzido em trabalho paralelo a esse. Para tornar o efluente adequado a fotofermentação. Primeiramente, ele foi centrifugado para a retirada de outras culturas de bactérias presente no meio. Posteriormente, realizou-se a suplementação do efluente com os componentes do meio basal RCV, com a exceção do ácido málico e do sulfato de amônio, com o pH ajustado para 6,8 para a fotofermentação. O substrato utilizado foi o melaço de soja em uma concentração de 20 g/L nos dois meios fermentescíveis.

Os ensaios de fotofermentação foram realizados em reatores de 50 mL (frascos de penicilina), em duplicata. Foram conduzidos à temperatura de 32 ± 1 °C e intensidade luminosa de 2200 lux. O volume reacional foi de 37,5 mL, de meio a ser fermentado e inóculo. O *headspace* foi preenchido com gás argônio, caracterizando assim um ambiente anaeróbio.

Após a preparação dos reatores, eles foram tampados com septo de borracha butílica e lacrados com cápsulas de alumínio. Foram retiradas amostras iniciais do meio reacional, e a cada 2 dias eram coletadas novas amostras para análises, por um período de 10 dias.

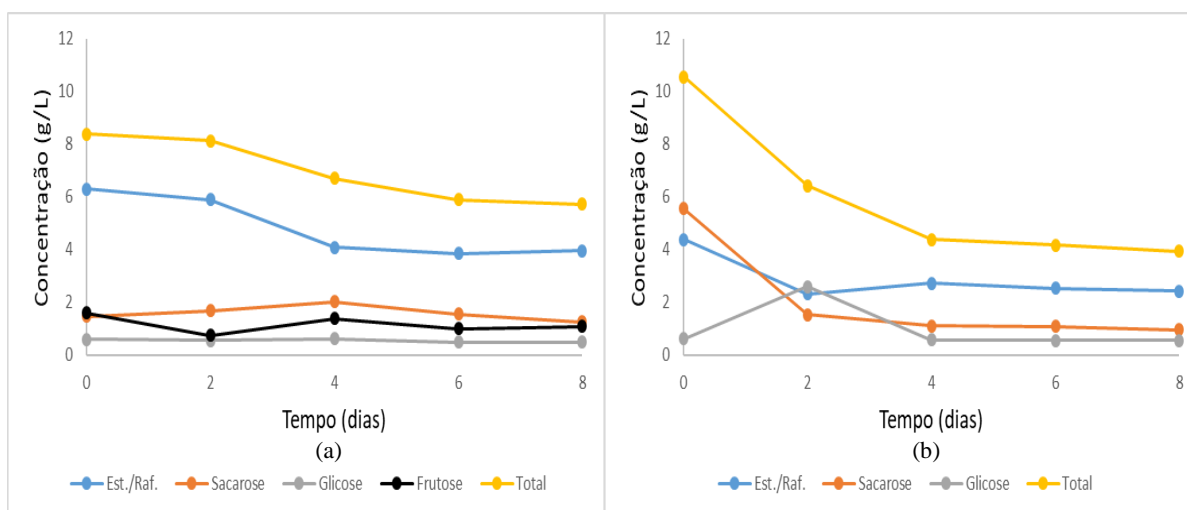
A concentração de açúcares e de ácidos orgânicos foi medida por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, empregando-se um HPLC (Shimadzu modelo LC-20A proeminência, Supelcogel, coluna C-610H), em que os ácidos orgânicos foram detectados por luz ultravioleta e os açúcares foram detectados por índice de refração.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto para o sistema de cultura pura em meio RCV (Ensaio 1) e em meio EFE (Ensaio 2), observa-se o consumo dos açúcares e também a degradação do tetrassacarídeo estaquiiose e do trissacarídeo rafinose, o que justifica o aumento da concentração dos monossacarídeos, glicose e frutose, que, em seguida, são consumidos. A Figura 1 apresenta as concentrações de açúcares durante a fotofermentação.

Observa-se que a utilização da fonte de carbono é maior ao utilizar o meio EFE em relação ao meio RCV, sendo que o consumo de açúcares totais é em torno de 63 e 32% respectivamente.

Figura 1 – Concentração de açúcares para cultura pura de *R. capsulatus* em meio (a) RCV e (b) EFE suplementado com 20g/L de melaço de soja.



A partir dos resultados obtidos, Tabela 1, observa-se que a concentração inicial de ácidos orgânicos totais no cultivo em meio RCV foi de 5,13 g/L e em meio EFE foi de 8,53 g/L, já a concentração final de ácidos orgânicos totais foram de 5,11 g/L e 9,41 g/L, respectivamente. Predominam nestes meios a presença de ácido lático durante a fermentação até o oitavo dia, onde observa-se um consumo do ácido orgânico referido de 12,45% no Ensaio 1 e 18,9% no Ensaio 2.

Segundo Vieira et. al. (2016), o cultivo de *Rhodopseudomonas palustris* em meio EFE favorece a produção de ácidos orgânicos com suplementação de melaço de soja e apresenta melhores resultados para a produção de ácido acético e propiônico.

Semelhante ao comportamento da *R. palustris*, o cultivo da *R. capsulatus* durante a fermentação em meio RCV, houve maior produção de ácido acético e ácido propiônico, sendo que a concentração atingiu 1,01 g/L e 1,01 g/L respectivamente. Já para a fermentação em meio EFE, a maior produção foi de ácido acético atingindo 2,42 g/L.



No oitavo dia de fotofermentação do Ensaio 1, a razão carbono/nitrato (C/N) apresentou um aumento de 36%, o que pode ser indício de consumo de nitrogênio no meio, utilizado para o crescimento da biomassa. No entanto, para o Ensaio 2 a razão C/N se manteve constante durante o experimento.

Tabela 1 – Concentração de ácidos orgânicos e razão C/N para cultura pura de *R capsulatus* em meio RCV e meio EFE suplementado com 20g/L de melaço de soja .

Meios	Ácidos	Concentrações nos dias (g/L)					Razão C/N
		0	2	4	6	8	
RCV	Lático	4.45	0.88	3.91	3.47	3.90	20.05
	Acético	0.68	0.21	1.04	0.76	1.01	9.10
	Propiônico	0	0	0.17	0.12	0.20	14.25
	Butírico	0	0	0	0	0	16.69
EFE	Lático	8.09	8.86	10.70	8.74	6.56	18.37
	Acético	0	1.68	2.75	1.67	2.42	18.65
	Propiônico	0.44	0.32	0.26	0.23	0.44	18.31
	Butírico	0	0	0	0.10	0	16.80

Observa-se, Tabela 2, que para o meio RCV a concentração celular final foi de 1,11 g/L, um aumento de 11%, já para o meio EFE o aumento na concentração celular ao final de 8 dias foi de aproximadamente 50%, em torno de 1,49 g/L.

Tabela 2 – Concentração celular de *R capsulatus* em meio RCV e EFE suplementado com 20g/L de melaço de soja.

Meio RCV		Meio EFE	
Tempo (dias)	Concentração (g/L)	Tempo (dias)	Concentração (g/L)
0	1,00	0	1,00
2	1,10	2	1,31
4	1,13	4	1,27
6	1,12	6	1,34
8	1,11	8	1,49

O ensaio de fotofermentação em meio EFE apresenta bons resultados na produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido acético, porém não altera significativamente a quantidade de ácido butírico e ácido propiônico. Mostra também melhoria no consumo de açúcares totais, maior aproveitamento de um resíduo agroindustrial (melaço de soja) e consequentemente aumento da concentração celular durante 8 dias.

4. CONCLUSÃO

Este estudo indica que a *R capsulatus* cultivada em diferentes meios sofre alteração no crescimento celular, na produção de ácidos orgânicos e na capacidade de assimilar açúcares distintos. Conclui-se que o meio com efluente oriundo da fermentação escura de um consórcio microbiano, adaptado para as bactérias purpuras não sulfuradas favorece a produção



de ácidos orgânicos, o consumo de açúcares totais (63%), o maior aproveitamento do melaço de soja e o aumento da concentração celular (50%).

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES, FAPEMIG, FAU e Vale S.A. pelo apoio e incentivo à pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

- GRAY, K. A., GROOMS, M., MYLLYKALLIO, H., MOOMAW, C., SLAUGHTER, C., & DALDAL, F. *Rhodobacter capsulatus* contains a novel cb-type cytochrome c oxidase without a CuA center. *Biochemistry*, 33(10), 1994.
- HIMMI, E. H., BORIES, A., BOUSSAID, A., & HASSANI, L. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(4), 435-440, 2000.
- SCOLNIK, P.A., MARS Genetic research th photosynthetic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 41, 703-726, 1987.
- SHARPEL, F.H.J. Microbial flavours and fragrances. In: *Comprehensive Biotechnology* (Blanch HW, Drew S and Wang DIC, eds), pp 965–979, Pergamon Press, Oxford, UK, 1985.
- VIEIRA, L. M., MACHADO, R. G., BATISTA, F. R. X., CARDOSO, V. L., FERREIRA, J. S. Avaliação da produção de ácidos orgânicos por *Rhodopseudomonas palustres* utilizando meio sintético e efluente da fermentação escura. *XXI Jornada em Engenharia Química*. 209-213, 2016.
- WEAVER, P. F.; WALL, J. D.; GEST, H. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulate*. *Archives of Microbiology*, v. 105, p. 207-216, 1975.