

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS DE *BACILLUS MEGATERIUM* NA DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO EM CULTIVO SUBMERSO

G. C. LORENZINI¹, D. J. L. FACCIN¹, M. A. Z. AYUB², N. S. M. CARDOZO¹ e R. RECH²

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Departamento de Engenharia Química

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

E-mail para contato: debora@enq.ufrgs.br

RESUMO – O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) é um critério importante no dimensionamento e escalonamento de biorreatores aeróbios. Esse parâmetro é afetado por diversos fatores, como as condições operacionais e as propriedades do meio de cultivo. No presente trabalho, procurou-se identificar se a biomassa viável e a concentração dessa afetam os valores de k_{La} em um cultivo de *Bacillus megaterium*. Para isso, realizou-se um cultivo batelada em biorreator do tipo tanque agitado, mantendo-se constantes as condições de temperatura, aeração e velocidade de agitação. Os valores de k_{La} foram determinados periodicamente através do método dinâmico. O valor de k_{La} não foi significativamente influenciado pela presença de biomassa, conforme confirmado por análise de variância. Esse resultado permite que seja feita a determinação prévia do valor de k_{La} em biorreator sem células e, assim, elimina-se a problemática da medição do coeficiente durante o cultivo para o sistema estudado.

1. INTRODUÇÃO

A produção de poli(3-hidroxibutirato), ou PHB, é um processo biotecnológico de interesse comercial. Esse poliéster é um polímero biodegradável e biocompatível produzido a partir de fontes renováveis, com características promissoras para a substituição, puro ou com inserção de outros monômeros, de polímeros oriundos do petróleo (Verlinden *et al.*, 2007). O PHB é produzido naturalmente por diferentes microrganismos, incluindo a *Bacillus megaterium*, uma bactéria estritamente aeróbia, que aceita uma variedade de carboidratos como fonte de carbono, cresce em uma faixa relativamente ampla de temperaturas e possui crescimento acelerado (Reyes *et al.*, 1997). No entanto, a síntese de PHB por *B. megaterium* depende de condições específicas de disponibilidade de oxigênio no cultivo. Enquanto altas concentrações do gás inibem a síntese de PHB, uma menor disponibilidade dele favorece a produção do biopolímero, o qual possuiria função de reserva de carbono e fonte energética da célula (Macrae e Wilkinson, 1958). Entretanto, uma grande limitação de oxigênio pode resultar na esporulação das bactérias, havendo o consumo de PHB por elas (Wu *et al.*, 2001).

Os cultivos aeróbios em larga escala ocorrem geralmente em biorreatores do tipo tanque

agitado (STR), em meio líquido, envolvendo um sistema trifásico sólido-líquido-gasoso. Nesses, o fator limitante decisivo é o fornecimento de oxigênio ao meio, devido à sua baixa solubilidade em água (Borzani *et al.*, 2001). Um dos principais parâmetros para quantificar a eficiência de transferência de oxigênio em um biorreator aeróbio é o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}), que é importante para o escalonamento, dimensionamento e operação deste tipo de biorreator. O k_{La} é afetado por diversos fatores, entre eles, as condições operacionais e as propriedades do meio de cultivo, havendo diversos estudos nesse sentido (Garcia-Ochoa e Gomez, 2009). Há, porém, estudos na literatura provando que não apenas esses fatores influenciam o valor do k_{La} , mas também a presença e a concentração de biomassa (Galaction *et al.*, 2003).

Os efeitos possíveis da biomassa no k_{La} estudados na literatura são (a) a alteração de propriedades do meio (viscosidade, tensão superficial, etc.); (b) a presença física das células como partículas sólidas, que podem bloquear a interface gás-líquido ou provocar o “efeito bola de neve”, no qual, quanto mais células vão sendo adsorvidas nessa interface, mais ela se torna móvel; e (c) a influência da respiração celular das células acumuladas na interface, quantificada por um fator de aumento E do k_{La} (Ju e Sundararajan, 1994). Através dos trabalhos disponíveis, percebeu-se que muitos desses efeitos apontam para direções opostas, podendo ocorrer um aumento ou um decréscimo do k_{La} com a biomassa. Ainda, detectou-se a carência de estudos que avaliem experimentalmente o comportamento do k_{La} com a concentração celular de biomassa viável.

Pelos motivos acima expostos, e em vista da importância da transferência de oxigênio para a otimização da produção de PHB por *B. megaterium*, que é um microrganismo de interesse por suas características de crescimento e produtos, o presente trabalho estuda se há influência da presença e da concentração da biomassa viável no k_{La} durante um cultivo dessa bactéria.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismos e meio de cultura

O microrganismo utilizado foi *Bacillus megaterium* DSMZ 32^T, mantido congelado a -18 °C em solução crioprotetora (20 % em volume de glicerol), com estoque renovado a cada 6 meses. As bactérias foram reativadas em meio mineral idêntico ao utilizado no cultivo, durante 18 h, em estufa incubadora rotatória, a 160 rpm e 30 °C. Foi realizado o escalonamento, transferindo-se 2 % (em volume) do pré-inóculo a outro frasco, mantido por aproximadamente 5 h nas mesmas condições.

Utilizou-se o meio mineral proposto por Wang e Lee (1997) composto por KH_2PO_4 , 1,5 g·L⁻¹; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 9 g·L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g·L⁻¹; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g·L⁻¹; ácido cítrico, 0,1 g·L⁻¹; acrescido de 1 mL·L⁻¹ de solução de micronutrientes ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g·L⁻¹; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g·L⁻¹; H_3BO_3 , 0,3 g·L⁻¹; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g·L⁻¹; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g·L⁻¹; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g·L⁻¹; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g·L⁻¹; $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g·L⁻¹). Foram utilizados 16 g·L⁻¹ de sacarose como fonte de carbono e 2 g·L⁻¹ de sulfato de amônio como fonte

de nitrogênio. O pH inicial foi ajustado para 7,0 através da correção com ácido (H_3PO_4 2M) ou base (NaOH 2M). Foram adotados os procedimentos e cuidados em relação à esterilização do conjunto.

2.2. Procedimento experimental

O cultivo batelada, com 12 h de duração, foi realizado através de duplicatas independentes entre si em biorreator de bancada tipo tanque agitado (STR) de 5 L (4 L de volume útil) BIOSTAT® B (Braun Biotech). O impelidor de aço inox é do tipo turbina com dois conjuntos de 6 pás planas. O biorreator está acoplado a uma unidade de controle e as variáveis controladas foram temperatura (30 °C) e velocidade do impelidor (600 rpm). A taxa de aeração foi mantida constante em $4 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ (1 vvm). O ar, fornecido por compressor, foi injetado por aerador localizado abaixo do impelidor. Efetuou-se a injeção de antiespumante quando necessário e não houve controle de pH durante o cultivo. As medidas de percentual de saturação de oxigênio dissolvido (p_{O_2}) foram realizadas por eletrodo polarográfico InPro 6800/12/320 (Mettler-Toledo) conectado ao biorreator e previamente calibrado no meio de cultivo. Um computador foi conectado ao conjunto para a aquisição de dados, utilizando-se o software MATLAB (MathWorks) como interface.

2.3. Análises

Concentração de biomassa: As medidas de biomassa total (X) foram determinadas, em duplicata, por medida de peso seco celular. Alíquotas de cultivo foram coletadas, centrifugadas (15 min / 3500 rpm), lavadas com água destilada e novamente centrifugadas. A massa depositada ficou em estufa a vácuo a 75 °C até atingir peso constante. Todos dados determinados experimentalmente foram expressos como a média das duplicatas, com a indicação dos respectivos desvios padrão.

Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio: Para determinação experimental dos valores de k_{La} e da taxa de respiração celular (OUR) utilizou-se o método dinâmico, amplamente empregado em cultivos em razão de sua praticidade, reprodutibilidade e relativa acurácia (Garcia-Ochoa e Gomez, 2009). O método foi proposto por Bandyopadhyay e Humphrey (1967) e descrito com detalhes por Borzani *et al* (2001). A técnica original envolve a breve interrupção da aeração e da agitação no biorreator. Empregando-se a modificação descrita por Pouliot *et al.* (2000), a agitação foi reduzida a 50 rpm e não totalmente interrompida, a fim de impedir a decantação das células e, assim, garantir a obtenção de medidas corretas pelo eletrodo de oxigênio. A taxa específica de respiração (q_{O_2}) foi determinada pela razão entre a OUR e biomassa. A medida do k_{La} do biorreator sem células, quando ainda não há consumo biológico de oxigênio, foi feita pelo método dinâmico *gassing-out* (Riet, 1979), expulsando-se o gás através da injeção de nitrogênio.

Análise estatística: Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância para investigar se os valores de k_{La} foram significativamente afetados durante o tempo de cultivo. Utilizou-se a ferramenta de análise de dados ANOVA: fator único do MSExcel 2007 (Microsoft).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Crescimento celular e consumo de oxigênio

Ao longo das 12 h de cultivo, observou-se alteração no seu aspecto visual de transparente para rosa leitoso, acompanhado de odor característico. A atividade metabólica celular foi investigada através da curva característica de crescimento celular e de q_{O_2} (Figura 1). Conforme a curva de crescimento, observou-se ausência de fase *lag* de adaptação das células ao biorreator, uma vez que o inóculo foi cultivado previamente no mesmo meio de cultivo e, ao ser introduzido no biorreator, já se encontrava na fase exponencial de crescimento. O valor máximo de q_{O_2} foi registrado no início do cultivo, quando as células estavam no início da fase de crescimento exponencial. Com o aumento gradual de biomassa e a consequente provável limitação de nutrientes, o cultivo se aproxima de uma fase estacionária, momento em que ocorre a redução progressiva da atividade metabólica e do q_{O_2} .

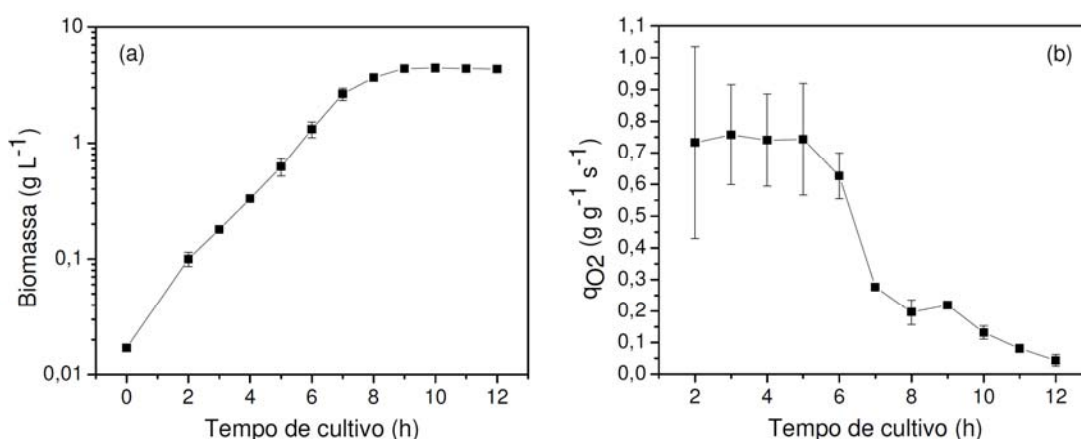


Figura 1 – Curvas de (a) crescimento celular e (b) taxa de respiração específica para cultivo de *B. megaterium*. As barras verticais indicam o desvio padrão entre os valores médios das duplicatas.

A análise conjunta das curvas de biomassa total e q_{O_2} permite perceber o início de uma leve desaceleração do crescimento celular em 6 h de cultivo, tornando-se clara a desaceleração a partir de 7 h e, em aproximadamente 9 h, o crescimento encontra-se já em uma fase plenamente estacionária.

3.2. Balanço de massa para o oxigênio: perfil de p_{O_2} e OUR

O balanço material para o oxigênio em um biorreator aeróbio é dado pela diferença entre o oxigênio transferido ao meio e o consumido pelas células (OUR). Portanto, as curvas de p_{O_2} e de OUR (Figura 2) apresentam comportamentos contrários, sendo a queda no p_{O_2} causada pela respiração celular. Assim como a curva de q_{O_2} e biomassa, as curvas de p_{O_2} e de OUR estão inter-relacionadas e apresentaram a evolução típica para cultivos aeróbios descrita por Garcia-Ochoa *et al.* (2010).

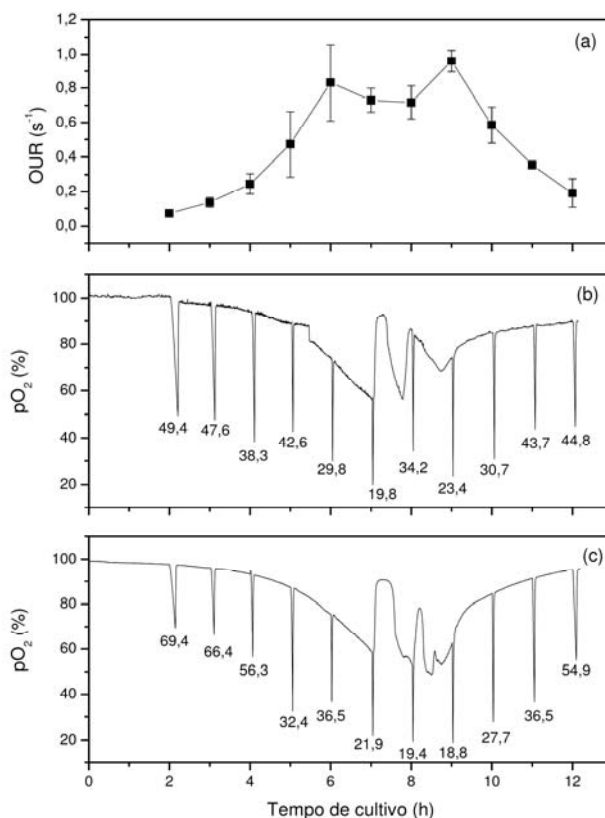


Figura 2 – Perfil da (a) taxa de respiração celular, (b) percentual de oxigênio dissolvido no cultivo de *B. megaterium* e (c) na sua duplicata.

De maneira geral, o aumento gradual da biomassa observado na fase exponencial de crescimento na Figura 1, com consequente aumento do consumo de substrato e da demanda de oxigênio (indicado pelo crescimento da OUR na Figura 2), provocou uma queda da concentração de oxigênio dissolvido no meio. Posteriormente, com a limitação de nutrientes, entre eles o oxigênio, as células ingressaram na fase estacionária e a demanda pelo gás diminuiu, fazendo com que os níveis de oxigênio no meio fossem recuperados. As quedas periódicas acentuadas nas curvas de pO_2 correspondem às determinações de k_{La} através do método dinâmico para o biorreator com células. Já a queda inesperada, em 7 h e 8 h, na curva de OUR e a consequente elevação abrupta, nesses mesmos momentos, nas curvas de pO_2 , indicam um comportamento anômalo.

Acredita-se que, a 7 h e 8 h, a concentração de oxigênio tenha caído abaixo do valor da concentração crítica para *B. megaterium*, definida como o valor acima do qual a velocidade específica de respiração (q_{O_2}) é constante e máxima (Borzani *et al*, 2001). Nesses momentos do cultivo, a OUR – produto entre biomassa e q_{O_2} – estaria em seus valores máximos e, com essa alta demanda de oxigênio, a aplicação do método dinâmico causou uma grande queda no pO_2 , superior ao tempo de resposta do eletrodo, que continuou caindo mesmo após a retomada da

agitação e da aeração. As células, então, teriam alterado seu metabolismo para se adaptarem a um cenário de limitação de oxigênio, passando a consumir o gás a menores taxas, conforme demonstra a queda na OUR a 7 h e 8 h. Essa diminuição da demanda aumentou repentinamente a disponibilidade de oxigênio no meio (p_{O_2}), de acordo com o balanço de massa. A partir de 9 h, o metabolismo pareceu restabelecer seu comportamento típico. De fato, conforme Pouliot *et al.* (2000), se a atividade da reação bioquímica for alta o suficiente para reduzir significativamente os níveis de oxigênio dissolvido no cultivo, a determinação pelo método dinâmico torna-se inviável, devendo-se utilizar determinações baseadas em balanço de gás. Da mesma forma, Borzani *et al.* (2001) afirmam que para aplicação do método dinâmico, deve-se contar com uma concentração de oxigênio dissolvido relativamente alta, evitando o risco de que ela caia abaixo da crítica, de modo a manter constante o valor de q_{O_2} das células.

Tal alteração, entretanto, permitiu obter uma estimativa preliminar do valor de concentração crítica para *B. megaterium*. Conforme a Figura 2, que aponta as concentrações mínimas de p_{O_2} medidas em cada hora, acredita-se que a concentração crítica esteja ao redor dos 20 %, uma vez que, em 7 h, as concentrações mínimas foram de 19,8 % para o cultivo e de 21,9 % para sua duplicata, após as quais as bactérias apresentaram o comportamento anômalo.

3.3. Influência da biomassa no k_{La}

No experimento, procurou-se manter as condições operacionais descritas sem alterações, de modo que apenas a biomassa afetasse os valores de k_{La} . A Figura 3 apresenta os resultados obtidos para o k_{La} . Foram desconsiderados os valores a 7 h e 8 h devido aos aspectos discutidos na seção anterior e à dificuldade de obtenção de um valor confiável nesses tempos.

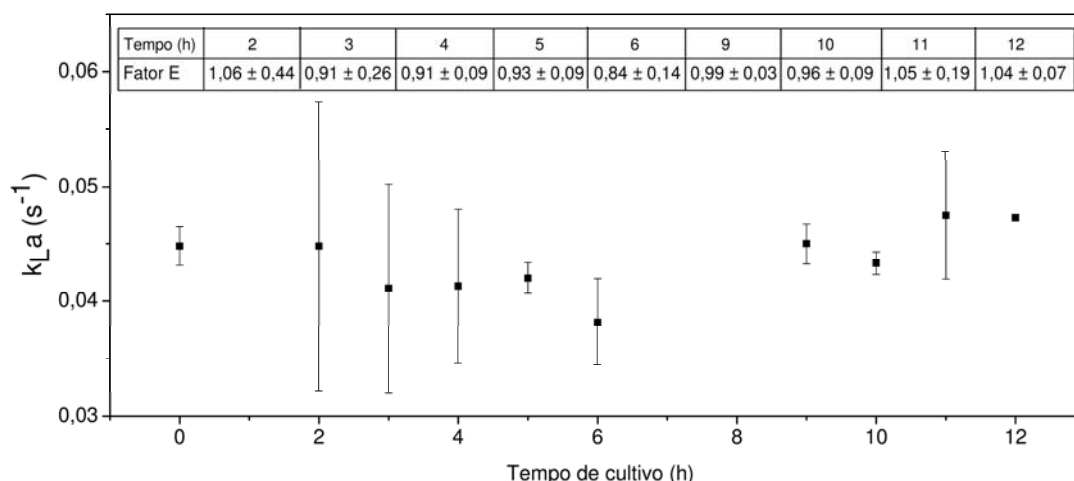


Figura 3 – Variação do k_{La} durante cultivo de *Bacillus megaterium*. O valor a 0 h corresponde à determinação para o biorreator sem células.

O valor médio de k_{La} medido para o biorreator sem células (0 h) foi de $0,045 \text{ s}^{-1} \pm 0,003 \text{ s}^{-1}$. Esse valor manteve-se relativamente constante para o biorreator com células ao longo do cultivo,

com a quantidade de biomassa, sendo que os resultados da análise de variância mostraram que realmente não há diferença significativa entre os valores de k_{La} ($p = 0,88$). Os desvios padrão relativamente altos entre o cultivo e sua duplicata, como se nota na Figura 3, devem-se a algumas fontes de erros desconsideradas, entre elas o tempo de resposta dinâmica do eletrodo de oxigênio dissolvido; a adição diferenciada de antiespumantes de acordo com a necessidade, os quais tendem a diminuir o k_{La} (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009); a peculiaridade dos cultivos e do metabolismo celular; e o estabelecimento manual do valor de aeração e oscilações da pressão de ar fornecido pelo compressor. Pouliot *et al.* (2000) observaram que erros de medida e a dinâmica do eletrodo de oxigênio afetaram o k_{La} estimado pelo método dinâmico em relação a valores obtidos por reconciliação matemática.

Os valores do fator de aumento biológico (E) - razão entre os valores de k_{La} para o biorreator com células e o valor obtido inicialmente para o biorreator sem células – apresentados na Figura 3 mostram que este parâmetro pode ser considerado aproximadamente igual a 1 durante o cultivo, indicando que não há influência da presença de biomassa viável e do q_{O_2} no valor do k_{La} . Portanto, não foi verificado o efeito da respiração celular descrito por Garcia-Ochoa e Gomez (2009), não ocorrendo aumento no k_{La} . Esses resultados estão de acordo com Pouliot *et al.* (2000). Para esses autores, mantendo-se as demais condições experimentais constantes durante a fermentação, o k_{La} permanece relativamente inalterado para cultivos de baixa viscosidade, caso de *Saccharomyces cerevisiae* e de *B. megaterium*.

Em trabalho anterior (Faccin *et al.*, 2013), foi observado um efeito significativo da transferência de oxigênio, através de medidas do k_{La} , na produção de PHB por *B. megaterium*, identificando-se um valor ótimo do coeficiente de $0,006\text{ s}^{-1}$ entre valores que iam de $0,002\text{ s}^{-1}$ a $0,037\text{ s}^{-1}$. Com isso, a atual constatação de que o k_{La} pode ser mantido constante durante o cultivo permite a otimização da produção de PHB através da prévia escolha desse valor e de sua manutenção ao longo do processo.

4. CONCLUSÕES

No presente estudo, o k_{La} – importante fator de dimensionamento em biorreatores aeróbios – não mostrou variação significativa com a presença de biomassa ativa durante um cultivo batelada de *Bacillus megaterium*. Com isso, elimina-se um parâmetro (biomassa) a ser ajustado em correlações para predição do coeficiente nesse sistema.

Esse resultado constitui vantagem nos estudos com *B. megaterium*, pois possibilita o estabelecimento prévio ao cultivo, para o biorreator sem células, e a manutenção de um valor de k_{La} ao longo do processo em que as demais condições operacionais (taxa de aeração, agitação e temperatura) sejam mantidas inalteradas. O valor a ser escolhido poderá ser o mais apropriado para otimizar os resultados que dependam da transferência de oxigênio, como a produção de PHB. Ainda, torna-se possível evitar a determinação do k_{La} durante o cultivo com células e os inconvenientes relacionados, tendo o método dinâmico se mostrado inaplicável durante períodos com grandes taxas de respiração.

5. REFERÊNCIAS

- BANDYOPADHYAY, B.; HUMPHREY, A. E. Dynamic Measurement of the Volumetric Oxygen Transfer Coefficient in Fermentation Systems. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 9, p. 533-544, 1967.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. D. A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial: fundamentos*. São Paulo: Blucher, 2001.
- 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 Biochem.*, v. 48, p. 420-425, 2013.
- GALACTION, A.-I.; ONISCU, C.; CASCAVAL, D. Studies on Oxygen Mass Transfer in Stirred Bioreactors. *Chem. Ind.*, v. 57, p. 276-287, 2003.
- GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotech. Adv.*, v. 27, p. 153-176, 2009.
- GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E.; SANTOS, V. E.; MERCHUK, J. C. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochem. Eng. J.*, v. 49, p. 289-307, 2010.
- JU, L.-K.; SUNDARARAJAN, A. The effects of cells on oxygen transfer in bioreactors: physical presence of cells as solid particles. *Chem. Eng. J.*, v. 56, p. B15-B21, 1994.
- MACRAE, R. M.; WILKINSON, J. F. Poly +hydroxybutyrate Metabolism in Washed Suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *J. Gen. Microbiol.*, v. 19, p. 210-222, 1958.
- POULIOT, K.; THIBAULT, J.; GARNIER, A.; LEIVA, G. A. K_{La} Evaluation during the course of fermentation using data reconciliation techniques. *Bioprocess Eng.*, v. 23, p. 565-573, 2000.
- REYES, G. D.; SO, R. S.; ULEP, M. M. Isolation, screening and identification of bacteria for poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production. *Stud. Environ. Sci.*, v. 66, p. 737-748, 1997.
- VERLINDEN, R. A. J.; HILL, D. J.; KENWARD, M. A.; WILLIAM, C. D.; RADECKA, I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Appl. Microbiol.*, v. 102, p. 1437-1449, 2007.
- WANG, F.; LEE, S. Y. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 63, p. 3703-3706, 1997.
- WU, Q.; HUANG, H.; HU, G.; CHEN, J.; HO, K.; CHEN, G.-Q. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 80, p. 111-118, 2001.