

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) DE *Cupriavidus necator* APÓS LIOFILIZAÇÃO UTILIZANDO LEITE DESNATADO COMO CRIOPROTETOR

F. M. MARTINHAGO¹; W. F. STEFFEN¹; T. R. GUIMARÃES¹; C. B. ALVES¹; W. SCHMIDELL¹; G. M. F. de ARAGÃO¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

E-mail para contato: glaucia@enq.ufsc.br

RESUMO – A preservação de micro-organismos por diferentes metodologias de secagem tem sido utilizada há décadas. Essas metodologias garantem o armazenamento de culturas por longos períodos de tempo, mantendo suas características fisiológicas. A liofilização é o método preferido para transporte e armazenamento de vastas coleções de cultura de micro-organismos. Este trabalho relata o crescimento e produção de P(3HB) por *C. necator* após a bactéria ser submetida à liofilização, utilizando leite desnatado como protetor. A cepa foi cultivada em meio mineral, incubada a 150 rpm/35 °C por 42 h, em seguida, 1 mL do caldo foi misturado a 1 mL de leite, acondicionado em tubos de vidro e liofilizados. A viabilidade celular foi determinada com plaqueamento e contagem (expressa em UFC/mL) antes e após (0, 14, 21 e 80 dias) o processo de liofilização. Para efeito comparativo do crescimento de *C. necator* e produção de P(3HB) após a liofilização, dois cultivos em frascos foram realizados a partir de uma cepa liofilizada (120 dias após o processo de liofilização) e outra armazenada em glicerol a -80 °C (considerado o armazenamento “controle”), apresentando $\mu_{\text{máx}}$ de 0,16 h⁻¹ e 0,15 h⁻¹, respectivamente. Observou-se um decréscimo na contagem total da cepa liofilizada em função do tempo de armazenamento de 5,2x10⁸ UFC/mL logo após o processo de liofilização (sem armazenamento), para 2,4x10⁶ após 80 dias. Porém este decréscimo na viabilidade celular não influenciou no crescimento de *C. necator* e a bactéria se mostrou capaz de sintetizar o polímero.

1. INTRODUÇÃO

Com a crescente preocupação ambiental relacionada às altas quantidades de lixo produzido e considerando-se que grande parte deste lixo é composto por polímeros de difícil degradação, derivados do petróleo, buscam-se alternativas para substituir estes polímeros em sua vasta gama de aplicações (Lee, *et al.* 1996).

O poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) é um material de reserva energética intracelular,

acumulado por muitos microrganismos sob condições de estresse nutricional, quando há uma fonte de carbono disponível e outro nutriente, como o nitrogênio, o fósforo ou o oxigênio, em concentração limitante. O P(3HB) possui propriedades físicas semelhantes às do polipropileno e pode ser facilmente biodegradado tanto sob condições aeróbias como anaeróbias (Arun *et al.*, 2006).

Dentre os microrganismos que são capazes de sintetizar o P(3HB), a bactéria *Cupriavidus necator* é uma das que apresenta condições mais favoráveis à produção industrial, devido à sua capacidade de acumular até 80 % de seu peso seco em biopolímero e a de assimilar diferentes fontes de carbono (Squio e Aragão, 2004).

Em processos biotecnológicos, é de grande interesse que o organismo seja preservado por um longo período de tempo através de um método que não permita, ou que minimize, a ocorrência de mutações que possam vir a influenciar as características da cultura original (Cameotra, 2007). A preservação de microrganismos por diferentes metodologias é amplamente utilizada, sendo uma destas, a liofilização. A liofilização é uma técnica que associa os métodos de congelamento e desidratação sob condições de vácuo, onde a água e outros solventes do produto congelado são removidos pelo processo de sublimação. (Miyamoto-Shinohara *et. al.*, 2008). Outra metodologia bem difundida de preservação é o congelamento a -80 °C com adição de glicerol, que consiste na manutenção de uma variedade de tipos celulares sob baixas temperaturas, tendo como principal objetivo a redução de danos aos materiais biológicos, incluindo células animais e vegetais, bactérias, fungos, vírus e tecidos, durante o processo de congelamento e estocagem a frio (Wolfe e Bryant, 2001).

Agentes protetores podem ser adicionados tanto durante o crescimento do microrganismo quanto momentos antes da liofilização. O tipo de protetor empregado varia de acordo com as características do microrganismo (Hubálek, 2003). Dentre os agentes crioprotetores mais utilizados estão o leite desnatado, a glicose, a trealose, o inositol, entre outros (Tymczyszyn, *et al.* 2011). Estudos mostram que o leite desnatado é muito empregado por ser capaz de prevenir a lesão celular através da estabilização dos constituintes da membrana celular, criar uma estrutura de poro nos produtos liofilizados, o que torna a reidratação mais fácil e ainda conter proteínas que promovem um revestimento protetor para as células (Abadias *et al.*, 2001).

Frente ao exposto, este trabalho teve como objetivo estudar a preservação da bactéria *C. necator* utilizando o método de liofilização e avaliar sua viabilidade celular e a produção de P(3HB) após o processo, utilizando leite desnatado como agente crioprotetor.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Processo de Liofilização da Biomassa e Avaliação da Viabilidade Celular Após o Processo de Liofilização

Microrganismo e condições de cultivo: O microrganismo utilizado neste trabalho foi a bactéria *Cupriavidus necator* DSM 545 que estava armazenada em glicerol a -80 °C até o momento da inoculação.

As células foram inoculadas em 150 mL de caldo nutriente (Nutrient Broth - NB), que contém peptona de carne (5,0 g/L) e extrato de carne (3,0 g/L). A cultura foi incubada em agitador orbital, a 35 °C e rotação de 150 rpm. Após 24 horas, 15 mL de inóculo foram transferidos para uma segunda pré-cultura, de caldo nutriente com a mesma composição e volume da primeira, e incubado sob as mesmas condições durante 18 horas. Em seguida, uma alíquota de 40 mL foi transferida para o meio mineral, sem limitação de nitrogênio, conforme descrito por Ienczak *et al.* (2011).

Amostras foram retiradas, a partir do meio mineral, em intervalos de duas horas, para o acompanhamento do crescimento celular por espectrometria a 600 nm. Os dados foram utilizados para determinar a curva de crescimento do microrganismo estudado ($\ln \text{Abs} \times \text{tempo}$), definindo a velocidade específica máxima de crescimento, para posterior realização da liofilização das células colhidas em fase exponencial de crescimento.

Liofilização: Para a liofilização da cultura celular, adicionou-se 1 mL do caldo cultivado em meio mineral a 1 mL de leite desnatado em tubos de vidro de 8x120 mm, com espessura de parede de 1 mm. Os tubos foram mantidos a -20 °C por 6 horas, e posteriormente transferidos para câmara de secagem, a -50 °C e pressão de 6 mmHg, por 24 horas. O liofilizador utilizado foi da marca Liobras, modelo L101. Após este processo, os tubos foram selados. Todo este processo foi realizado de maneira estéril, evitando-se assim a contaminação da cultura.

Viabilidade Celular: A fim de se verificar a viabilidade celular do microrganismo estudado ao longo do tempo após o processo de liofilização, plaqueamentos foram realizados em 0, 14, 21 e 80 dias após este processo.

2.3. Avaliação da Capacidade de Crescimento e Produção de P(3HB) por *C. necator* Após o Processo de Liofilização

O cultivo para estudar a produção de P(3HB) foi realizado a partir de duas pré-culturas em NB e uma terceira em meio mineral, como descritas no item 2.1. O meio de cultivo final também foi realizado em meio mineral, porém com limitação em nitrogênio, com concentrações iniciais de glicose/frutose e nitrogênio de 40 e 1 g/L, respectivamente.

Dois estudos cinéticos de crescimento, conforme descrito acima, foram realizados: um foi inoculado com a bactéria liofilizada e outro (controle) com a cepa mantida a -80 °C em glicerol, para avaliar a influência do processo de liofilização capacidade de crescimento e produção de P(3HB) por *C. necator*.

2.4. Técnicas Analíticas

Amostragem: Amostras de 2 mL foram coletadas a cada 2 h e acondicionadas em microtubos de plástico e centrifugadas (10956 xg por 3 min). Os sobrenadantes e os precipitados foram congelados separadamente para posteriores análises de substrato residual e acúmulo de polímero.

Determinação da concentração da biomassa: O acompanhamento do crescimento da biomassa

foi realizado por espectrofotometria a 600 nm e por meio de análise gravimétrica, em que o precipitado obtido após a centrifugação de 2 mL da amostra foi submetido à secagem em estufa a 100 °C por 24 h. Após este tempo, as amostras foram colocadas em dessecador por 20 minutos e pesadas. A amostragem foi realizada em triplicata.

Determinação da concentração de açúcares redutores totais: A determinação de açúcares redutores totais (ART) foi realizada pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

Determinação da concentração de nitrogênio: O nitrogênio foi determinado utilizando-se o *kit* Uréia ES (Gold Analisa) que determina uréia pelo método enzimático-colorimétrico.

Determinação da concentração de P(3HB): A concentração de P(3HB) foi determinada por cromatografia gasosa, conforme o método de metanólise baseado Brandl et al. (1988).

2.5. Tratamento dos Dados

Considerando-se que o acúmulo de P(3HB) é intracelular, define-se: X_t (biomassa total) = biomassa contendo P(3HB) e X_r (biomassa residual) = $X_t - P(3HB)$.

Velocidade específica de crescimento da biomassa: A partir dos perfis de concentração da biomassa residual, foi possível determinar as velocidades instantâneas de crescimento microbiano (dX_r/dt). Dividindo-se estas velocidades pela concentração celular residual no instante t , a velocidade específica de crescimento celular (μ_{X_r}) foi obtida e está representada pela Equação 1.

$$\frac{1}{X} \frac{dX_r}{dt} = \mu_{X_r} \quad (1)$$

Integrando a Equação 1, obtém-se a Equação 2.

$$\ln(X_r)_{x_0}^x = \mu_{X_r} (t)_{t_0}^t \quad (2)$$

Como a concentração celular possui relação linear com a absorbância do meio, pode-se simplificar a Equação 2, obtendo-se a Equação 3, onde μ_{X_r} passa a ser o coeficiente angular de uma reta. Abs representa a absorbância em um tempo t ao longo do cultivo, e Abs_0 a absorbância no instante inicial. O $\mu_{X_{r\text{máx}}}$ é determinado na região onde a inclinação da reta é máxima e constante.

$$\ln(X_r) = \mu_{X_r} (t) \quad (3)$$

A determinação da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X_{r\text{máx}}}$) foi realizada para posterior comparação entre a atividade biológica da cepa antes e depois da liofilização.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 estão apresentados os resultados do acompanhamento da viabilidade celular do

microrganismo ao longo do período de estocagem. Foi possível perceber um rápido decaimento na viabilidade celular logo após o processo de liofilização. Decorridos 80 dias de armazenamento, a viabilidade reduziu para 0,17%. Bozoglu *et al.* (1987) sugerem que sobrevivência de 0,1 % da população original é um “número suficiente” de sobreviventes para posterior reativação das mesmas.

Tabela 1 – Unidades formadoras de colônias por mL e viabilidade celular de *C. necator* após o processo de liofilização ao longo do período de armazenamento de 0, 14, 21 e 80 dias.

Tempo (dias)	Anterior à liofilização	0	14	21	80
UFC/mL	$2,86 \times 10^{10}$	$5,55 \times 10^9$	$8,51 \times 10^8$	$8,05 \times 10^8$	$4,87 \times 10^7$
Viabilidade (%)	100	19,37	2,97	2,81	0,17

No cultivo realizado em frascos agitados, buscou-se estudar o comportamento cinético da cepa de *C. necator* liofilizada, em termos de crescimento celular, consumo de substrato e produção de P(3HB), após o processo de liofilização. Para fins de comparação, um cultivo controle foi realizado nas mesmas condições descritas anteriormente, porém uma cepa armazenada em glicerol a -80°C foi utilizada como inóculo.

A curva de crescimento gerada a partir do $\ln(X_r)$ ao longo do tempo, é apresentada na Figura 1, para o cultivo controle e para o cultivo realizado a partir de células liofilizadas, e foi utilizada para definir o $\mu_{X_{\text{rmax}}}$.

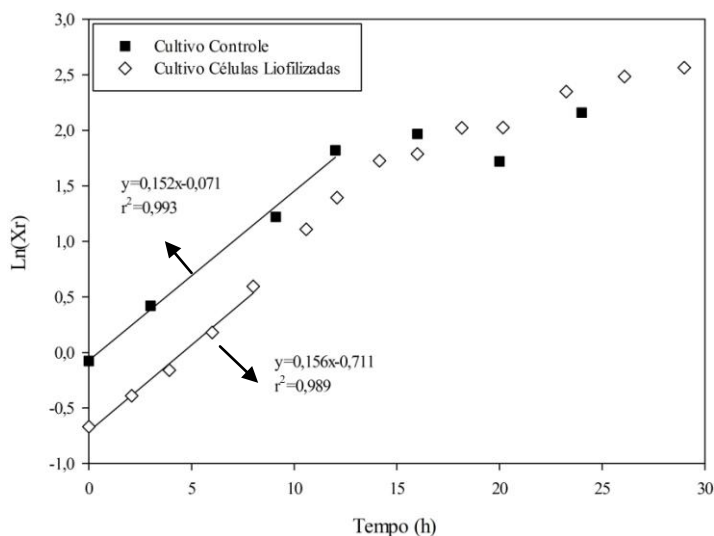


Figura 1 – Representação logarítmica da biomassa residual de *C. necator* armazenada em glicerol a -80°C (■) e liofilizada (◇) ao longo do tempo de cultivo em glicose e frutose, para obtenção da velocidade específica máxima de crescimento.

Como é possível observar na Figura 1, os valores de $\mu_{X_{r\max}}$ obtidos foram de 0,15 e 0,16 h⁻¹ para a célula armazenada em glicerol a -80 °C e para a célula liofilizada, respectivamente. Esta comparação mostra que para ambos os cultivos o $\mu_{X_{r\max}}$ foi semelhante, comprovando assim a efetividade do processo, pois conservou as propriedades da cepa.

Estudos realizados por Zayed e Roos (2004) mostraram que a preservação de *Lactobacillus salivarius* utilizando leite desnatado como crioprotetor atingiu viabilidade celular de aproximadamente 22 %. Neste trabalho 19,37 % das células se mantiveram viáveis, o que está de acordo com a literatura.

Nas Figuras 2 e 3 são apresentados os dados de concentração de biomassa total (X_t), P(3HB), biomassa residual glicose/frutose e nitrogênio residuais ao longo do tempo, para o cultivo controle e para o cultivo a partir de células liofilizadas, respectivamente.

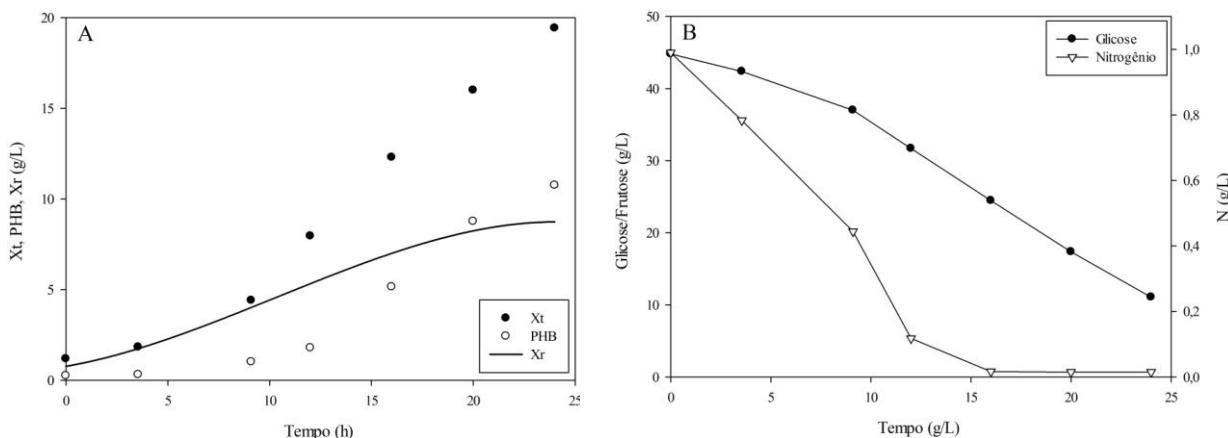


Figura 2 - Concentração de biomassa total (X_t), de P(3HB) e de biomassa residual (X_r) (A); glicose/frutose e nitrogênio residuais (B) ao longo do tempo para *C. necator* armazenada em glicerol a -80 °C.

Apesar do valor de $\mu_{X_{r\max}}$ obtido para cinética com biomassa liofilizada ser bem próximo ao valor encontrado para o cultivo controle, quando se compara os resultados de produção do polímero é possível perceber que o acúmulo de P(3HB) foi inferior para o cultivo da cultura liofilizada, quando comparado ao cultivo controle, sendo de 30 e 55,4 %, respectivamente. É possível verificar também, que diferentemente do cultivo com *C. necator* armazenada em glicerol, onde ocorreu a exaustão de N em torno de 15 h, no cultivo a partir de células liofilizadas, esta exaustão ocorreu apenas após 25 horas de cultivo, esta diferença no consumo deste substrato pode justificar a diferença entre os percentuais finais de acúmulo de biopolímero.

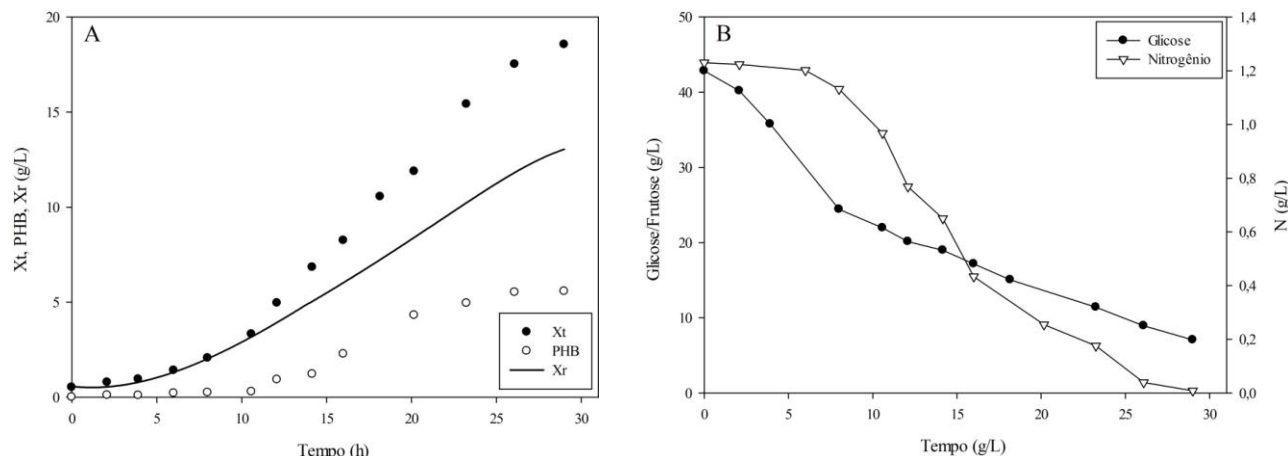


Figura 3 - Concentração de biomassa total (X_t), de P(3HB) e biomassa residual (X_r) (A); glicose/frutose e nitrogênio residuais (B) ao longo do tempo para *C. necator* liofilizada.

Ao avaliar as Figuras 2 e 3 (B), percebem-se que ao final dos cultivos a concentração da fonte de carbono estava próxima a 10 g/L, sendo que esta concentração já pode ser considerada insuficiente para a produção de P(3HB) a partir de *C. necator*. No cultivo controle, no momento da exaustão em N, a concentração de carbono disponível era superior a 25 g/L possibilitando assim um maior acúmulo de P(3HB), devido à maior disponibilidade de glicose/frutose no meio durante a fase de produção.

5. CONCLUSÃO

Os resultados de viabilidade celular mostraram que, apesar de sofrer um decréscimo ao longo do tempo, a cepa liofilizada permaneceu suficientemente viável após 80 dias de armazenamento.

Pelo valor de $\mu_{X_{rm\acute{a}x}}$ obtido em ambos os cultivos, percebe-se que o processo de liofilização proposto foi eficiente na manutenção da cepa, pois apresentou crescimento semelhante ao da cepa armazenada em glicerol a -80 °C.

Apesar da manutenção da viabilidade celular e do $\mu_{X_{rm\acute{a}x}}$ obtido na cinética de crescimento a partir de células liofilizadas ser similar ao do cultivo controle, o consumo de nitrogênio pela cepa liofilizada apresentou comportamento diferente do controle, porém mesmo assim, foi possível observar o acúmulo de polímero de 30 % nesta cultura.

6. REFERÊNCIAS

- ABADIAS, M.; BENABARRE, A.; TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; VIÑAS, I. Effect of freeze-drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 65, p. 173–182, 2001.
- ARUN, A.; MURRUGAPPAN, R.; RAVINDRAN, A.D.D.; VEERAMANIKANDAN, V.; BALAJI, S. Utilization of various industrial wastes for the production of poly-beta-hydroxy butyrate

- (PHB) by *Alcaligenes eutrophus*. *African Journal of Biotechnology*, v. 5, p. 1524-1527, 2006.
- BOZOGLU, T.F.; OZILGEN, M.; BAKIR, U. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 9, p. 531-537, 1987.
- BRANDL, H. GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Applied Environmental Microbiology*, v. 54, p. 1977-1982. 1988.
- CAMEOTRA, S. S. Preservation of microorganisms as deposits for patent application, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 353, p. 849-850, 2007.
- HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, New York, v. 46, p. 205-229, 2003.
- IENCZAK, J. L.; QUINES, L. K.; MELO, A. A. de; BRANDELLERO, M.; MENDES, C. R.; SCMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F. High cell density strategy for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 28, No. 04, pp. 585 - 596, October - December, 2011.
- LEE, S. Y.; KIM, G. J.; CHOI, D. K.; YEON, B. K.; PARK, Y. H. Improvement of hydroxyvalerate fraction in poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 81, p. 255-258, 1996.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428. 1959.
- MIYAMOTO-SHINOHARA Y, SUKENOBE J, IMAIZUMI T, NAKAHARA T. Survival of freeze-dried bacteria. *The Journal of general and applied microbiology*, Tokyo, v. 54, n.1, p. 9-24, feb./ 2008.
- SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M. F. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-Hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bactérias, *Química Nova*, v. 7, 2004.
- TYMCZYSZYN, E. E.; GERBINO, E.; ILLANES, A.; GÓMES-ZAVAGLIA, A. Galacto-oligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Cryobiology* v. 62, p. 123-129, 2011.
- WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration*, Surrey, v. 24, p. 438-450, 2001.
- ZAYED, G., ROOS Y. H. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry*, 36, 1081 - 1086, 2004