

# A metodologia de superfície de resposta como ferramenta para a avaliação da produção de alginato e poli-hidroxi-butirato pela *Azotobacter vinelandii*

Adriana Navarro da Silva\* e Crispin Humberto Garcia-Cruz

Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: drykans@yahoo.com.br

**RESUMO.** O alginato é um polissacarídeo normalmente extraído de paredes celulares de algas marrons e utilizado nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e biotecnológicas. A produção é concentrada no cultivo de algas marinhas marrons, mas várias bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Azotobacter* produzem alginato. A estrutura química dos alginatos produzidos por algas é similar a dos sintetizados pela *A. vinelandii*. Esta bactéria também produz polímeros intracelulares como o poli-hidroxi-butirato (PHB), conhecido como bioplástico. Neste trabalho, estudou-se a produção simultânea do alginato e PHB pela *A. vinelandii*, utilizando-se sacarose e diferentes parâmetros de fermentação em agitador orbital rotatório. Os valores ótimos para produção destes compostos foram determinados pela MSR. O 1º experimento foi um planejamento fatorial fracionado 2<sup>6-2</sup>. O 2º foi baseado nas variáveis significativas do 1º experimento, resultando em um planejamento fatorial completo 3<sup>3-0</sup>. Verificou-se, do primeiro para o segundo, aumento na produtividade do PHB de 12 para 45 mg g<sup>-1</sup> de célula h<sup>-1</sup> e do alginato de 100 para 1.600 mg g<sup>-1</sup> de célula h<sup>-1</sup>. A produtividade de ambos os compostos foi máxima na temperatura de incubação de 62°C, no menor tempo de incubação (18h) e na concentração de sacarose de 11 g L<sup>-1</sup>. Em ambos os experimentos, o PHB extraído apresentou pureza de 94%.

**Palavras-chave:** alginato, poli-hidroxi-butirato (PHB), produção, *Azotobacter vinelandii*.

**ABSTRACT.** The response surface methodology as a tool for assessing the production of alginate and polyhydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii*. Alginate is a polysaccharide extracted from cell walls of brown algae and used in the food, pharmaceuticals and biotech industries. Production is concentrated on the cultivation of brown seaweed, but several bacteria of the genus *Pseudomonas* and *Azotobacter* produce alginate. The chemical structure of alginates produced by algae is similar to those synthesized by *A. vinelandii*. The bacteria also produce intracellular polymers such as polyhydroxybutyrate (PHB), known as bioplastic. This work studied the simultaneous alginate and PHB production by *A. vinelandii* using sucrose and different parameters of fermentation in an orbital shaker. The optimal values for the production of these compounds were determined by the MSR. The first experiment was a 2<sup>6-2</sup> factorial design. The second was based on significant variables of the first, resulting in a full 3<sup>3-0</sup> factorial design. From the first to the second, an increase was observed in the PHB productivity from 12 to 45 mg g<sup>-1</sup> cell h<sup>-1</sup> and alginate from 100 to 1,600 mg g<sup>-1</sup> of cell h<sup>-1</sup>. The productivity of both compounds was in the maximum incubation temperature of 62°C, in the shortest time of incubation (18h) and the sucrose concentration, 11 g L<sup>-1</sup>. In both experiments the PHB extracted presented purity of 94%.

**Key words:** alginate, polyhydroxybutyrate (PHB), production, *Azotobacter vinelandii*.

## Introdução

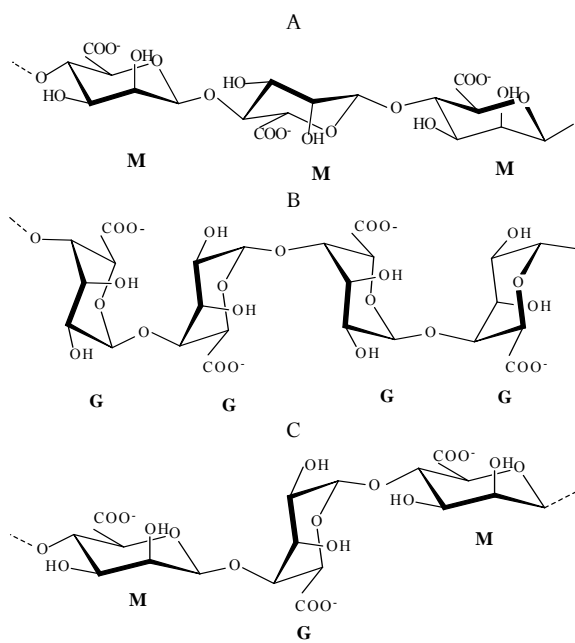
O alginato é um polissacarídeo normalmente extraído das paredes celulares de algas marrons (*Phaeophyta*), sendo utilizado como agente estabilizante, espessante e gelificante, na indústria de alimentos e também como imobilizador de células nas indústrias farmacêutica e biotecnológica.

O alginato, nas algas marinhas, encontra-se como

componente estrutural da parede celular e nos espaços intracelulares, promovendo rigidez e, ao mesmo tempo, flexibilidade à parede celular e compreende cerca de 40% da matéria seca destes organismos. Anualmente, a indústria produz cerca de 30 mil toneladas de alginatos, cujas algas são cultivadas em fazendas marinhas.

A estrutura do ácido alginico consiste de cadeias

lineares de resíduos de ácido  $\beta$ -D-manurônico (M) unidos por ligações tipo (1 $\rightarrow$ 4) e resíduos de seu epímero, o ácido  $\alpha$ -L-gulurônico (G), em várias proporções. Estes resíduos estão arranjados na forma de blocos de ácidos manurônico (M) ou gulurônico (G), ligados de forma que a sequência destes resíduos na molécula seja alternada (BRAYNER et al., 2007). A molécula deste polímero é constituída por blocos homopoliméricos, M- e G-, e por blocos heteropoliméricos MG- (Figura 1). Na molécula, a disposição espacial dos monômeros se dá segundo a posição energética mais favorável. Para blocos G—G, esta é uma posição em forma de cadeira,  ${}^1C_4$ , sendo os monômeros unidos por ligação glicosídica  $\alpha(1\rightarrow4)$ . Para M—M, trata-se da posição  ${}^4C_1$ , sendo a ligação glicosídica do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ . O grupo carboxílico é responsável por uma ligação glicosídica equatorial/equatorial em M—M, uma ligação glicosídica axial/axial em G—G e uma ligação glicosídica equatorial/axial para M—G.



**Figura 1.** Estrutura dos blocos homopoliméricos M- e G- e dos blocos heteropoliméricos MG- que constituem a molécula de alginato. Na parte superior da Figura (A), tem-se uma sequência M-M; no centro, (B) uma sequência G-G e, na parte inferior da Figura (C), uma sequência M-G-M. Adaptado de Iwamoto et al. (2005).

As propriedades físico-químicas dos alginatos dependem da massa molecular, da proporção dos monômeros M:G ao longo da cadeia e também do grau de acetilação. Os alginatos são produzidos por bactérias e por algas marinhas marrons, e os resíduos de manuronato dos alginatos bacterianos, mas não os de algas, são acetilados nas posições O-2 e/ou O-3 (XIAO et al., 2006).

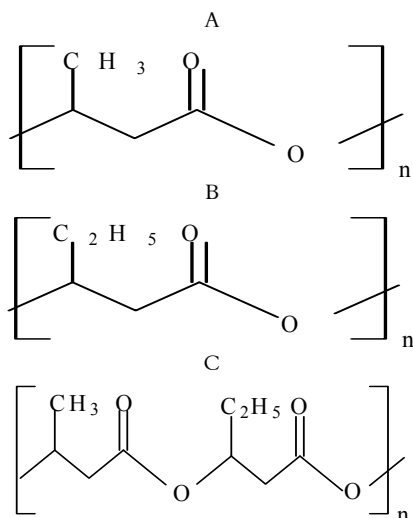
Atualmente, a produção é concentrada, principalmente, no cultivo de algas marinhas marrons, entretanto, várias bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e *Azotobacter* produzem alginato (ROZEBOOM et al., 2008) e a estrutura dos blocos de resíduos dos monômeros é similar nos alginatos produzidos por algas marinhas e nos sintetizados por *A. vinelandii* (PEÑA et al., 2006). Em contraste, todos os alginatos de *Pseudomonas*, embora possuam monômeros G, não possuem sequências destes monômeros, ou seja, não possuem blocos G (GARCIA-CRUZ et al., 2008).

Pela propriedade de o ácido algínico ser insolúvel em água à temperatura ambiente, os sais de sódio, cálcio e potássio do ácido algínico, solúveis em água, são preferidos para o emprego na indústria de alimentos. O composto mais amplamente usado é o alginato de sódio. Em muitas aplicações, o alginato de sódio solúvel torna-se insolúvel por meio da adição de cátions divalentes, geralmente cálcio, resultando em géis ou filmes. A força do gel depende da natureza do cátion divalente.

Com a diversidade de aplicações deste polímero nos setores alimentício e farmacêutico e a constante poluição dos mares, uma vez que as algas necessitam de água límpida para seu crescimento, a comunidade científica engajou-se em uma pesquisa continuada, visando entender melhor as vias bioquímicas, a função fisiológica e a biologia das bactérias produtoras deste polímero, visando à regulação da sua formação e composição, e ainda à otimização do processo de produção. A bactéria *Azotobacter vinelandii* se mostrou mais promissora para a produção de alginato por não ser patogênica e produzir elevadas quantidades deste polímero.

A *Azotobacter vinelandii*, além de produzir o alginato, apresenta outra característica importante: sob limitação de nutrientes como fósforo, oxigênio e na presença de excesso de uma fonte de carbono esta bactéria produz poli-hidroxialcanoatos (PHAs), polímeros intracelulares pertencentes à família dos poliésteres. Os PHAs podem ser sintetizados por muitas bactérias em biorreatores a partir de açúcares em condições de estresse. Estes polímeros podem representar até 80% da massa seca total da célula. São polímeros 100% biodegradáveis e biocompatíveis.

Os PHAs também são conhecidos como bioplásticos, pois possuem propriedades termoplásticas e características de desempenho semelhantes às dos plásticos convencionais, entretanto, os bioplásticos são facilmente degradados pela ação de microrganismos no meio ambiente. São exemplos de PHAs: poli-hidroxibutirato (PHB), poli- $\beta$ -hidroxivalerato (PHV) e o poli-hidroxibutirato-co-valerato (PHB-V).



**Figura 2.** Estrutura química dos poli-hidroxialcanoatos (PHAs): a) poli-hidroxibutirato; b) poli-hidroxivalerato e, c) poli-hidroxibutirato-covalerato Adaptado de Franchetti e Marconato (2006).

Muitos microrganismos são produtores de PHAs e, destes, a espécie *Azotobacter vinelandii* é uma bactéria que pode acumular grandes quantidades de PHB com a vantagem de utilizar, durante seu crescimento, ampla variedade de açúcares não necessariamente refinados, como os encontrados em melão de cana-de-açúcar, beterraba e xarope de milho.

Tendo em vista a importância mundial do alginato e do poli-hidroxibutirato, este trabalho ilustra o estudo da produção de ambos os compostos pela bactéria *Azotobacter vinelandii*, utilizando fermentação submersa com diferentes parâmetros (pH, temperatura de incubação, tempo de incubação, diferentes concentrações de sais e também diferentes concentrações de sacarose como fonte de carbono) e a Metodologia de Superfície de Resposta como instrumento estatístico para a avaliação da produção.

## Material e métodos

### Material

#### a) Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o *Azotobacter vinelandii* CCT 2841 = DSM 85, obtido da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia 'André Tosello' – Campinas, Estado de São Paulo.

#### b) Meio de Manutenção

A linhagem do microrganismo *Azotobacter vinelandii* foi mantida em ágar YM cuja fórmula é composta por (em gramas por litro): extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona 5,0; dextrose 10,0; ágar 20,0 e água destilada 1,0 L.

#### c) Meio de pré-fermentação e fermentação

Para a pré-fermentação foram utilizados Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de caldo nutriente. Na etapa de fermentação para a produção de PHB e alginato, foi utilizado o meio mínimo ou basal composto por (em gramas por litro):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,16;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,64;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,4;  $\text{NaCl}$  0,2;  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,05;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,0025 e  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,001. O pH foi ajustado de acordo com o delineamento experimental. As soluções de sacarose em diferentes concentrações foram misturadas no meio mínimo no momento da fermentação. O meio mínimo foi esterilizado separadamente da solução de sacarose, ambos em autoclave a 121°C por 20 min.

## Métodos

### a) Preparo do pré-inóculo

A partir da cultura estoque do *Azotobacter vinelandii* CCT 2841 = DSM 85, foram repicados, por estrias em esgotamento, tubos inclinados de PCA e incubados em estufa a 30°C por 24h.

### b) Produção do PHB e do Alginato

A produção foi dividida em duas etapas: pré-fermentação e fermentação. Na primeira, foi realizada a suspensão das células bacterianas (obtidas no item Métodos a.) pela adição de 5,0 mL do caldo nutriente em cada tubo de ensaio. A seguir, foram transferidas para frascos Erlenmeyer, contendo 45 mL deste mesmo meio e estes foram incubados em agitador orbital rotatório a 30°C, 225 rpm por 24h (PAGE et al., 2001). Na segunda etapa, foi realizada a padronização do inóculo. Para isto, foi utilizado um espectrofotômetro Cintra 5 UV-VIS *Double Beam* até se atingir uma densidade ótica de 0,7 a 0,9 a 620 nm (BELLENGER et al., 2008). Logo após, os frascos Erlenmeyer foram incubados em agitador orbital rotatório a 120 rpm na temperatura e no tempo de incubação pré-determinados pelo planejamento experimental (item Métodos c.).

### c) Otimização dos parâmetros de fermentação

Para a otimização da produção do PHB ( $Y_1$  = poli-hidroxibutirato) e do alginato ( $Y_2$  = alginato), foram realizados dois planejamentos experimentais, utilizando-se o software Statistica 6.0, de maneira a se determinar a melhor área de produção de ambos os compostos. Desse modo, no primeiro delineamento experimental, foi realizado um planejamento estatístico fatorial fracionado  $2^{6-2}$  e as variáveis independentes estudadas foram:  $X_1$  = fonte de carbono em  $\text{g L}^{-1}$  (sacarose);  $X_2$  = pH;  $X_3$  = temperatura de incubação em °C;  $X_4$  = acetato de

amônio em  $\text{mmol L}^{-1}$ ;  $X_5$  = citrato de amônio e ferro (III) em  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e  $X_6$  = tempo de incubação em horas; resultando em 16 experimentos acrescidos de duas repetições no ponto central (MONTGOMERY, 2001) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Variáveis independentes estudadas no primeiro planejamento experimental  $2^{6-2}$ .

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
$X_1$ - fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ )	10,0	30,0	50,0
$X_2$ - pH	6	7	8
$X_3$ - temperatura de incubação ( $^{\circ}\text{C}$ )	25,0	32,5	40,0
$X_4$ - acetato de amônio ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	15,0	37,5	60,0
$X_5$ - citrato férrico ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	30,0	60,0	90,0
$X_6$ - tempo de incubação (h)	48	72	96

Com a perspectiva de se aproximar da região ótima de produção, realizou-se um segundo planejamento experimental, utilizando-se apenas as variáveis significativas ( $X_1$  = sacarose em  $\text{g L}^{-1}$  e  $X_3$  = temperatura de incubação em  $^{\circ}\text{C}$ ) acrescidas da variável  $X_6$  = tempo de incubação em hora, resultando em um planejamento estatístico fatorial completo  $3^{3-0}$  em triplicata (81 experimentos) como descrito na Tabela 2. Durante o segundo experimento, manteve-se o pH inicial em 7 e as soluções de acetato de amônio e citrato de amônio e ferro (III) em  $37,5 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $57 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

**Tabela 2.** Variáveis independentes estudadas no segundo planejamento experimental  $3^{3-0}$ .

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
X1 - Fonte de Carbono ( $\text{g L}^{-1}$ )	2	6	10
X2 - Temperatura de incubação ( $^{\circ}\text{C}$ )	40	50	60
X3 - Tempo de incubação (h)	18	33	48

## Métodos analíticos

### a) Determinação do Crescimento Celular (Biomassa)

A massa celular foi determinada, medindo-se, no espectrofotômetro a 620 nm, uma suspensão de células em água destilada, após separação das mesmas por centrifugação a 8.000 rpm, 15 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ . Previamente, foi obtida a curva de correlação de absorbância versus peso seco. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### b) Obtenção do alginato e PHB

As células foram separadas do meio fermentado por centrifugação a 8.000 rpm durante 15 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, foram tratadas com acetona absoluta para se obter melhor pureza do produto final. Após esse procedimento, fez-se a retirada do PHB intracelular com clorofórmio. Para isto, utilizou-se a proporção de 100 mL de clorofórmio para cada 1-2 g de células e a mistura permaneceu

em refluxo por 15 min. na temperatura de  $61^{\circ}\text{C}$ . A seguir, separou-se o PHB do material celular por meio da filtração seguida de precipitação com etanol absoluto e o precipitado foi seco em estufa a vácuo a  $45^{\circ}\text{C}$  até peso constante.

O sobrenadante obtido na centrifugação foi utilizado para a obtenção do alginato. Desse modo, adicionaram-se 3V de etanol absoluto para a precipitação do alginato, o qual foi seco em estufa a vácuo a  $45^{\circ}\text{C}$  até peso constante.

### c) Purificação do alginato e PHB

A purificação foi realizada, dissolvendo-se o PHB em hidróxido de sódio 1 N, precipitando-o novamente com etanol absoluto (LIN; SADOFF, 1968). O alginato seco foi dissolvido em água destilada e precipitado novamente com etanol absoluto. Ambos os procedimentos foram repetidos três vezes.

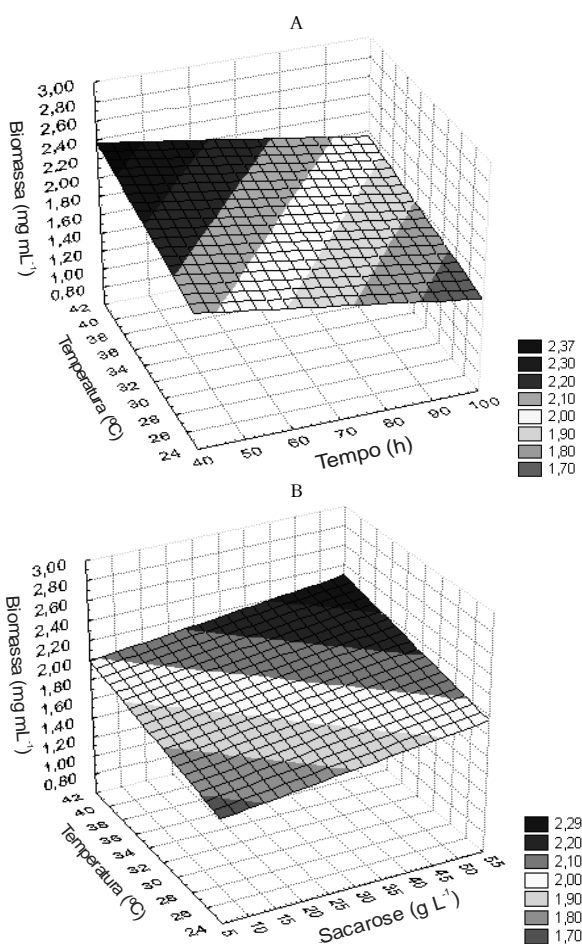
## Resultados e discussão

### Primeiro planejamento experimental

Com o estudo da Análise de Variância (ANOVA) pelo software STATISTICA, observou-se, no primeiro planejamento experimental (planejamento estatístico fatorial fracionado  $2^{6-2}$ ), que, embora tenham sido analisados diferentes parâmetros (concentração da fonte de carbono (sacarose), pH, temperatura de incubação, concentração de acetato de amônio, concentração de citrato de amônio e ferro (III) e tempo de incubação), nenhum parâmetro foi significativo estatisticamente para o favorecimento da biomassa. Entretanto, por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), pode-se observar que o aumento da biomassa ( $2,29 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi acompanhado pelo acréscimo da concentração de sacarose ( $55 \text{ g L}^{-1}$ ) na temperatura entre  $38-42^{\circ}\text{C}$  e tempo entre 40-50h (Figura 3). O comportamento da biomassa em relação à fonte de carbono apresentou valores semelhantes aos obtidos por Cho et al. (2001) e foi observado que, quanto maior a concentração da fonte de carbono, maior é o crescimento bacteriano.

O estudo do crescimento bacteriano da *Azotobacter vinelandii*, com relação à variação de temperatura, não havia sido registrado anteriormente nos artigos de referência, que apenas citavam a faixa de  $25-30^{\circ}\text{C}$ . Entretanto, a melhor temperatura para o desenvolvimento celular foi entre  $38-42^{\circ}\text{C}$ . O tempo também é fator importante para se determinar a fase do crescimento bacteriano; sendo assim, o valor encontrado neste primeiro

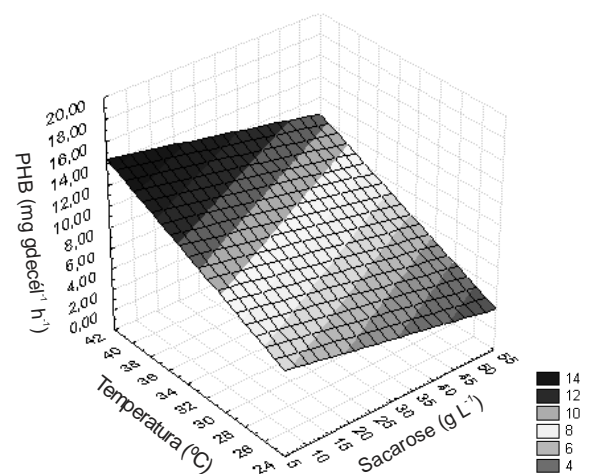
experimento foi entre 40-50h como o maior valor de biomassa da *A. vinelandii* e, acima deste tempo, ocorreu uma diminuição da biomassa. Alguns autores (VARGAS-GARCIA et al., 2002; LIN; SADOFF, 1968) também encontraram maiores valores de biomassa entre 40-50h. O comportamento gráfico dos resultados está representado pelas equações: Figura 3(a): Biomassa ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) =  $1,169 + 0,0061 * x + 0,0189 * y$ , em que: x = sacarose ( $\text{g L}^{-1}$ ) e y = temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e Figura 3(b): Biomassa ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) =  $1,8635 - 0,0071 * x + 0,0189 * y$ , em que: x = tempo (h) e y = temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).



**Figura 3.** Superfícies de resposta para: (a) concentração de biomassa ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de concentração de sacarose ( $\text{g L}^{-1}$ ) e temperatura de incubação ( $^{\circ}\text{C}$ ); (b) concentração de biomassa ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo (h) e temperatura de incubação ( $^{\circ}\text{C}$ ).

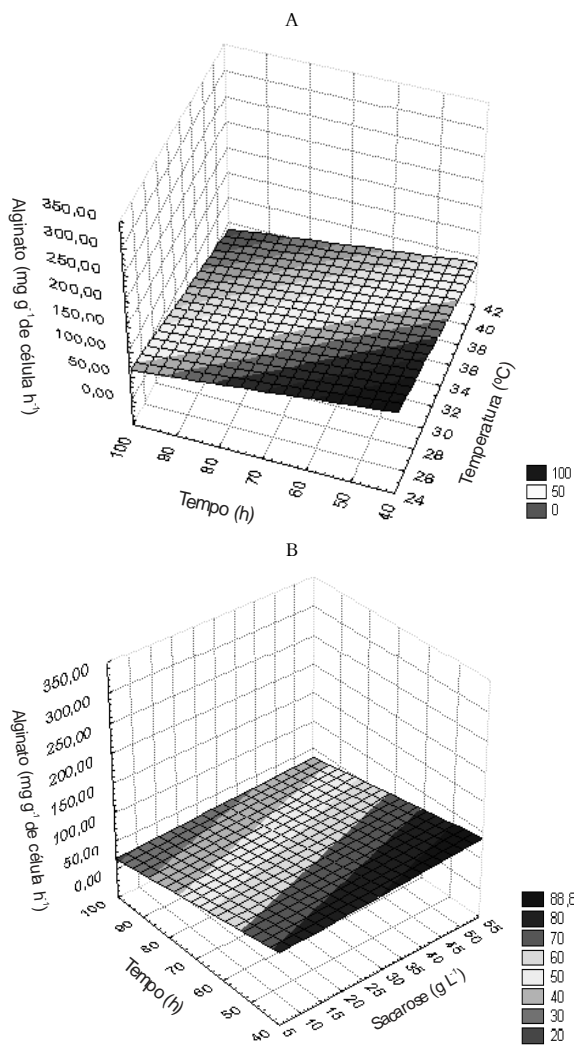
Em nosso experimento, a produção de PHB teve como parâmetros significativos, apenas a concentração de sacarose e a temperatura de incubação. Com a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), pode-se observar que a produção

máxima ( $12-14 \text{ mg g}^{-1}$  de célula  $\text{h}^{-1}$ ) foi obtida em menores concentrações de sacarose entre 5 a 20  $\text{g L}^{-1}$  e nas maiores temperaturas entre 39 e 42 $^{\circ}\text{C}$  (Figura 4). A vantagem em se utilizar a sacarose como fonte de carbono é que este açúcar é mais abundante e barato que a glicose e o Brasil é um dos maiores produtores deste açúcar, motivos pelos quais foi escolhida esta fonte de carbono. A equação que representa o comportamento da produção do PHB ( $\text{mg g}^{-1}$  de célula  $\text{h}^{-1}$ ) é  $= -4,62-0,081*x+0,46*y$  (em que: x = concentração de sacarose ( $\text{g L}^{-1}$ ) e y = temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )).



**Figura 4.** Superfícies de resposta para a concentração de PHB ( $\text{mg g}^{-1}$  de célula  $\text{h}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos da concentração de sacarose e temperatura de incubação ( $^{\circ}\text{C}$ ).

O estudo da Análise de Variância (ANOVA), na produção concomitante de alginato e poli-hidroxibutirato pela bactéria *A. vinelandii*, pode revelar que nenhuma das variáveis independentes apresentou significância estatística na produção do alginato. Entretanto, a metodologia de superfície de resposta (MSR) indicou que a produção de alginato foi máxima ( $89-100 \text{ mg g}^{-1}$  de célula  $\text{h}^{-1}$ ) entre 40-55h de fermentação, temperatura de 24-28 $^{\circ}\text{C}$  e sacarose na concentração de 40-55  $\text{g L}^{-1}$  (Figura 5). A equação que demonstra o comportamento da produção de alginato em função da temperatura (x) e do tempo (y) é: Alginato ( $\text{mg g}^{-1}$  de célula  $\text{h}^{-1}$ ) =  $256,55 - 4,31 * x - 0,8966 * y$ . A Figura 5 (b) demonstra o comportamento da produção de alginato em função da concentração de sacarose (x) e do tempo (y), cuja equação é: Alginato ( $\text{mg g}^{-1}$  de célula  $\text{h}^{-1}$ ) =  $106,31 + 0,3338 * x - 0,8966 * y$ .



**Figura 5.** (a) Superfícies de resposta para a concentração de alginato ( $\text{mg g}^{-1}$  de célula  $\text{h}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e tempo de incubação (h); (b) Superfícies de resposta para a concentração de alginato ( $\text{mg g}^{-1}$  de célula  $\text{h}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de concentração de sacarose ( $\text{g L}^{-1}$ ) e tempo de incubação (h).

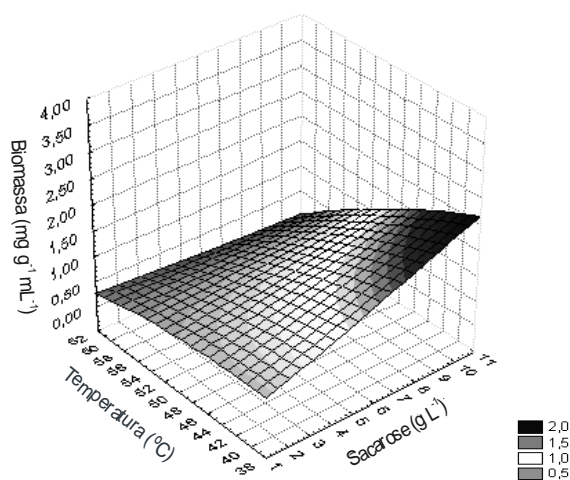
Comparando-se a quantidade de alginato produzida com os valores descritos na literatura, pode-se observar que Horan et al. (1983) obtiveram cerca de  $180 \text{ mg g}^{-1}$  de célula  $\text{h}^{-1}$ , utilizando  $20 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose como fonte de carbono. Brivonese e Sutherland (1989) utilizaram glicose como fonte de carbono e obtiveram entre  $6 - 7,5 \text{ g L}^{-1}$  de alginato a  $280 \text{ rpm}$  e observaram que, diminuindo a agitação para  $120 \text{ rpm}$ , a produção foi de apenas  $1,4 \text{ g L}^{-1}$  de alginato. Os resultados deste trabalho mostraram que a produção máxima de alginato foi

de  $29,8 \text{ g L}^{-1}$  em  $48\text{h}$  de incubação e  $120 \text{ rpm}$ .

Embora não apresentasse significância estatística, o menor valor de pH ( $\text{pH} = 6$ ) foi favorável para a produtividade do PHB e do alginato. Observou-se, também, que a produtividade de ambos os compostos foi favorecida com a adição de  $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (concentração mais baixa) de acetato de amônio e  $90,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de citrato de amônio e ferro (III), a maior concentração testada.

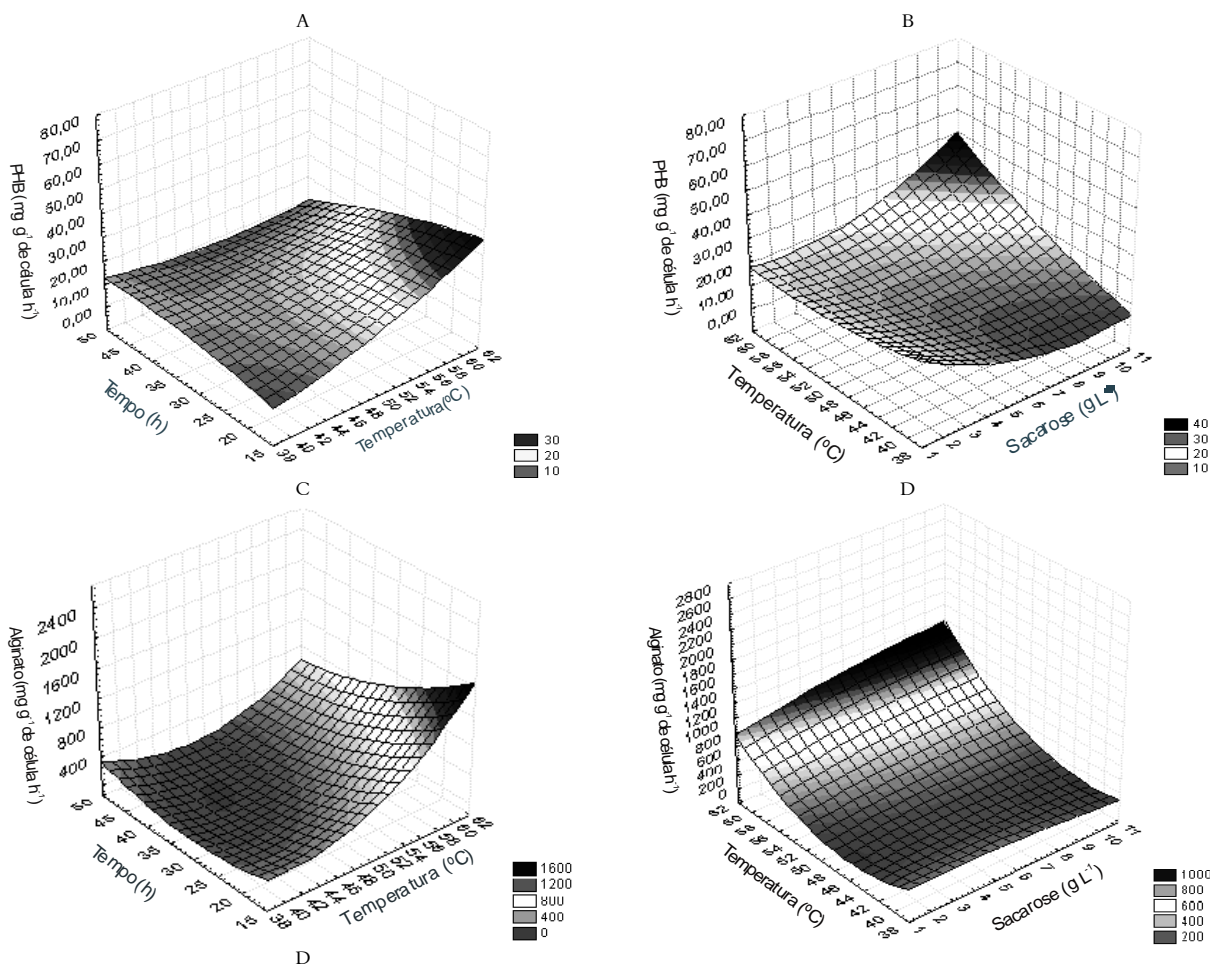
### Segundo planejamento experimental

No segundo planejamento experimental ( $3^{3-0}$ ), utilizando-se como variáveis independentes a fonte de carbono, a temperatura e o tempo de incubação, foi possível comprovar que o aumento da biomassa foi favorecido pelas elevadas concentrações de sacarose na temperatura de  $38^{\circ}\text{C}$  (Figura 6).



**Figura 6.** Superfícies de resposta para a biomassa ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos da concentração de sacarose ( $\text{g L}^{-1}$ ) e temperatura de incubação ( $^{\circ}\text{C}$ ).

Verificou-se também aumento na produtividade do PHB de  $12$  para  $45 \text{ mg g}^{-1}$  de célula  $\text{h}^{-1}$  e do alginato de  $100$  para  $1.600 \text{ mg g}^{-1}$  de célula  $\text{h}^{-1}$ . Portanto, a produtividade de ambos os compostos foi máxima na temperatura de incubação de  $62^{\circ}\text{C}$ , no menor tempo de incubação ( $18\text{h}$ ) e com sacarose na concentração de  $11 \text{ g L}^{-1}$  (Figura 7). A pureza do PHB extraído foi de  $94\%$  para ambos os planejamentos experimentais.



**Figura 7.** Superfícies de resposta para: (a) concentração de PHB ( $\text{mg g}^{-1}$  de célula  $\text{h}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e tempo de incubação (h); (b) concentração de PHB ( $\text{mg g}^{-1}$  de célula  $\text{h}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de concentração de sacarose ( $\text{g L}^{-1}$ ) e temperatura de incubação ( $^{\circ}\text{C}$ ); (c) concentração de alginato ( $\text{mg g}^{-1}$  de célula  $\text{h}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de concentração de sacarose ( $\text{g L}^{-1}$ ) e temperatura de incubação ( $^{\circ}\text{C}$ ); (d) concentração de alginato ( $\text{mg g}^{-1}$  de célula  $\text{h}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de concentração de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e tempo de incubação ( $^{\circ}\text{C}$ ).

### Conclusão

A produção concomitante de alginato e PHB pela bactéria *Azotobacter vinelandii* é máxima para ambos os compostos quando a fermentação é realizada em menor tempo de incubação, 15-18h, e, portanto, quando a biomassa bacteriana ainda se encontra baixa ( $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A temperatura de incubação ideal foi de  $62^{\circ}\text{C}$  e a concentração de sacarose de  $11 \text{ g L}^{-1}$ . A análise de variância (ANOVA) indicou que apenas a concentração de sacarose, a temperatura e o tempo de incubação apresentaram significância estatística em grande parte das análises; as demais variáveis não foram estatisticamente significativas para a produção máxima de ambos os produtos. Desse modo, foi possível produzir elevadas concentrações de alginato e PHB apenas controlando a concentração de sacarose inicial, a temperatura e o tempo de incubação.

### Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

### Referências

- BELLENGER, J. P.; WICHARD, T.; KRAEPIEL, A. M. L. Vanadium requirements and uptake kinetics in the dinitrogen-fixing bacterium *Azotobacter vinelandii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1478-1484, 2008.
- BRAYNER, R.; VAULAY, M. J.; FIÉVET, F.; CORADIN, T. Alginate-mediated growth of Co, Ni, and CoNi nanoparticles: influence of the biopolymer structure. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 5, p. 1190-1198, 2007.
- BRIVONESE, A. C.; SUTHERLAND, I. W. Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 97-102, 1989.
- CHO, K. S.; RYU, H. W.; PARK, C. H.; GOODRICH, P. R. Utilization of swine wastewater as a feedstock for the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 2, p. 129-133, 2001.
- FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C.

- Polímeros biodegradáveis uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.
- GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. Bacterial alginate: technological aspects, characteristics and production. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.
- HORAN, N. J.; JARMAN, T. R.; DAWES, E. A. Studies of some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 2985-2990, 1983.
- IWAMOTO, M.; KURACHI, M.; NAKASHIMA, T.; KIM, D.; YAMAGUCHI, K.; ODA, T.; IWAMOTO, Y.; MURAMATSU, T. Structure-activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264.7 cells. **FEBS Letters**, v. 579, n. 20, p. 4423-4429, 2005.
- LIN, L. P.; SADOFF, H. L. Encystment and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of  $\beta$ -hydroxybutyrate. **The Journal of Bacteriology**, v. 95, n. 6, p. 2336-2343, 1968.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 5<sup>th</sup> ed. New York: John Wiley and Sons, 2001.
- PAGE, W. J.; TINDALE, A.; CHANDRA, M.; KWON, E. Alginate formation in *Azotobacter vinelandii* UWD during stationary phase and the turnover of poly-b-hydroxybutyrate. **Microbiology**, v. 147, n. 2, p. 483-490, 2001.
- PEÑA, C.; HERNÁNDEZ, L.; GALINDO, E. Manipulation of the acetylation degree of *Azotobacter vinelandii* alginate by supplementing the culture medium with 3-(*N*-morpholino)-propane-sulfonic acid. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 200-204, 2006.
- ROZEBOOM, H. J.; BJERKAN, T. M.; KALK, K. H.; ERTESVÅG, H.; HOLTAN, S.; AACHMANN, F. L.; VALLA, S.; DIJKSTRA, B. W. Structural and mutational characterization of the catalytic A-module of the mannuronan C-5-epimerase AlgE4 from *Azotobacter vinelandii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 35, p. 23819-23828, 2008.
- VARGAS-GARCÍA, M. C.; LÓPEZ, M. J.; ELORRIETA, M. A.; SUÁREZ, F.; MORENO, J. Physiology of exopolysaccharide production by *Azotobacter vinelandii* from 4-hydroxybenzoic acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 129-133, 2002.
- XIAO, L.; HAN, F.; YANG, Z.; LU, X.; YU, W. A novel alginate lyase with high activity on acetylated alginate of *Pseudomonas aeruginosa* FRD1 from *Pseudomonas* sp. QD03. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 81-88, 2006.

Received on April 2, 2008.

Accepted on May 14, 2009.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.