

## AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO USO DE BUCHA VEGETAL (*LUFFA CYLINDRICA*) E SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO COM GLICEROL NO AUMENTO DA DENSIDADE CELULAR DE *E. COLI*

Leonardo de Souza (\*), Camila Magalhães Dias 2, Tayse Andrade Rodrigues 3, Manoéle Alegiance Fernandes Pereira 4, Antônio Helvécio Tótolá 5

\* Universidade Federal de São João Del-Rei. E-mail: leosouzaengio@outlook.com

### RESUMO

Os bioprocessos são utilizados pelo ser humano desde os primórdios para obtenção de alimentos como vinhos, pães e queijos. Contudo, com o desenvolvimento da biotecnologia industrial e da técnica do DNA recombinante, a produção de biomoléculas de alto valor agregado, que antes só eram obtidas em fontes naturais, se torna possível. Contudo, há grande dificuldade na elevação da escala de produção desses produtos, dado que as células naturalmente só produzem essas moléculas em quantidades necessárias para sua sobrevivência. Diante disso, técnicas têm sido propostas para promover a elevação da densidade celular com o intuito de elevar também a produção das biomoléculas de interesse. Frente a isso, o uso da *Luffa cylindrica* como suporte celular e a suplementação do meio de cultura com glicerol, como fonte de carbono alternativa, foram experimentadas. O uso da *Luffa cylindrica*, tratada termicamente, promoveu um aumento estatisticamente significativo da  $DO_{600nm}$ , indicando a elevação da densidade celular. Em acréscimo, a suplementação do meio de cultura LB com glicerol 30 mM e  $MgCl_2$  10 mM, também promoveu elevação estatisticamente significativa da  $DO_{600nm}$ . As condições de cultivo otimizadas obtidas neste trabalho apresentam características desejáveis para o cultivo em reator de leito fixo utilizando a *Luffa cylindrica* como suporte e operando em batelada alimentada ou contínua, com a alimentação de glicerol 30 mM e  $MgCl_2$  10 mM. As condições otimizadas obtidas neste trabalho se mostram promissoras, dado terem duplicado a  $DO_{600nm}$ , além do fato que os insumos utilizados são produtos naturais de baixo custo e resíduos industriais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Aumento da Densidade Celular, *Luffa cylindrica*, Bucha Vegetal, Reator de Leito Fixo e Insumos Renováveis.

### INTRODUÇÃO

A versatilidade microbiana expressa na capacidade de produzir diversos produtos de interesse humano vem sendo aproveitada há anos com a produção de alimentos e bebidas fermentadas. No entanto, o desenvolvimento da microbiologia e da biotecnologia permitiu o conhecimento de diversos outros compostos produzidos pelos microrganismos que apresentam grande utilidade para o ser humano. Entre eles, proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos, polímeros ou moléculas classificadas em metabólitos primários, compostos sintetizados que são essenciais para o crescimento celular e metabólitos secundários, não essenciais para o crescimento microbiano. Metabólitos primários como vitaminas e aminoácidos produzidos por via fermentativa apresentam produtividade de milhões de toneladas por ano, sendo utilizados em suplementação alimentar humana e animal. Os metabólitos secundários são de extrema importância para a saúde e nutrição. Esses produtos apresentam alto valor agregado e grande variedade de aplicações principalmente nas áreas da saúde e biotecnologia (Demain 2000).

Muitos produtos naturais são produzidos industrialmente por meio de bioprocessos e devido ao fato de tais moléculas apresentarem tamanha complexidade e muitos centros de assimetria o que inviabilizam a produção desses compostos por síntese química. Embora os bioprocessos apresentem essas vantagens, a produção desses compostos por microrganismo geralmente só ocorre em quantidades necessárias para o próprio uso. Diante disso, estratégias como manipulação genética e otimização de condições de cultivo têm sido utilizadas com o intuito de aumentar a produção dos produtos de interesse (Riesenberg, Schulz et al. 1991; Demain 2000).

O aumento da densidade celular é uma estratégia utilizada para a otimização da produção industrial de biomoléculas, por meio do aumento da produtividade celular. Contudo esse aumento só é útil se a produtividade específica do produto se mantiver elevada. Desta forma, é possível obter um maior rendimento do processo. Nas indústrias, cujos produtos de via microbiológica são produzidos em grandes volumes e possuem baixo valor agregado como compostos aromáticos, etanol, polihidroxibutirato e acetona, o aumento da produtividade celular é essencial para sua viabilidade econômica, uma vez que o número de células está relacionado à quantidade do produto de interesse. Em geral as técnicas para a elevação da densidade celular apresentam relevância econômica e ambiental para os processos biotecnológicos, dado que o cultivo em alta densidade diminui os volumes reacionais, promovendo a redução no tamanho dos equipamentos, do montante de água utilizado, da geração de vapores para esterilização e de energia consumida (Lee 1996).

Contudo, o aumento da massa celular impõe às células condições de estresse, como elevada pressão osmótica, privação de nutrientes, elevada concentração de substratos inibitórios, limitada transferência de oxigênio e calor e em casos de

microrganismos geneticamente modificados instabilidade de plasmídeos (Lee 1996; Shojaosadati, Varedi Kolaei et al. 2008). Entre as condições citadas, o fator inibitório mais proeminente em culturas microbianas em alta densidade é a produção de acetato, conforme relatado por diversos autores ( Riesenber, Schulz et al. 1991; Lee 1996; Shojaosadati, Varedi Kolaei et al. 2008). A produção do acetato é induzida por condições de excesso de glicose ou de hipóxia, o que se torna um agravante pelo fato do aumento da densidade celular necessitar de altas concentrações de carbono para o crescimento celular.

O uso de fontes de carbono alternativas à glicose e o uso de células imobilizadas em reatores de leito fixo têm sido descritos na literatura para favorecer o aumento da densidade celular ( Iqbal and Edyvean 2005; Saeed and Iqbal 2013; Bayat, Hassanshahian et al. 2015; CARDOSO, Santos et al. 2015). Duas condições foram avaliadas neste trabalho para o aumento da biomassa celular: o uso da *Luffa cylindrica* como suporte para a imobilização celular e a suplementação do meio com glicerol e  $MgCl_2$ .

## OBJETIVOS

Otimizar o crescimento celular da *Escherichia coli* por meio do uso da *Luffa cylindrica* como suporte e da suplementação do meio com glicerol 30 mM e  $MgCl_2$  10 mM.

## METODOLOGIA

### Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a *Escherichia coli*.

### Meio Luria Berthani (LB)

O meio de cultivo LB foi utilizado na preparação do inóculo, assim como nas avaliações do crescimento microbiano sob diferentes condições. O meio apresenta a seguinte composição: peptona 10 mg.mL<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 mg.mL<sup>-1</sup> e cloreto de sódio 10 mg.L<sup>-1</sup>.

### Manutenção da Cultura

As técnicas de manutenção de culturas celulares têm como objetivo garantir a sobrevivência e estocagem da cultura bem como a manutenção de suas características morfológicas, fisiológicas e genéticas primordiais e de interesse ao processo. Os métodos de manutenção são classificados de acordo com o tempo máximo de preservação. Para preservação do microrganismo foram utilizados os seguintes métodos:

#### Manutenção de curto prazo

Para a manutenção de curto prazo da cultura de *Escherichia coli* foi utilizado o repique contínuo, através da inoculação da cultura em meio LB líquido com canamicina 50 µg.mL<sup>-1</sup> em erlenmeyers e mantido em incubadora tipo shaker SOLAB, a 150 rpm a 37°C, e o repique periódico realizado mensalmente, por meio do plaqueamento da cultura em meio Agar LB suplementado com canamicina 50 µg.mL<sup>-1</sup> e armazenagem a 4°C.

#### Manutenção de longo prazo

Para armazenamento de longo prazo, a cultura de *E.coli* foi criopreservada alíquotando 30% de glicerol e 70% de cultura e posterior armazenagem no nitrogênio.

### Preparo do Inóculo

Para o preparo do pré-inóculo uma colônia pura é solubilizada em meio LB líquido contendo canamicina 50 µg.mL<sup>-1</sup> em erlenmeyer e posteriormente mantido em incubadora tipo shaker SOLAB a 150 rpm a 37°C. O inóculo em todos os ensaios foi realizado alíquotando o volume de cultura necessário para a obtenção de uma densidade ótica inicial a 600nm (DO<sub>600</sub>) de 0,3 unidades de absorbância.

### Tratamento da *Luffa cylindrica*

A *Luffa cylindrica* madura foi cortada em formato circular e pesada, obtendo círculos de mesma massa. Em seguida foi submetida à fervura em água destilada por 45 minutos e colocada em erlenmeyers e encaminhados a autoclavagem por 15 minutos a 121 °C. Após essa etapa a *Luffa cylindrica* foi mantida submersa em água destilada e autoclavada por 24 horas. Posteriormente a água foi removida e o erlenmeyer com a *Luffa cylindrica* foi submetido à secagem em estufa a 70°C por 72 horas.

### Aumento da densidade celular

Para a elevação da densidade celular foi avaliada influência de parâmetros físicos e químicos do sistema. Os parâmetros avaliados foram: *Luffa cylindrica*, *Luffa cylindrica* tratada e suplementação com glicerol e  $MgCl_2$ .

### Avaliação da influência da *Luffa cylindrica* do seu tratamento no crescimento celular

Para avaliação da influência da *Luffa cylindrica* no crescimento celular foram realizados cultivos com e sem a presença da *Luffa cylindrica* e com a *Luffa cylindrica* tratada, em meio LB líquido com canamicina  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em erlenmeyers e mantido em incubadora tipo shaker SOLAB a 150 rpm a  $37^\circ\text{C}$ . O experimento foi realizado em triplicata.

### Avaliação da suplementação com glicerol e $\text{MgCl}_2$ no crescimento celular

Para avaliação da influência do glicerol e do  $\text{MgCl}_2$  no crescimento celular foram realizados cultivos nas condições: com *Luffa cylindrica* tratada, com *Luffa cylindrica* tratada em meio suplementado com glicerol 30mM e com *Luffa cylindrica* tratada em meio suplementado com glicerol 30mM e  $\text{MgCl}_2$  10mM. O cultivo foi realizado utilizando meio LB líquido em erlenmeyers e mantido em incubadora tipo shaker SOLAB a 150 rpm a  $37^\circ\text{C}$ . O experimento foi realizado em triplicata.

### Concentração Celular

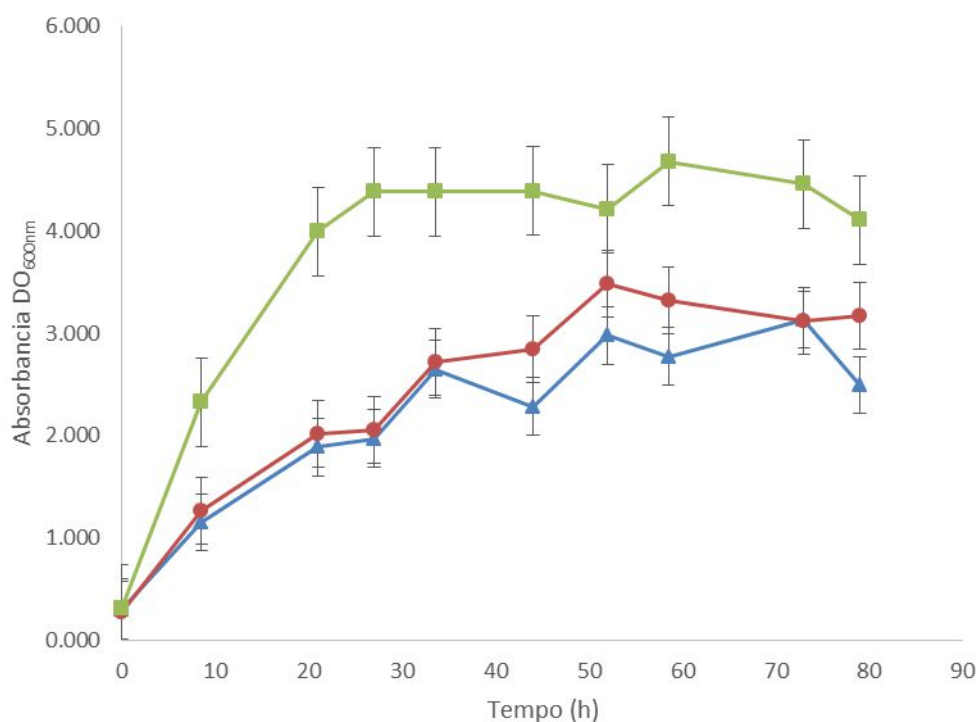
A concentração celular foi determinada pela densidade óptica a 600 nm ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) utilizando um espectrofotômetro UV - 1800 Shimadzu.

### Análise Estatística

Para a análise estatística foi realizada a Análise de Variância ANOVA no software Microsoft Office Excel e teste de Tukey no software Past.

### RESULTADOS

Para avaliar a influência da *Luffa Cylindrica* no crescimento celular foram realizados cultivos nas condições sem *Luffa cylindrica*, com *Luffa cylindrica* e com a *Luffa cylindrica* tratada termicamente. Os resultados são apresentados na figura 1.



**Figura 1 - Avaliação da influência da *Luffa cylindrica* e do seu tratamento físico no crescimento celular. O triângulo representa o cultivo sem a presença da *Luffa cylindrica*, o círculo o cultivo na presença da *Luffa cylindrica* sem tratamento e o quadrado o cultivo na presença da *Luffa cylindrica* tratada. Fonte: Próprio autor.**

Avaliando o gráfico da figura 1, nota-se que as bactérias cultivadas na presença da *Luffa cylindrica* tratada alcançaram uma  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  mais alta que as cultivadas sem presença da *Luffa cylindrica* e com a *Luffa cylindrica* não tratada. Em acréscimo o cultivo na presença da *Luffa cylindrica* tratada termicamente alcançou a máxima densidade celular em menor tempo de cultivo, alcançando a fase estacionária por volta de 30 horas de cultivo, este dado representa relevância econômica para o bioprocesso, dado que a redução do tempo para obtenção da densidade celular ótima para a produção

de uma determinada biomolécula reduz custos na produção. O cultivo na presença da *Luffa cylindrica* tratada alcançou a fase estacionária com uma  $DO_{600nm}$  de 4,38 unidades de absorvância (UA) enquanto as culturas sem *Luffa cylindrica* e com *Luffa cylindrica* não tratada alcançaram a fase estacionária com  $DO_{600nm}$  de 3,125 UA e 2,773 UA respectivamente.

Analisando o gráfico da figura 1, nota-se que as condições com *Luffa cylindrica* e *Luffa cylindrica* tratada apresentaram influência positiva no crescimento da *E.coli*. A *Luffa cylindrica* apresenta uma estrutura macroporosa e alta porosidade, o que proporciona impedimentos mecânicos para o movimento do meio de cultura proporcionando turbulências no sistema. Esses movimentos turbulentos são caracterizados por flutuações instantâneas de velocidade, temperatura e outros escalares que favorecem a agitação e influenciam significativamente no transporte de momentum, calor e massa (Souza, Oliveira et al. 2011). Desta forma a presença da *Luffa cylindrica* contribui para a homogeneidade do sistema assim como para a transferência de oxigênio pelo aumento do grau de mistura.

Contudo a maior influência no crescimento da *E.coli* ocorreu quando se utilizou a *Luffa cylindrica* tratada termicamente. O tratamento térmico adotado é uma metodologia amplamente utilizada para imobilização de diversos tipos celulares, no entanto neste trabalho não foi realizada a etapa de imobilização descrita na literatura, que consiste em manter a cultura em repouso na presença da *Luffa cylindrica* tratada com o intuito de favorecer interações de baixa força de ligação entre a *Luffa cylindrica* e as células microbianas, promovendo a adsorção celular (Ogbonna, Liu et al. 1994; Lee 1996; Iqbal and Edyvean 2005; Saeed and Iqbal 2013). Apesar de não ter sido realizado nenhum estudo que comprove a imobilização celular, sugere-se que houve a adsorção das células microbianas à *Luffa cylindrica*, fato este que explicaria o aumento do crescimento celular nesta condição, devido ao fato que das células imobilizadas apresentarem uma maior resistência a condições de estresse.

Foi realizada a Análise de Variância ANOVA no software Microsoft Office Excel avaliando as médias das absorvâncias nas condições sem *Luffa cylindrica*, com *Luffa cylindrica* não tratada e com *Luffa cylindrica* tratada dentro de um intervalo de confiança de 95%. Conforme ilustrado na tabela 1.

**Tabela 1 - Análise de Variância ANOVA para avaliação a influência da *Luffa cylindrica* e seu tratamento térmico. Fonte: Próprio autor.**

ANOVA							
Fonte da variação	SQ	Gl	MQ	F	valor-P	F crítico	
Entre grupos	12,72186894	2	6,360934	5,226758	0,012058	3,354131	
Dentro dos grupos	32,85884358	27	1,216994				
Total	45,58071252	29					

Nota-se pela análise de variância que o valor de  $F > F$  crítico indicando que há variação estatisticamente significativa entre as condições de cultivo avaliadas, o que é confirmado pelo valor- $p < 0,05$ .

Para a especificação de quais das condições testadas obtiveram significância estatística, foi realizado o teste de Tukey utilizando o software para análises estatísticas PAST.

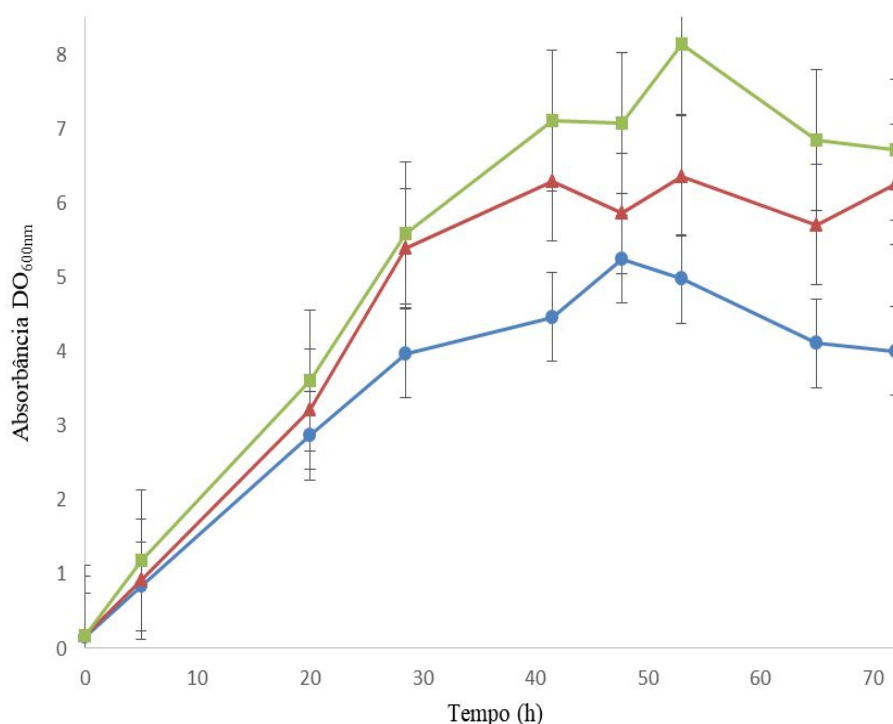
**Tabela 2 - Teste de Tukey para avaliação a influência da *Luffa cylindrica* e seu tratamento térmico. Fonte: Próprio autor.**

	Sem <i>Luffa</i>	Com <i>Luffa</i>	C/ <i>Luffa</i> Tratada
Sem <i>Luffa</i>		0,8543	0,0144
Com <i>Luffa</i>	0,7585		0,04862
Com <i>Luffa</i> Tratada	4,285	3,526	

O resultado do teste de Tukey confirma que houve um aumento estatisticamente significativo quando o cultivo foi realizado na presença da *Luffa cylindrica* tratada termicamente, esses resultados são notados pelos valores da segunda e terceira linha da coluna “C/ *Luffa* Tradada” que apresentaram valores de valor- $p < 0,05$  confirmando a variação significativa entre as médias relacionadas.

Diante deste resultado pode-se inferir que o tratamento térmico utilizado foi eficaz para promover a formação de grupos carregados na estrutura da *Luffa cylindrica* permitindo a interação com a célula microbiana, como evidenciado por outros autores (Ogbonna, Liu et al. 1994; Iqbal and Edyvean 2005; Behera, Mohanty et al. 2011; Saeed and Iqbal 2013).

Outra provável explicação para o aumento significativo da massa celular, inferido pela  $DO_{600nm}$ , é que o tratamento térmico pode ter removido substâncias tóxicas presentes na *Luffa cylindrica* como flavonoides, taninos, saponinas e esteroides relatadas por BROCK, DUARTE et al. (2003) e que apresentam atividade antimicrobiana como descrito por outros autores (BRASIL 2012; Flambó 2013). Após a etapa de fervura a água apresentou coloração amarela, reforçando a hipótese que o tratamento promove a remoção de constituintes da *Luffa cylindrica*. Desta forma além de promover a imobilização celular o tratamento térmico pode ter sido importante na remoção da toxicidade do suporte para as células. Após a evidência da influência positiva da bucha vegetal tratada termicamente no crescimento da *E.coli* avaliou-se os efeitos da suplementação do meio de cultura com glicerol 30 mM e  $MgCl_2$  10 mM, conforme mostrado na figura 2.



**Figura 2- Influência da suplementação do meio de cultura. O círculo representa o cultivo na presença da *Luffa cylindrica* tratada e sem suplementação do meio, o triângulo representa o cultivo na presença da *Luffa cylindrica* tratada e meio suplementado com glicerol 30 mM e o quadrado representa o cultivo na presença da *Luffa cylindrica* tratada e meio suplementado com glicerol 30 mM e  $MgCl_2$  10 mM. Fonte: Próprio autor.**

Analisando a figura 2, nota-se que nas três condições de cultivo a fase estacionária foi alcançada em aproximadamente 50 horas de cultivo e os valores máximos de  $DO_{600nm}$  foram 5,248 UA, 6,368 UA e 8,144 UA nas respectivas condições de cultivo: meio LB, meio LB suplementado com glicerol 30 mM e meio LB suplementado com glicerol 30 mM e  $MgCl_2$  10 mM. A suplementação do meio com glicerol se mostra como uma ótima alternativa para a obtenção de culturas em alta densidade, pois o glicerol apresenta baixa taxa de transporte para o citosol, permitindo a suplementação do meio sem sobrecarregar o ciclo do ácido tricarbossilíco (TCA) o que previne a produção de acetato pelas células, diminuindo condições de estresse das células e propiciando o maior crescimento celular. A influência positiva do  $MgCl_2$  na concentração de 10mM foi relatada por Nelson and Kennedy (1972), para favorecer o rápido crescimento de células de *E.coli*. Também a influência positiva da suplementação deste sal deve-se ao fato do íon  $Mg^{2+}$  ser um importante cofator para enzimas que atuam na biossíntese, desta forma o  $Mg^{2+}$  é um nutriente essencial na composição do meio, por esses motivos foi utilizado na suplementação do mesmo.

Foi realizada a Análise de Variância ANOVA no software Microsoft Office Excel com intuito de avaliar se houve a influência da suplementação do meio com glicerol 30 mM e glicerol 30 mM mais  $MgCl_2$  10 mM nos cultivos na presença de *Luffa cylindrica* tratada dentro do intervalo de 95% de confiança. O resultado da análise é apresentado na tabela 3.



**Tabela 3 - ANOVA da Suplementação do Meio de Cultura.**  
**Fonte: Próprio autor.**

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	17,35795467	2	8,678977	6,589537	0,007123	3,554557146
Dentro dos grupos	23,70752229	18	1,317085			
Total	41,06547695	20				

Analisando a tabela 5, nota-se que o valor de  $F > F$  crítico indicando que há variação estatisticamente significativa entre as condições de cultivo avaliadas, o que é confirmado pelo valor- $p < 0,05$ .

Para a especificação de quais das condições testadas obtiveram significância estatística, foi realizado o teste de Tukey utilizando o software para análises estatísticas PAST.

**Tabela 4 - Teste de Tukey para avaliação a influência da *Luffa cylindrica* e seu tratamento térmico.**  
**Fonte: Próprio autor.**

	<i>C/Luffa</i>	<i>C/Luffa</i> + Glicerol	<i>C/Luffa</i> + Glicerol+MgCl <sub>2</sub>
<i>C/Luffa</i>		0,95774	0,005626
<i>C/Luffa</i> + Glicerol	3,116		0,3635
<i>C/Luffa</i> + Glicerol+MgCl <sub>2</sub>	5,092	1,975	

O resultado do teste de Tukey demonstra que houve um aumento estatisticamente significativo da DO<sub>600nm</sub>, quando o cultivo foi realizado na presença da *Luffa cylindrica* tratada termicamente com suplementação do meio com glicerol 30 mM e MgCl<sub>2</sub> 10 mM em detrimento ao cultivo com *Luffa cylindrica* tratada e sem suplementação do meio. Esses resultados são notados pelos valores da primeira linha da coluna “*C/ Luffa*+ Glicerol+MgCl<sub>2</sub>” que apresentaram valores de valor- $p < 0,05$  confirmando a variação significativa entre as médias relacionadas.

Em síntese a figura 3 demonstra o comportamento do crescimento celular nas condições de cultivo experimentadas neste trabalho em comparação ao cultivo em meio LB sem suplementação e sem *Luffa cylindrica*.

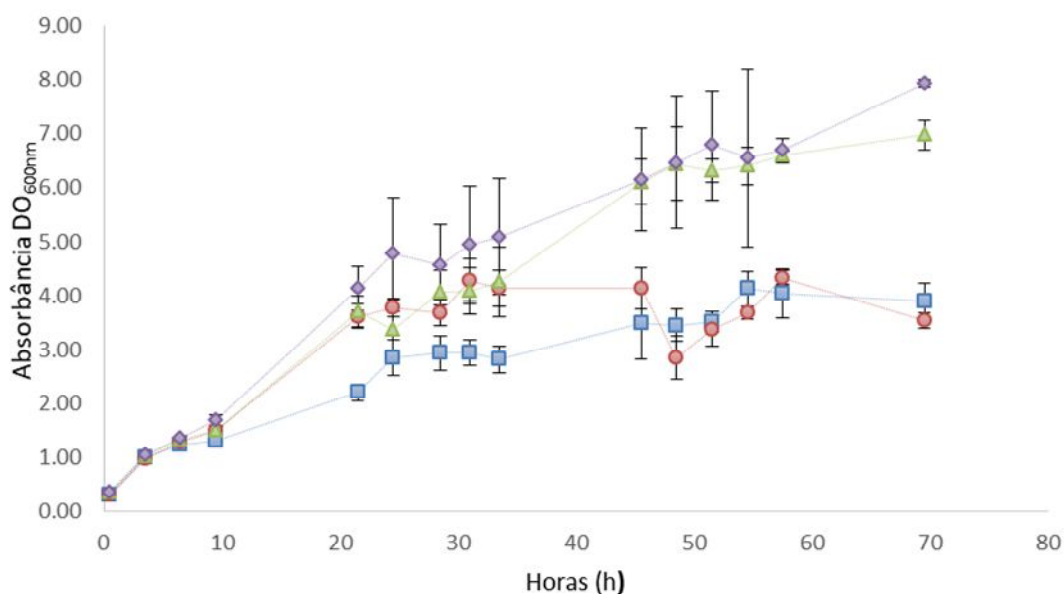


Figura 3 - Influência dos Parâmetros Avaliados no Crescimento Celular. O quadrado representa o cultivo sem presença da *Luffa cylindrica* e sem suplementação do meio, o círculo representa o cultivo na presença da *Luffa cylindrica* tratada e sem suplementação do meio, o triângulo representa o cultivo na presença da *Luffa cylindrica* tratada e meio suplementado com glicerol 30 mM e o losango representa o cultivo na presença da *Luffa cylindrica* tratada e meio suplementado com glicerol 30 mM e  $MgCl_2$  10 mM. Fonte: Próprio autor.

Os resultados são promissores e demonstram aumento significativo da densidade celular, promovendo o dobro da  $DO_{600nm}$  obtida no cultivo utilizando apenas meio LB, como pode ser visto nos últimos pontos do gráfico apresentado na figura 3. Neste gráfico também fica evidente que foi possível prolongar a fase exponencial de crescimento celular após as 69 horas de cultivo. Esses resultados sugerem condições ideais para um cultivo em batelada alimentada ou contínuo em reator de leito fixo, utilizando a *Luffa cylindrica* tratada como suporte. A figura 4 ilustra a diferença de turbidez dos cultivos sem *Luffa cylindrica* e sem suplementação e dos cultivos na condição otimizada proposta neste trabalho.



**Figura 4 - Cultivos para avaliação da influência *Luffa cylindrica* tratada e da suplementação do meio. Erlenmeyers a esquerda - Cultivo sem *Luffa cylindrica* e sem suplementação, seguidos dos cultivos com *Luffa cylindrica* sem tratamento e sem suplementação, com *Luffa cylindrica* tratada e meio suplementado com glicerol 30 mM e com *Luffa cylindrica* tratada e meio suplementado com glicerol 30 mM e MgCl<sub>2</sub> 10 mM.**

**Fonte: Próprio autor.**

Diante dos resultados obtidos neste trabalho nota-se que a *Luffa cylindrica* apresenta características promissoras para utilização industrial em bioprocessos, pelo fato de ser um produto natural, de baixo custo, renovável, altamente resistente e que apresenta influência positiva no crescimento celular favorecendo a obtenção de culturas com maiores densidades celulares.

Desta forma a utilização da *Luffa cylindrica* como suporte celular para reatores de leito fixo apresenta vantagens operacionais relacionados à sua influência na fluidodinâmica do meio promovendo maior grau de mistura, apresenta também alta resistência mecânica prevenido a formação de caminhos preferenciais e compressão do leito, além de vantagens relacionadas a fisiologia celular, proporcionando economia nos processos de produção de biomoléculas.

O uso do glicerol como fonte de carbono também apresenta vantagens além das apresentadas pelos resultados deste trabalho, pois o glicerol é um resíduo da indústria de biodiesel, apresentado desta forma uma alternativa de baixo custo e sustentável para a fonte de carbono em bioprocessos.

## CONCLUSÃO

Conclui-se por esse trabalho que o aumento da biomassa celular com as condições operacionais propostas apresentou características relevantes para o uso biotecnológico como suporte celular. Apesar de não ter sido adotado a etapa de imobilização infere-se que houve adsorção celular no suporte, promovendo maior resistência da bactéria as condições de estresse do meio, permitindo o prolongamento da fase exponencial de crescimento e, por conseguinte promovendo a elevação estatisticamente significativa da DO<sub>600nm</sub>, significando a promoção do aumento da biomassa bacteriana.

A suplementação do meio com glicerol 30mM e MgCl<sub>2</sub> 10mM também promoveu a elevação estatisticamente significativa da DO<sub>600nm</sub> se mostrando possivelmente influência na prevenção da produção de acetato, que reprime o crescimento da *E.coli*.

A condição otimizada obtida neste trabalho, *Luffa cylindrica* tratada termicamente e suplementação do meio com glicerol 30mM e MgCl<sub>2</sub> 10Mm, permitiu dobrar a DO<sub>600nm</sub>, um resultado promissor uma vez que não foram utilizados microrganismos modificados geneticamente para suportar condições de estresse e os meios utilizados para promoção do aumento da densidade celular são produtos naturais e de baixo custo, *Luffa cylindrica*, e resíduos industriais como o glicerol. As condições otimizadas apresentam características desejáveis para o cultivo num reator de leito fixo, o que poderá ser avaliado em trabalhos futuros.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bayat, Z., M. Hassanshahian, et al. (2015). **Immobilization of Microbes for Bioremediation of Crude Oil Polluted Environments: A Mini Review.** The Open Microbiology Journal 9: 48.
2. Behera, S., R. C. Mohanty, et al. (2011). **Ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in *Luffa cylindrica* L. sponge discs.** Applied energy 88(1): 212-215.
3. BRASIL, F. I. (2012). **Agentes antimicrobianos químicos e naturais.** 2012.
4. BROCK, A. C., M. d. R. DUARTE, et al. (2003). **Estudo morfo-anatômico e abordagem fitoquímica de frutos e sementes de *Luffa operculata* (L.) Cogn., Cucurbitaceae.** Visão Acadêmica 4(1).
5. CARDOSO, R. G. S., R. H. S. Santos, et al. (2015). **Crescimento, produção e acúmulo de nutrientes em *Luffa cylindrica* M. Roem1.** Ceres 56(5).
6. Demain, A. L. (2000). **Small bugs, big business: the economic power of the microbe.** Biotechnology advances 18(6): 499-514.
7. Flambó, D. F. A. L. P. (2013). **Atividades biológicas dos Flavonoides,** [sn].
8. Iqbal, M. and R. Edyvean (2005). **Loofa sponge immobilized fungal biosorbent: A robust system for cadmium and other dissolved metal removal from aqueous solution.** Chemosphere 61(4): 510-518.
9. Lee, S. Y. (1996). **"High cell-density culture of *Escherichia coli*."** Trends in biotechnology 14(3): 98-105.
10. Nelson, D. L. and E. P. Kennedy (1972). **Transport of magnesium by a repressible and a nonrepressible system in *Escherichia coli*.** Proceedings of the National Academy of Sciences 69(5): 1091-1093.
11. Ogbonna, J. C., Y.-C. Liu, et al. (1994). **Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for microbial cell immobilization.** Journal of Fermentation and Bioengineering 78(6): 437-442.
12. Riesenber, D., V. Schulz, et al. (1991). **High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate.** Journal of biotechnology 20(1): 17-27.
13. Saeed, A. and M. Iqbal (2013). **Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge: Review of development of the biomatrix as a tool for biotechnological applications.** Biotechnology progress 29(3): 573-600.
14. Shojaosadati, S. A., S. M. Varedi Kolaei, et al. (2008). **Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein.** Iranian Journal of Biotechnology 6(2): 63-84.
15. Souza, J. F. A. d., L. R. d. Oliveira, et al. (2011). **Uma revisão sobre a turbulência e sua modelagem.** Revista Brasileira de Geofísica 29(1): 21-41.