

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium*
para a produção do biopolímero
poli(3-hidroxi-butirato) e modelagem
matemática do bioprocesso**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Débora Jung Luvizetto

Porto Alegre

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium*
para a produção do biopolímero
poli(3-hidroxi-butirato) e modelagem
matemática do bioprocesso**

Débora Jung Luvizetto

Dissertação de Mestrado apresentada como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Engenharia

Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvi-
mento de Processos

Orientador:

Prof. Dr. Argimiro Resende Secchi

Co-orientadora:

Profa. Dra. Rosane Rech

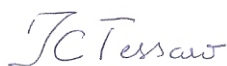
Porto Alegre

2007

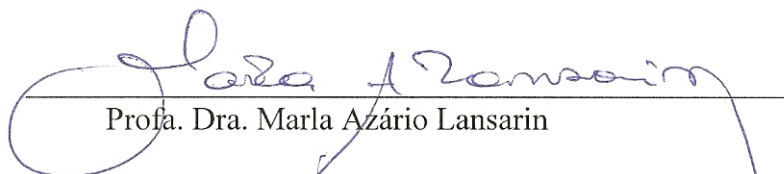
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Cultivo da bactéria Bacillus megaterium para a produção do biopolímero poli(3-hidroxibutirato) e modelagem matemática do bioprocessos*, elaborada por Débora Jung Luvizetto, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

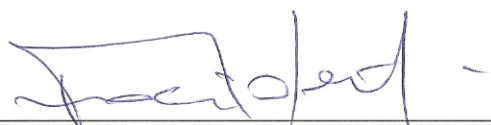
Comissão Examinadora:



Profa. Dra. Isabel Cristina Tessaro



Profa. Dra. Marla Azário Lansarin



Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Departamento de Engenharia Química, por todo o suporte e estrutura disponíveis para a realização deste trabalho. Ao CNPq pela disponibilização da bolsa e suporte financeiro.

Aos meus orientadores, Argimiro e Rosane, pelo ensino, incentivo e paciência, especialmente nas horas difíceis. Aos professores Nilo e Ayub, que sempre estavam disponíveis, mesmo não sendo oficialmente orientadores, colaboraram com o trabalho. Ao Rossano pela disponibilidade. Ao professor Plinho, pela ajuda e disponibilização do laboratório.

À Sirley, por toda ajuda e disponibilidade. Aos bolsistas de Iniciação Científica, Wagner e Ivana, pela dedicação e ajuda na realização do trabalho. À Irma pela disponibilidade.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia, especialmente à Flávia e à Ângela, por toda a ajuda e cooperação. Aos amigos do Gimscop pelo apoio, especialmente à Bruna, Dea, Gaby, Lari, Lú e Nina. Às amigas da graduação que entenderam as ausências e sempre me apoiaram, especialmente, à Paulinha.

À minha Família, que sempre me incentivou, ajudou e soube compreender minha ausência.

Ao meu marido, Flávio, por toda a compreensão, apoio, ajuda, disponibilidade e, acima de tudo, pelo amor.

Resumo

Biopolímeros polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres sintetizados por inúmeras bactérias e armazenados em corpos de inclusão nas células como reserva de energia, são produzidos a partir de fontes renováveis, e sua principal característica é a biodegradabilidade. Neste trabalho realizou-se a produção do PHA poli(3-hidroxibutirato) (P3HB) em cultivos submersos da bactéria *Bacillus megaterium* em meio mineral, utilizando-se sacarose como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Esta bactéria apresenta comportamento diferente das bactérias comumente utilizadas para produção de biopolímero, sendo capaz de produzir grandes quantidades de P(3HB) sem limitação de nitrogênio.

Experimentos em estufa incubadora rotatória foram realizados, segundo planejamento fatorial 2^2 composto central rotacional e três repetições no ponto central, a fim de se avaliar a melhor concentração inicial de sacarose e a razão inicial carbono/nitrogênio. Nestes experimentos, obteve-se um acúmulo de P(3HB) nas células de cerca de 75%. Não houve limitação de nitrogênio e sacarose para a maioria dos casos e observou-se uma forte correlação entre o acúmulo de P(3HB) e o pH do meio.

Em biorreator foram realizados experimentos com controle de oxigênio dissolvido e pH, e com a condição de substrato inicial escolhida em função do planejamento de experimentos realizado. Obteve-se acúmulo de P(3HB) de 30%, inferior ao obtido em estufa incubadora rotatória.

Modelos fenomenológicos de cinética microbiana, produção de polímero e consumo de substratos foram estudados, propondo-se modificações. Os parâmetros dos modelos foram estimados com os dados obtidos experimentalmente no biorreator. O modelo proposto obteve um desempenho superior aos demais estudados e com um número menor de parâmetros. Simulações foram realizadas a fim de verificar o comportamento do modelo frente a variações nas condições iniciais.

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) biopolymers are polyesters synthesized by numerous bacteria and are accumulated on inclusion bodies in the cytoplasm of the cells as energy storage, they are produced from renewable carbon sources and its main characteristic is the biodegradability. In this work it was carried out the production of PHA poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) in submerged cultures of bacteria *Bacillus megaterium* in the mineral medium, using sucrose as carbon source and ammonium sulphate as nitrogen source. This bacteria shows different behavior from bacteria commonly used on biopolymer production, and it is able to produce large amounts of P(3HB) without nitrogen limitation.

Shaker experiments were realized, according to a central composite design and three repetitions in the central point, in order to evaluate the best initial sucrose concentration and carbon-to-nitrogen ratio. In these experiments, P(3HB) was accumulated in the cell about 75%. In most of the cases, there was no limitation in the sucrose or nitrogen, and a strong correlation between P(3HB) accumulated and the medium pH was observed.

Bioreactor experiments were carried out with controlled dissolved oxygen and pH. Substrate initial concentration was chosen according to the experiment design. P(3HB) accumulation in bioreactor was lower than in shaker, about 30%.

Phenomenological models of microbial kinetics, polymer production, and substrate consumption were studied and improvements were proposed. The model parameters were estimated using the experiment data from the bioreactor. The proposed model showed a better performance than the available models, with a smaller number of parameters. Simulations were performed with the purpose of verifying the model behavior for initial conditions changes.

Sumário

Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica	3
2.1 Biopolímeros	4
2.2 Polihidroxialcanoatos	5
2.2.1 Propriedades e aplicações de PHAs.....	6
2.2.2 As moléculas de PHAs	8
2.2.3 Microrganismos produtores.....	10
2.2.4 Biosíntese de PHAs	12
2.2.5 Grânulo de PHA	22
2.2.6 Produção de PHAs por Bacillus	25
2.2.7 Extração de biopolímero de PHAs	29
2.3 Modelos de Crescimento Microbiano.....	30
Capítulo 3 - Materiais e Métodos.....	35
3.1 Microrganismo.....	35
3.2 Meio de Cultura	36
3.3 Experimentos em Estufa Incubadora Rotatória.....	37
3.3.1 Planejamento de experimentos	38
3.4 Experimentos em Biorreator	39
3.4.1 Determinação de variáveis do biorreator.....	40
3.5 Métodos Analíticos	41
3.5.1 Determinação de biomassa	41
3.5.2 Determinação de poli(3-hidroxi-butirato).....	42
3.5.3 Determinação de sacarose	43
3.5.4 Determinação de nitrogênio.....	46
3.6 Modelo Proposto de Crescimento Microbiano	47
Capítulo 4 - Resultados e Discussões.....	49
4.1 Identificação dos Microrganismos	49
4.2 Experimentos em Estufa Incubadora Rotatória	50
4.2.1 Análise estatística dos resultados	59
4.3 Experimentos em Biorreator	64
4.3.1 Resultados de $k_L a$	64
4.3.2 Resultados de cultivos em biorreator	66
4.3.3 Estimativa de parâmetros e simulações	74
4.3.4 Simulações das condições do planejamento de experimentos.....	79

Capítulo 5 - Conclusão	85
5.1 Considerações Finais	85
5.2 Sugestões para Trabalhos Futuros	86
Apêndice A - Estruturas de Polihidroxialcanoatos.....	87
Apêndice B - Dados Experimentais Tabelados	91
Experimentos em Estufa Incubadora Rotatória	91
Experimentos em Biorreator	95
Referências Bibliográficas.....	101

Lista de Figuras

Figura 2.1:	Degradação de frascos de P(3HB-co-3HV) em lodo ativado referente a um período de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 semanas (MADISON e HUISMAM, 1999).	6
Figura 2.2:	Estrutura geral de PHAs e seus principais representantes (LEE, 1996b).	8
Figura 2.3:	Monômeros de PHAs com diferentes cadeias laterais (REHM, 2003).	9
Figura 2.4:	Fases da biosíntese de PHAs (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).	12
Figura 2.5:	Diferentes rotas metabólicas para consumo de substrato (REHM e STEINBÜCHEL, 1999).	13
Figura 2.6:	Rotas metabólicas que fornecem monômeros para a biosíntese de PHAs na bactéria <i>R. eutropha</i> (SUDESH et al., 2000).	14
Figura 2.7:	Esquema de reação de obtenção do P(3HB) (STUBBE et al., 2005).	14
Figura 2.8:	Árvore filogenética das 59 PHAs sintases (REHM, 2003).	15
Figura 2.9:	Representação da organização dos genes que codificam as enzimas das quatro classes de PHA sintase (REHM, 2003).	17
Figura 2.10:	Modelo esquemático para as PHA sintases, tríade catalítica de resíduos (cisteína-aspartato-histidina) esta circulado (VALAPPIL et al., 2007).	19
Figura 2.11:	Mecanismos proposto para a reação de polimerização das Classes I e III de PHA sintases envolvendo dois (a) ou um (b) intermediário (STUBBE et al., 2005).	20
Figura 2.12:	Mecanismos proposto para reação de polimerização da Classe II de PHA sintase (REHM, 2003).	21
Figura 2.13:	Esquema do grânulo de PHA (ZINN et al., 2001).	23
Figura 2.14:	Microscopia de transmissão de elétrons (x 30.000) de células de <i>B. megaterium</i> em diferentes tempos de cultivo (Gouda et al., 2001).	24
Figura 2.15:	Cultivo batelada em biorreator de 30L da <i>B. megaterium</i> utilizando xarope de tâmaras e cloreto de amônia (OMAR et al., 2001).	26
Figura 3.1:	Fotografia da <i>Bacillus megaterium</i> contendo biopolímero e ou esporos (4000x).	36
Figura 3.2:	Desenho esquemático do procedimento de inóculo.	38
Figura 3.3:	Biorreator experimental utilizado.	39
Figura 3.4:	Curva de calibração para determinação da quantidade de P(3HB).	42
Figura 3.5:	Curva de calibração para determinação de sacarose.	43
Figura 3.6:	Cromatograma da sacarose obtido no HPLC.	44
Figura 3.7:	Curva padrão de glicose.	45
Figura 3.8:	Curva padrão de frutose.	45
Figura 3.9:	Curva padrão de sulfato de amônio.	46
Figura 4.1:	Árvore filogenética demonstrando a relação entre os microrganismos.	50
Figura 4.2:	Concentração de biomassa total <i>versus</i> tempo de cultivo.	51
Figura 4.3:	Concentração de P(3HB) <i>versus</i> tempo de cultivo.	52
Figura 4.4:	Concentração de biomassa residual <i>versus</i> tempo de cultivo.	53
Figura 4.5:	Porcentagem de P(3HB) acumulado nas células <i>versus</i> tempo de cultivo.	54
Figura 4.6:	Concentração de sacarose <i>versus</i> tempo de cultivo.	55

Figura 4.7:	Concentração de nitrogênio <i>versus</i> tempo de cultivo.	56
Figura 4.8:	Variação do pH durante o cultivo.	57
Figura 4.9:	pH <i>versus</i> percentual de P(3HB) acumulado.	58
Figura 4.10:	Superfície de resposta da concentração de biomassa no tempo de 20 horas. ...	60
Figura 4.11:	Superfície de resposta da porcentagem de acúmulo de P(3HB) nas células no tempo de 20 horas.	62
Figura 4.12:	Superfície de resposta da concentração de açúcar para o cultivo de 20 horas.	63
Figura 4.13:	Valores da Função Objetivo.	64
Figura 4.14:	Curvas de nível para valores de k_{La} em função da rotação e aeração.	65
Figura 4.15:	Valores de k_{La} em função da rotação para uma aeração de 4 L min^{-1}	66
Figura 4.16:	Concentrações de Biomassa total, Biomassa residual e P(3HB) obtidas durante o cultivo em biorreator.	67
Figura 4.17:	Cromatograma obtido para análise de P(3HB) por cromatografia gasosa.	68
Figura 4.18:	Porcentagem de P(3HB) acumulado nas células durante o cultivo em biorreator.	69
Figura 4.19:	Consumo de açúcar durante o cultivo em biorreator.	70
Figura 4.20:	Consumo de nitrogênio durante o cultivo em biorreator.	71
Figura 4.21:	Variação de pH durante o cultivo em biorreator.	72
Figura 4.22:	Consumo de NaOH para controle de pH ao longo do cultivo.	72
Figura 4.23:	Percentual de oxigênio dissolvido e agitação durante o cultivo em biorreator.	73
Figura 4.24:	Simulação e pontos experimentais para formação de biomassa residual.	75
Figura 4.25:	Simulação e pontos experimentais para formação de biomassa residual.	76
Figura 4.26:	Simulação e pontos experimentais para formação de P(3HB).	76
Figura 4.27:	Simulação e pontos experimentais para acúmulo percentual de polímero.	77
Figura 4.28:	Simulação e pontos experimentais para consumo de açúcares totais.	77
Figura 4.29:	Simulação e pontos experimentais para o consumo de nitrogênio.	78
Figura 4.30:	Simulações da biomassa total.	79
Figura 4.31:	Simulações da biomassa residual.	80
Figura 4.32:	Simulações da produção e consumo de P(3HB).	81
Figura 4.33:	Simulações do percentual de acúmulo de P(3HB).	82
Figura 4.34:	Simulações do consumo de açúcares totais.	83
Figura 4.35:	Simulações do consumo de nitrogênio.	84
Figura A.1:	Diversidade de monômeros de PHAs (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).	88
Figura A.2:	(continuação) Diversidade de monômeros de PHAs (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).	89

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Temperaturas de fusão (T_m) e transição vítrea (T_g) (SUDESH et al., 2003).....	7
Tabela 2.2: Propriedades de PHAs e polímeros petroquímicos (LEE, 1996a).....	7
Tabela 2.3: Produção de PHAs por diferentes bactérias (REDDY et al., 2003).....	11
Tabela 2.4: Divisão das PHA sintases (VALAPPIL et al., 2007).....	16
Tabela 2.5: Cultivo de <i>Bacillus</i> CL1 em substratos diferentes (FULL et al., 2006).....	27
Tabela 2.6: Produção de PHAs por diferentes bactérias (VALAPPIL et al., 2007).....	28
Tabela 3.1: Meio mineral utilizado nos cultivos.....	36
Tabela 3.2: Solução de micronutrientes.....	37
Tabela 3.3: Planejamento de experimentos de cultivos realizado.....	38
Tabela 3.4: Planejamento de experimentos para determinação do k_La	40
Tabela 4.1: Correlações entre valores de pH e percentual de polímero obtido, pH e concentração de P(3HB) e pH e Biomassa residual.....	58
Tabela 4.2: Parâmetros e testes estatísticos do modelo para biomassa total.....	60
Tabela 4.3: Parâmetros e testes estatísticos para o modelo de porcentagem de P(3HB) acumulado.....	61
Tabela 4.4: Parâmetros e testes estatísticos do modelo para sacarose residual.....	63
Tabela 4.5: Parâmetros estimados para o modelo e valor da função objetiva de cada modelo.....	74
Tabela B.1: Concentração de Biomassa total ao longo do cultivo em estufa incubadora rotatória.....	91
Tabela B.2: Concentração de Biopolímero ao longo do cultivo em estufa incubadora rotatória.....	92
Tabela B.3: Concentração de Biomassa residual ao longo do cultivo em estufa incubadora rotatória.....	92
Tabela B.4: Percentual de Biopolímero acumulado nas células ao longo do cultivo em estufa incubadora rotatória.....	93
Tabela B.5: Concentração de Açúcares totais ao longo do cultivo em estufa incubadora rotatória.....	93
Tabela B.6: Concentração de Nitrogênio ao longo do cultivo em estufa incubadora rotatória.....	94
Tabela B.7: Variação de pH ao longo do cultivo em estufa incubadora rotatória.....	94
Tabela B.8: Dados experimentais do cultivo em Biorreator.....	95
Tabela B.9: Dados experimentais do cultivo em biorreator adquiridos pelo MATLAB.....	96
Tabela B.10: Dados experimentais do cultivo em Biorreator (Duplicata).....	97
Tabela B.11: Dados do cultivo em biorreator adquiridos pelo MATLAB (Duplicata).....	98
Tabela B.12: Dados experimentais de obtenção do k_La	99

Nomenclatura

Lista de símbolos

AE	Aeração do biorreator	rpm
AG	Agitação do biorreator	$L\text{min}^{-1}$
$C:N$	Razão inicial de carbono/nitrogênio	
eN	Expoente do modelo de KHANNA e SRIVASTAVA	
eS	Expoente do modelo KHANNA e SRIVASTAVA	
$FObj$	Função objetivo	
k_0	Parâmetro do termo associado ao crescimento	
k_1	Parâmetro do termo associado ao crescimento na produção de polímero	
k_2	Parâmetro do termo não associado ao crescimento na produção de polímero	h^{-1}
k'_2	Parâmetro do termo não associado ao crescimento na produção de polímero	h^{-1}
k_3	Parâmetro do termo de consumo de nitrogênio para produção de biomassa	
k_4	Parâmetro do termo não associado ao crescimento na produção de polímero	h^{-1}
k_5	Parâmetro do termo não associado ao crescimento referente a inibição pelo produto	h^{-1}
k_6	Parâmetro do termo de consumo de açúcar para a manutenção da biomassa	h^{-1}
k_7	Parâmetro do termo de consumo de açúcar para ao crescimento da biomassa	
k_8	Parâmetro do termo de consumo de açúcar para a formação do polímero	
k_c	Parâmetro do termo de consumo de polímero pela biomassa	h^{-1}
k_d	Parâmetro do termo de morte celular	h^{-1}
k_{La}	Coefficiente de transferência de massa	h^{-1}
K_{PS}	Constante do termo associado ao crescimento	$g\text{L}^{-1}$
K_S	Constante de saturação do substrato limitante	$g\text{L}^{-1}$
K_{S1}	Constante de saturação do substrato limitante no termo de Monod	$g\text{L}^{-1}$
K_{S2}	Constante de saturação do substrato limitante no termo sigmoidal	$g\text{L}^{-1}$
K_{SN}	Constante de saturação do nitrogênio	$g\text{L}^{-1}$
K_{SS}	Constante de saturação da fonte de carbono	$g\text{L}^{-1}$
m	Expoente do termo sigmoidal do modelo de Mulchadani	
m_N	Parâmetro do termo referente a utilização de nitrogênio para a manutenção celular	
ms	Parâmetro do termo referente a utilização de açúcar para a manutenção celular	h^{-1}
n	Expoente do termo de inibição do modelo de Mulchadani	
N	Concentração de nitrogênio	$g\text{L}^{-1}$
N_m	Concentração máxima de fonte de nitrogênio	$g\text{L}^{-1}$

n_N	Expoente do termo de inibição por nitrogênio no modelo de KHANNA e SRIVASTAVA	
n_S	Expoente do termo de inibição por nitrogênio no modelo de KHANNA e SRIVASTAVA	
NS_m	Valor máximo para a razão nitrogênio/fonte de carbono	
O_x	Oxigênio dissolvido	gL^{-1}
$O_x(t)$	Concentração de oxigênio dissolvido no instante t qualquer	gL^{-1}
O_{x_0}	Concentração de oxigênio dissolvido no instante inicial	gL^{-1}
$O_{x_{sat}}$	Concentração de saturação do oxigênio na fase líquida	gL^{-1}
P	Concentração de P(3HB)	gL^{-1}
PHB	Concentração de P(3HB)	gL^{-1}
S	Concentração da fonte de carbono	gL^{-1}
S_m	Concentração máxima de fonte de carbono	gL^{-1}
S_r	Concentração de sacarose residual no meio	gL^{-1}
t	Tempo	h
w	Peso da função objetivo	
X_1	Variável codificada referente a concentração inicial de sacarose	
X_2	Variável codificada referente a razão inicial de fonte de carbono/fonte de nitrogênio	
X_3	Variável codificada referente a agitação	
X_4	Variável codificada referente a aeração	
X_R	Biomassa residual	gL^{-1}
X_{Rmin}	Valor mínimo de X_R logo após o início da produção de P(3HB)	gL^{-1}
X_T	Biomassa total	gL^{-1}
Y_{PS}	Rendimento de polímero em relação à fonte de carbono	
Y_{RN}	Rendimento da biomassa residual em relação a fonte de nitrogênio	
Y_{RS}	Rendimento da biomassa residual em relação à fonte de carbono	

Lista de Símbolos Gregos

μ	Taxa de crescimento específico	h^{-1}
μ_1	Taxa de crescimento do termo de Monod no modelo de RAJE e SRIVASTAVA	h^{-1}
μ_2	Taxa de crescimento do termo sigmoidal no modelo de RAJE e SRIVASTAVA	h^{-1}
μ_m	Taxa de crescimento máxima específica	h^{-1}
α	Parâmetro do modelo de consumo de açúcar	
γ	Parâmetro do modelo de consumo de açúcar	h^{-1}

Lista de Abreviações

cPHB	Poli(3-hidroxitirato) de baixa massa molar
lclPHA	Polihidroxicanoato com comprimento longo de cadeia
mcIPHA	Polihidroxicanoato com comprimento médio de cadeia
PHAs	Polihidroxicanoatos
PHB	Polihidroxitirato
P(3HB)	Poli(3-hidroxitirato)
P(3HV)	Poli(3-hidroxiacetoato)
PhaA	β -Cetotilase - enzima que atua na produção dos PHAs
PhaB	Aceto-acetil coenzima A redutase - enzima que atua na produção dos PHAs
PhaC	PHA sintase
PhaQ	Proteína responsável pela repressão de outras proteínas na produção de PHB
PhaR	PHA sintase
PhaP	Proteína encontrada nos grânulos da <i>Bacillus megaterium</i>
<i>phaA</i>	Gene que codifica a enzima PhaA
<i>phaB</i>	Gene que codifica a enzima PhaB
<i>phaC</i>	Gene que codifica a enzima PhaC
<i>phaP</i>	Gene que codifica a proteína PhaP
<i>phaQ</i>	Gene que codifica a proteína PhaQ
<i>phaR</i>	Gene que codifica a proteína PhaR
sclPHA	Polihidroxicanoato com comprimento curto de cadeia
5POHV	Poli(3-hidroxi-5-fenilacetoato)

Capítulo 1

Introdução

Os polímeros representam uma parcela muito importante do mercado de produtos. Isto se deve, principalmente, à elevada relação resistência/peso e à flexibilidade de processamento apresentada por estes materiais. No entanto, como a maioria dos polímeros comerciais caracteriza-se por apresentar taxas de decomposição quase desprezíveis nas condições ambientes, a disposição final de resíduos plásticos vem se tornando um problema crítico para a sociedade, causando danos ao meio ambiente. Neste contexto, a utilização de biopolímeros torna-se uma alternativa cada vez mais interessante, tendo em vista que uma de suas principais características é a biodegradabilidade e que a reação de degradação gera, como produtos, somente água (H₂O) e gás carbônico (CO₂). Além de suas matérias primas serem de fontes renováveis, baseadas na agricultura ou mesmo em efluentes industriais.

Os biopolímeros podem ser obtidos a partir de uma variedade de substratos como, por exemplo, açúcares, amido, celulose, metano, óleo mineral e subprodutos da agroindústria como melaço, soro de queijo, entre outros, não ficando sujeitos às oscilações de preço do petróleo, nem tão pouco à escassez deste.

Ultimamente, tem-se estudado bastante a respeito dos biopolímeros polihidroxicanoatos (PHAs), que são poliésteres isotáticos, constituídos por uma grande variedade de monômeros. O mais estudado e melhor caracterizado membro da família dos polihidroxicanoatos é o poli(3-hidroxiбутirato) (P3HB), também chamado de poli(β-hidroxiбутirato), que possui propriedades próximas às do polipropileno. Entretanto, sabe-se que o processamento deste biopolímero apresenta algumas dificuldades, principalmente devido à temperatura de fusão ser próxima à de degradação térmica. Este problema pode ser contornado pela obtenção de copolímeros como o poli(3-hidroxiбутirato-co-3-hidroxiуalerato) (P(3HB-co-3HV)), que melhora a processabilidade.

As propriedades dos PHAs dependem de vários fatores, tais como a linhagem do microrganismo, tipo de substrato utilizado, condições de operação do processo produtivo, composição (no caso de copolímeros) e de modificações posteriores à reação de síntese, como inserção de grupos funcionais ou misturas com polímeros petroquímicos.

Visando a predição de propriedades finais como, por exemplo, a massa molar de resinas biodegradáveis em função das condições de operação para obtenção de biopolímeros, o objetivo geral deste trabalho é dominar as técnicas para o cultivo de microrganismos para a produção de P(3HB) em biorreatores. Além disso, é abordado o desenvolvimento de modelos matemáticos fenomenológicos do bioprocesso, necessários para o posterior desenvolvimento de modelos para predição de propriedades finais do biopolímero em função de sua estrutura macromolecular. Por fim, é necessário ter reprodutibilidade dos experimentos em diversas condições de operação para a estimação dos parâmetros do modelo e validação do mesmo.

Dessa forma, espera-se responder quais são as condições mais favoráveis para a produção de biopolímeros com características predeterminadas de processamento através de modelos matemáticos fenomenológicos do bioprocesso e correlações da estrutura molecular do biopolímero com o comportamento reológico deste material. A determinação deste tipo de relação é fundamental para possibilitar que a modelagem dos biorreatores de polimerização possa ser diretamente aplicada ao desenvolvimento de processos e novos produtos, no controle do processo e na garantia da qualidade do produto. Dentro deste contexto, esta dissertação trata do estudo da produção do P(3HB), utilizando a bactéria *Bacillus megaterium*, a fim de fornecer subsídios para as próximas etapas, até chegar à predição das propriedades finais do polímero obtido.

Apesar do descobrimento dos PHAs ter iniciado em cultivos com *B. megaterium*, aos poucos, esta foi deixada de lado em detrimento de outras bactérias capazes de produzir biopolímeros, talvez pelo fato dela esporular e consumir o polímero, enquanto que outras só consomem o polímero na falta da fonte de carbono. Porém, esta bactéria é encontrada em abundância em solos e possui uma grande vantagem por crescer e acumular em diferentes fontes de carbono e também é capaz de produzir biopolímero utilizando resíduos agroindustriais. Trabalhos relativamente recentes de isolamento de bactérias de solo para produção de P(3HB) têm estudado melhor seu comportamento.

Esta dissertação está dividida em cinco capítulos e dois apêndices. Neste Capítulo 1, buscou-se introduzir o assunto. O Capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica iniciando com um breve histórico, microrganismos produtores, aplicações, propriedades, obtenção e produção dos biopolímeros. A metodologia, os materiais utilizados para a produção de P(3HB) e as análises realizadas estão descritas no Capítulo 3, além da descrição dos modelos utilizados na cinética de crescimento microbiano, consumo de substratos e formação de P(3HB). Os resultados e discussões são mostrados no Capítulo 4. No Capítulo 5, são apontadas as principais conclusões e as sugestões para a realização de trabalhos futuros relacionados à predição das propriedades finais do biopolímero.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

No início do século 20, foram observados corpos de inclusão do tipo lipídio na bactéria *Azobacter chroococcum* (SUDESH et al., 2000). Por volta de 1909, Emil Fischer demonstrou que proteínas são moléculas grandes formadas por cadeias de aminoácidos ou “poli”-peptídeos, nome que originou o termo. Apesar disto, antes da primeira guerra mundial, poucos químicos aceitavam a idéia de moléculas grandes, que atualmente chamamos polímeros (MORAWETZ, 1985; LENZ e MARCHESSAULT, 2005).

Segundo LENZ e MARCHESSAULT (2005), um poliéster natural foi descoberto por Maurice Lemoigne, na década de 20, enquanto tentava descobrir a causa da acidificação de uma suspensão aquosa contendo a bactéria *Bacillus megaterium*. Este poliéster é sintetizado por alguns microrganismos como reserva de carbono e energia, o que aumenta a chance de sobrevivência do microrganismo em um ambiente com escassez de nutrientes (Lopez et al., 1996). Em 1923, Lemoigne publicou que o ácido produzido pela bactéria era o ácido 3-hidroxitubúrico e, em 1927, ele descreveu que obteve um material sólido desta bactéria o qual ele chamou de polímero do ácido 3-hidroxitubúrico. Ele chegou a esta conclusão hidrolisando o material encontrado em uma série de oligômeros solúveis em água. Ele chamou a menor unidade formadora de ácido lipídico- β -hidroxitubúrico e sugeriu que o polímero era produzido pela célula por polimerização de desidratação. Contudo, a informação de que uma bactéria era capaz de produzir polímero permaneceu desconhecida por grande parte da comunidade científica até o final dos anos 50. Lemoigne havia publicado uma série de artigos com suas descobertas em jornais Franceses de baixo impacto, pois microbiologistas não estavam interessados em lipídios, como se referia Lemoigne ao poliéster encontrado, e muitos químicos orgânicos se recusaram a acreditar que existiam moléculas como polímeros (LENZ e MARCHESSAULT, 2005).

Na mesma época que Lemoigne publicou seu trabalho, Herman Staudinger, da Universidade de Freiburg, estava sendo ridicularizado pelos seus colegas europeus por propor a existência de moléculas com alta massa molar, chamadas de macromoléculas. Na década

de 30, Wallace Carothers, pesquisador da Dupont, publicou trabalhos sobre síntese e caracterização de poliésteres alifáticos e poliamidas. Somente em 1953, Staudinger recebeu o prêmio Nobel de química pelo seu trabalho em síntese de polímeros e por defender o conceito de macromoléculas. Enquanto isso, o P(3HB) era descrito como lipídio, e não como poliéster, nos livros de bioquímica (MORAWETZ, 1985; LENZ e MARCHESSAULT, 2005).

A redescoberta dos PHAs se deu no final dos anos 50, quando uma série de estudos independentes mostrou que o acúmulo de P(3HB) funcionava como reserva de carbono e energia para o microrganismo (SUDESH et al., 2000).

2.1 Biopolímeros

Biopolímeros são definidos como macromoléculas, sintetizados por organismos vivos, formadas por moléculas idênticas ou muito similares ligadas covalentemente formando uma grande cadeia (STEINBÜCHEL, 2001; KOLYBABA et al., 2004).

Os biopolímeros são classificados em oito grupos de acordo com sua estrutura molecular em:

- i) ácidos nucleicos (DNA, RNA);
- ii) poliamidas (proteínas, poliaminoácidos);
- iii) polissacarídeos (amido, glicogênio, celulose);
- iv) polioxiésteres orgânicos (poli(3-hidroxiacetato), poli(3-hidroxiisobutirato), poli(ácido málico));
- v) politioésteres (polimercaptopropionato);
- vi) poliésteres inorgânicos (polifosfatos);
- vii) poliisoprenoides (borracha natural);
- viii) polifenóis (lignina).

Cada grupo de biopolímero possui funções diferentes nas células, como expressão da informação genética, reações de catálises, armazenamento de energia, carbono e outros nutrientes, estrutura celular, entre outras funções (STEINBÜCHEL, 2001).

Em STUBBE et al. (2005), encontra-se uma revisão dos mecanismos de síntese de alguns biopolímeros, como glicogênio, amido, polifosfato, poliisopreno e poli(3-hidroxiacetato).

2.2 Polihidroxicanoatos

Dentre os polioxiésteres destacam-se os polihidroxicanoatos (PHAs). Estes são sintetizados por bactérias e acumulados em inclusões insolúveis no citoplasma, chegando a acumular, em alguns casos, cerca de 90% de seu peso seco. Estes biopolímeros servem como reserva de carbono e energia para o microrganismo. Através da polimerização de intermediários solúveis em moléculas insolúveis, a bactéria não altera sua pressão osmótica e mantém sua reserva de nutrientes com baixo custo, garantindo assim, a sobrevivência em situações de escassez de alimentos (DAWES e SENIOR, 1783; MADISON e HUISMAN, 1999; REHM, 2003).

Os PHAs são termoplásticos ou elastômeros, dependendo do tamanho de cadeia, e podem ser processados em equipamentos utilizados na manufatura de plásticos convencionais. Além disso, são insolúveis em água, possuem um alto grau de polimerização variando entre 10^5 a 10^7 Da, exibem propriedades piezoelétricas, são atóxicos e biocompatíveis. Também são compostos opticamente ativos, enantiômeros puros e na grande maioria dos casos, apresentam configuração D, devido à estereoespecificidade da enzima PHA sintase. Outro fator importante a considerar é que podem ser produzidos a partir de CO_2 ou fontes renováveis de carbono, como açúcares (VALAPPIL, 2007; REDDY et al., 2003; STEINBÜCHEL, 2001; SUDESH et al., 2000; MADISON e HUISMAN, 1999;).

Contudo a característica mais importante dos PHAs é a biodegradabilidade. As bactérias que acumulam polímero possuem uma enzima, PHA depolimerase, capaz de degradar o polímero que se encontra dentro da célula para utilização deste como fonte de carbono. Porém, com esta enzima, não é possível degradar o polímero externamente, isto é, depois de retirado das células, possivelmente devido à mudança do estado amorfo para cristalino. Mas existem muitos microrganismos (encontrados no solo, águas marinhas e lagos) que possuem uma PHA depolimerase extracelular, capaz de degradar o biopolímero depois de retirado da célula, utilizando-o como fonte de carbono. A habilidade de degradar PHAs não é restrita a bactérias, muitos fungos também são capazes de degradar os PHAs (JENDROSSEK et al., 1996; MERRICK et al., 1999; SUDESH et al., 2000).

São muitos os fatores que influenciam o tempo de biodegradação, alguns relacionados ao ambiente (temperatura, umidade, pH e disponibilidade de nutrientes) e outros relacionados ao biopolímero (composição, cristalinidade, aditivos, espessura e área superficial). A biodegradação ocorre na superfície por hidrólise enzimática (AMASS et al., 1998; SUDESH et al., 2000).

A biodegradação de PHAs em condições aeróbias resulta em dióxido de carbono e água, enquanto que, sob condições anaeróbias, resulta em dióxido de carbono e metano. PHAs são compostáveis em um grande intervalo de temperatura, sendo a máxima próxima a 60°C , com um nível de umidade de 55%. Estudos nestas condições mostraram que 85% do PHA degradou em sete semanas, enquanto que, em ambiente aquático, ocorreu degradação em 254 dias, em uma temperatura que não excedeu os 6°C (REDDY et al., 2003).

A taxa de degradação de peças de P(3HB) é da ordem de meses em efluente aeróbico e anos em águas marinhas. A Figura 2.1 mostra uma foto da degradação de frascos feitos de copolímero biodegradável, poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (P(3HB-co-3HV)) incubados em lodo ativado a uma temperatura média de 20°C (MADISON e HUISMAN,1999).

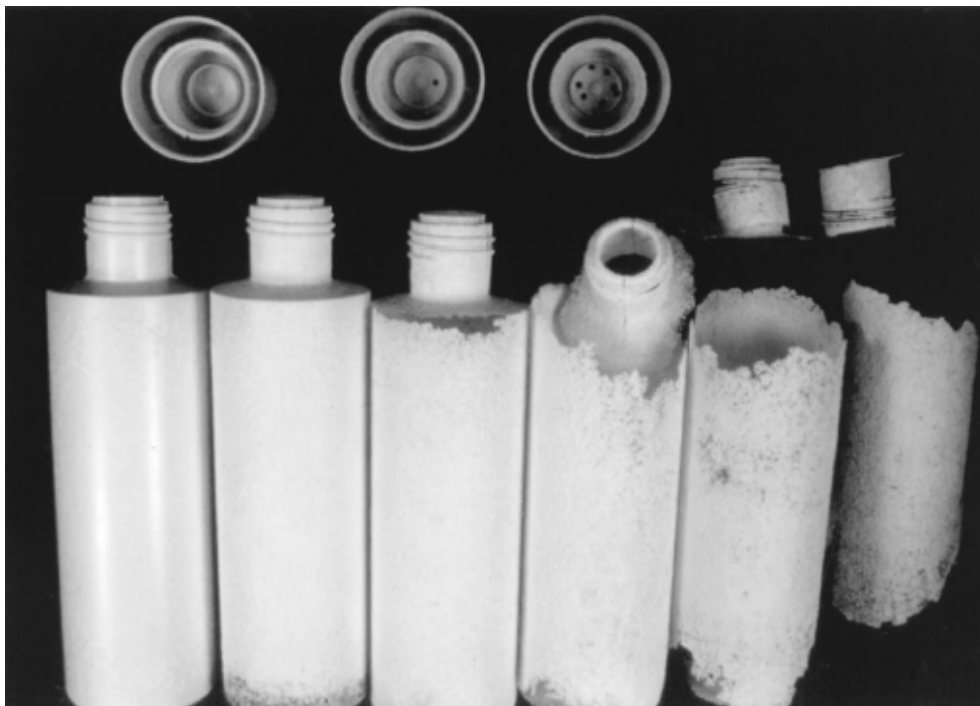


Figura 2.1: Degradação de frascos de P(3HB-co-3HV) em lodo ativado referente a um período de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 semanas (MADISON e HUISMAN, 1999).

2.2.1 Propriedades e aplicações de PHAs

Devido ao grande número de PHAs que podem ser obtidos e às similaridades encontradas entre suas propriedades e as dos plásticos petroquímicos, os PHAs podem ser usados substituindo polímeros convencionais em um grande número de aplicações, tais como, utilização em sacolas, aparelhos de barbear descartáveis, fraldas, produtos higiênicos femininos, embalagens de cosméticos, frascos de xampu, entre outras coisas (LEE, 1996a; MADISON e HUISMAN, 1999; REDDY et al., 2003).

Na área médica, os PHAs encontram aplicação devido à sua biocompatibilidade. Podem ser utilizados em tratamento de ferimentos (suturas, malhas cirúrgicas e grampos), sistema vascular (válvulas cardíacas), ortopedia (estrutura para engenharia de cartilagens, regeneração de meniscos), urologia (tubo urológico) e na liberação controlada de medicamentos (LEE, 1996a; ZINN et al., 2001; MARTIN e WILIAMS, 2003).

A Tabela 2.1 mostra a comparação entre as temperaturas de fusão (T_m) e de transição vítrea (T_g) de alguns PHAs e polímeros petroquímicos. Pode-se observar que o P(3HB) possui uma temperatura de transição vítrea maior que a do polipropileno, porém, a adição de 3HV no

P(3HB), na forma de copolímero P(3HB-co-71%3HV), diminui o valor da T_g , ficando mais próximo à do polipropileno.

Tabela 2.1: Temperaturas de fusão (T_m) e transição vítrea (T_g) (SUDESH et al., 2003).

Polímero	T_m (°C)	T_g (°C)
P(3HB) ¹	180	4
P(3HB-co-71%3HV) ²	83	-13
P(4HB) ³	53	-48
PHA_{MCL} ⁴	45-54	-25 a -40
Poliacrilato	-	-106
Polipropileno	176	-10
Poliestireno	240	100

¹Poli(3-hidroxitirato); ²Poli(3-hidroxitirato-co-71%-3-hidroxitirato).

³Poli(4-hidroxitirato); ⁴Poli(hidroxitirato de cadeia média)

A Tabela 2.2 mostra outras propriedades dos PHAs, onde se observa que o P(3HB) tem propriedades próximas às do polipropileno. O P(3HB) possui menor resistência a solventes, porém, maior resistência quando exposto à radiação ultravioleta. Filmes de P(3HB) possuem excelente propriedade de barreira a gás e são tão resistentes quanto os filmes de polipropileno, porém, não tão resistentes como os filmes de polietilenotereftalato (PET) (HOLMES, 1985).

Tabela 2.2: Propriedades de PHAs e polímeros petroquímicos (LEE, 1996a).

Polímero	Temperatura de fusão (°C)	Módulo de Young (GPa)	Tensão de cisalhamento (MPa)	Resistência à ruptura (%)	Resistência ao impacto (Izod) (J/m)
P(3HB) ¹	179	3,5	40	5	50
P(3HB-co-3HV) ²					
3 mol% 3HV	170	2,9	38	-	60
9 mol% 3HV	162	1,9	37	-	95
14 mol% 3HV	150	1,5	35	-	120
20 mol% 3HV	145	1,2	32	-	200
25 mol% 3HV	137	0,7	30	-	400
P(4HB) ³	53	149	104	1000	-
P(3HB-co-4HB) ⁴					
3 mol% 4HB	166	-	28	45	-
10 mol% 4HB	159	-	24	242	-
16 mol% 4HB	-	-	26	444	-
64 mol% 4HB	50	30	17	591	-
90 mol% 4HB	50	100	65	1080	-
P(3HHx-co-3HO) ⁵	61	-	10	300	-
Polipropileno	170	1,7	34,5	400	45
Polietilenotereftalato	262	2,2	56	7300	3400
Poliestireno	110	3,1	50	-	21

¹Poli(3-hidroxitirato); ²Poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato); ³Poli(4-hidroxitirato);

⁴Poli(3-hidroxitirato-co-4-hidroxitirato); ⁵Poli(3-hidroxi-hexanoato-co-3-hidroxi-octanoato).

A resistência à ruptura do P(3HB) é muito inferior à do polipropileno, porém, esta propriedade pode ser melhorada pela adição de 4 hidroxibutirato (4HB) ao poli(3-hidroxibutirato) na forma de copolímero, como observado na Tabela 2.2 (LEE, 1996a).

Um ponto desfavorável ao P(3HB) é o fato da sua temperatura de degradação térmica, próxima a 200°C, ser muito próxima à temperatura de fusão. O decréscimo da temperatura de fusão com o aumento da fração de 3HV, sem afetar a temperatura de degradação, permite melhor processamento térmico do copolímero. Além disso, o aumento da fração de 3HV torna o polímero mais flexível (pelo decréscimo do Módulo de Young) e aumenta sua resistência ao impacto. Assim, as propriedades do P(3HB-co-3HV) podem ser controladas pelo ajuste da fração de 3HV durante a cultura em biorreator (LEE, 1996a).

2.2.2 As moléculas de PHAs

Segundo REHM (2003), aproximadamente 150 tipos de monômeros de PHAs foram encontrados. Estes incluem 3-hidroxicanoatos com 3 a 12 átomos de carbono na cadeia lateral ligada ao terceiro carbono (posição β), 4-hidroxicanoatos com 4 a 8 átomos de carbono, 5-hidroxipentanoatos, 5-hidroxihexanoatos e 6-hidroxidodecanoatos, entre outros (LEE, 1996b). Esta variedade de PHAs aumenta as possibilidades de aplicação, em decorrência das diferentes propriedades apresentadas. Porém, são poucos aqueles que são produzidos em grande quantidade pelos microrganismos. Um dos mais estudados e difundidos é o poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) (SUDESH, 2000). A estrutura geral de alguns PHAs pode ser visualizada na Figura 2.2.

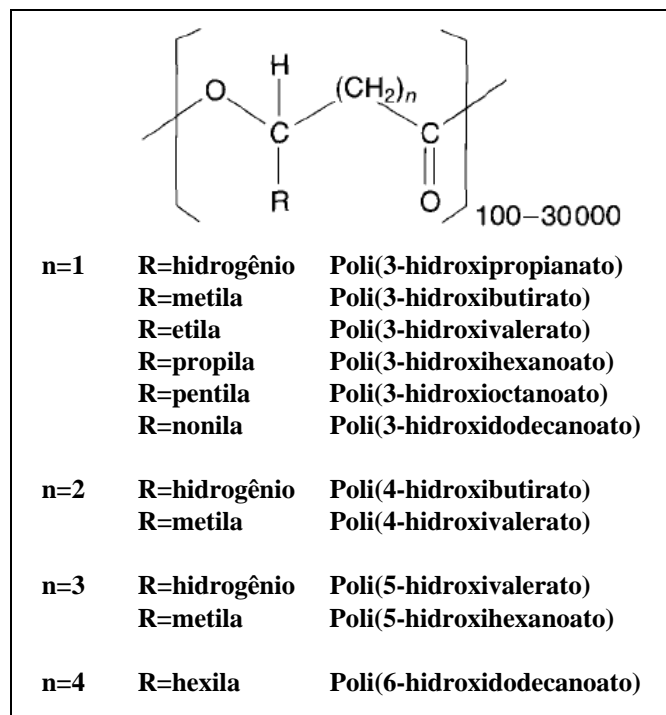


Figura 2.2: Estrutura geral de PHAs e seus principais representantes (LEE, 1996b).

Segundo STUBBE et al. (2005), se o grupamento R for igual ao hidrogênio, metila ou etila o PHA será um termoplástico e caso R seja uma cadeia de C_3H_7 até $C_{14}H_{29}$ o polímero será um elastômero.

A cadeia lateral presente no monômero pode ser um grupamento alquila ou um composto aromático, halogenado, insaturado, entre outras possibilidades (MADISON e HUISMAN, 1999). A Figura 2.3 exemplifica alguns tipos de monômeros com diferentes cadeias laterais. O Apêndice A mostra uma variedade de exemplos, 91 tipos diferentes de monômeros (hidroxialcanoatos) identificados em STEINBÜCHEL e VALENTIN (1995)

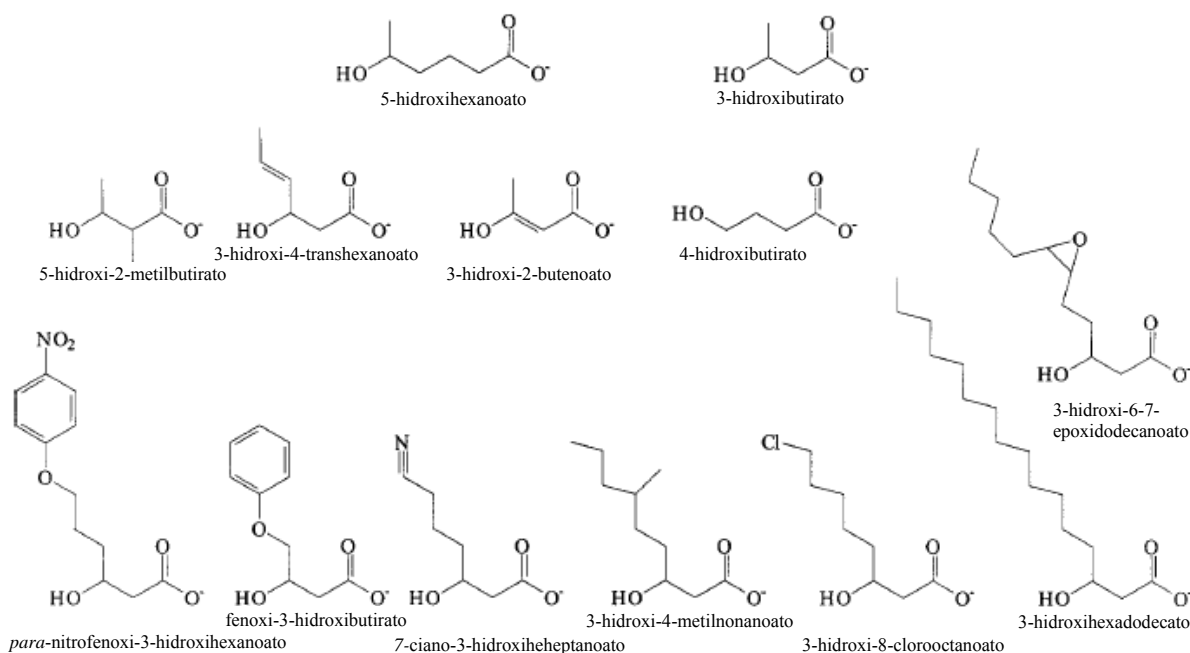


Figura 2.3: Monômeros de PHAs com diferentes cadeias laterais (REHM, 2003).

Os PHAs são classificados em três grupos quanto ao tamanho da cadeia do monômero que constitui o polímero. No primeiro grupo, comprimento curto de cadeia (scIPHA), o monômero contém de 3 a 5 carbonos na cadeia. O segundo grupo tem comprimento médio de cadeia (mcIPHA) e contém de 6 a 14 carbonos na cadeia principal. O terceiro grupo possui comprimento longo de cadeia (lcIPHA), quando o monômero contém mais de 14 carbonos (ZINN et al., 2001).

As massas molares dos PHAs encontrados em microrganismos produtores variam conforme as condições de produção, como por exemplo, o tipo de PHA sintetizado, microrganismo utilizado, entre outros fatores, mas, em geral, estão compreendidas entre 50.000 e 1.000.000 Da (MADISON e HUISMAN, 1999; REDDY et al., 2003).

2.2.3 Microrganismos produtores

Os PHAs são sintetizados naturalmente por pelo menos 75 gêneros diferentes de bactérias, tanto gram-positivas quanto gram-negativas (REDDY et al., 2003). Além disso, com o desenvolvimento da biologia molecular, outras bactérias que não acumulam PHAs naturalmente podem ser modificadas geneticamente passando, assim, a acumular os biopolímeros. Também foram realizados experimentos com leveduras recombinantes e com plantas transgênicas para a produção de biopolímeros (SUDESH et al., 2000; STEINBÜCHEL, 2001; REDDY et al., 2003).

A existência de PHAs não está limitada a grânulos insolúveis no citoplasma de bactérias. Conforme reportado por ZINN et al. (2001), um poli(hidroxibutirato) de baixa massa molar (cPHB), próxima a 14.000 Da, associado com polifosfatos ou íons de cálcio, foi encontrado nas bactérias *Bacillus subtilis*, *Azotobacter vinelandii* e *Streptomyces lividans*. O cPHB é encontrado em concentrações na ordem de 3 a 4 vezes menor que os PHAs acumulados no citoplasma (REHM, 2003). Também foi identificado o cPHB na bactéria *Escherichia coli*. Apesar disto, não se sabe como este cPHB é sintetizado, uma vez que não foi identificada nenhuma enzima, nem gene associado à produção de P(3HB) no genoma seqüenciado da *E. coli*, sugerindo que o processo de obtenção do cPHB é diferente do P(3HB) acumulado por bactérias no citoplasma (HUANG e REUSCH, 1996; REHM, 2003). Este mesmo polímero também foi encontrado em células eucarióticas como, por exemplo, leveduras, plantas como espinafre e mesmo em células animais (ZINN et al., 2001).

Dependendo da fonte de carbono e da espécie da bactéria, podem-se obter tipos diferentes de PHAs, como é ilustrado na Tabela 2.3, onde se pode observar a produção de PHAs por tipos diferentes de bactérias isoladas naturalmente e também modificadas geneticamente, para diferentes fontes de carbono.

Além disso, alguns microrganismos são capazes de acumular copolímeros quando se adiciona uma segunda fonte de carbono ao cultivo (BRAUNENEGG et al., 2004). Algumas bactérias gram-positivas do gênero *Corynebacterium*, *Nocardya* e *Rhodococcus* são capazes de acumular copolímeros a partir de uma única fonte de carbono (VALAPPIL, 2007).

Tabela 2.3: Produção de PHAs por diferentes bactérias (REDDY et al., 2003).

Microrganismo	Fonte de Carbono	PHA	Porcentagem de PHA (% w/v)	
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Gliconato	P(3HB) ¹	46-85	
	Propionato	P(3HB)	26-36	
	Octanoato	P(3HB)	38-45	
<i>B. megaterium</i> QMB1551	Glicose	P(3HB)	20	
<i>Klebsiella aerogenes</i> recombinante	Melaço	P(3HB)	65	
<i>Methylobacterium rhodesianum</i> MB 127	Frutose/Metanol	P(3HB)	30	
<i>Methylobacterium extorquens</i> (ATCC55366)	Metanol	P(3HB)	40-46	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Euphorbia e Óleo de rícino	PHA ²	20-30	
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Pentanol	P(3HV) ³	55	
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Gliconato	P(3HB)	1,1-5	
	Octanoato	P(3HB)	50-68	
<i>Pseudomona. putida</i> GPp104	Octanoato	P(3HB)	14-22	
		Óleo de semente de palma	PHA	37
		Ácido láurico	PHA	25
		Ácido mirístico	PHA	28
		Ácido oléico	PHA	19
<i>P. putida</i> BM01	Ácido fenoxi-decanóico	5POHV ⁴	15-35	
<i>Sphaerotilus natans</i>	Glicose	P(3HB)	40	

¹Poli(3-hidroxitirato); ²Polihidroxicanoato; ³Poli(3-hidroxicvalerato); ⁴ Poli(3-hidroxi-5-fenilvalerato)

Os PHAs são obtidos por microrganismos em cultivos onde haja, geralmente, excesso de fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial como, por exemplo, nitrogênio, fósforo, oxigênio ou magnésio (DAWES e SENIOR, 1783; STEINBÜCHEL, 2001). Porém, existem algumas bactérias capazes de acumular biopolímeros sem restrições a nutrientes. (MCCOOL et al., 1996; MCCOOL e CANNON, 2001).

Segundo LEE (1996b), pode-se dividir as bactérias em dois grupos, de acordo com as condições que requerem para acumular PHAs. O primeiro grupo requer a limitação de algum nutriente essencial para sintetizar PHAs. As bactérias *Alcaligenes eutrophus*¹, *Protomonas extorquens* e *Pseudomonas oleovorans* fazem parte deste grupo. O segundo grupo não necessita da limitação de um nutriente essencial e pode acumular polímero durante a fase de crescimento exponencial das células. São exemplos do segundo grupo, as bactérias

¹ A bactéria *Alcaligenes eutrophus* foi reclassificada diversas vezes, passando por *Ralstonia eutropha*, *Wausteria eutropha* e, recentemente, vem sendo chamada de *Cupriavidus necator*.

Alcaligenes latus, uma linhagem mutante da *Azotobacter vineilandii* e a *E. coli* recombinante (com operon² da *A. eutrophus*).

Em BRAUNENEGG et al. (2004), são mostrados três comportamentos distintos para crescimento celular e acúmulo de PHA, exemplificados por combinação de microrganismo e fonte de carbono, como segue abaixo:

1. síntese de PHAs ocorre em associação ao crescimento. (ex.: *A. latus* crescendo em sacarose);
2. síntese de PHAs ocorre parcialmente associada ao crescimento. (ex.: *A. latus* crescendo em glicose, *Ralstonia eutropha* G⁺³ crescendo em glicose);
3. síntese de PHAs ocorre principalmente depois que acaba a fonte de carbono. (*Pseudomonas* 2 F crescendo em glicose).

2.2.4 Biosíntese de PHAs

Para a síntese de PHAs, são necessárias 3 fases metabólicas (Figura 2.4). Primeiro, uma fonte de carbono apropriada para a síntese deve ser disponibilizada para a célula. Isto ocorre através de um sistema local de transporte na membrana citoplasmática da célula ou por difusão do composto para a célula. Na segunda fase, reações anabólicas ou catabólicas, ou mesmo ambas, convertem o composto a hidroxiaçil coenzima A tioéster, o qual é o substrato para a PHA sintase (também chamada PHA polimerase). Na terceira fase, a PHA sintase, enzima chave para a síntese de PHAs, catalisa a formação das ligações ésteres com liberação da coenzima A (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).

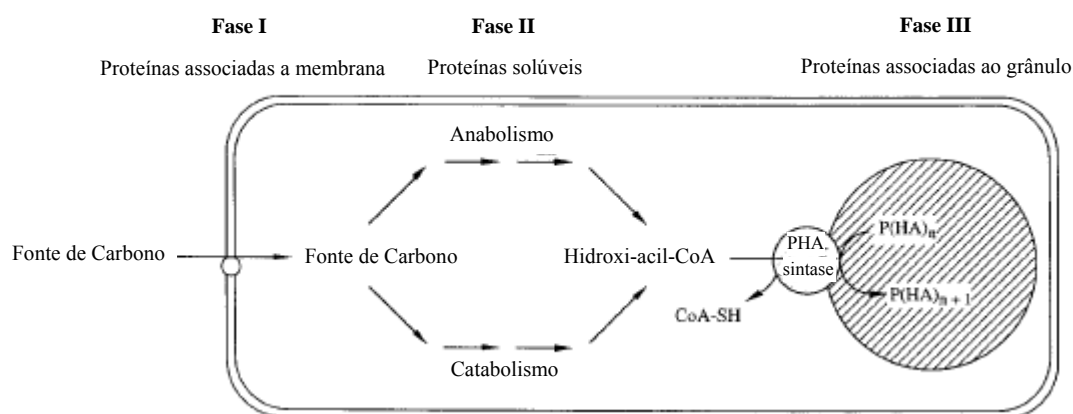


Figura 2.4: Fases da biosíntese de PHAs (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).

² Unidade operacional responsável pela expressão e regulação de genes, composta por genes repressores, reguladores e estruturais.

Os PHAs são acumulados nas células pelo uso de inúmeras fontes de carbono, que são consumidos pelas células por diferentes rotas metabólicas para gerar o monômero, que é o substrato para a PHA sintase. A Figura 2.5 exemplifica o direcionamento para as rotas metabólicas, conforme a fonte de carbono utilizada.

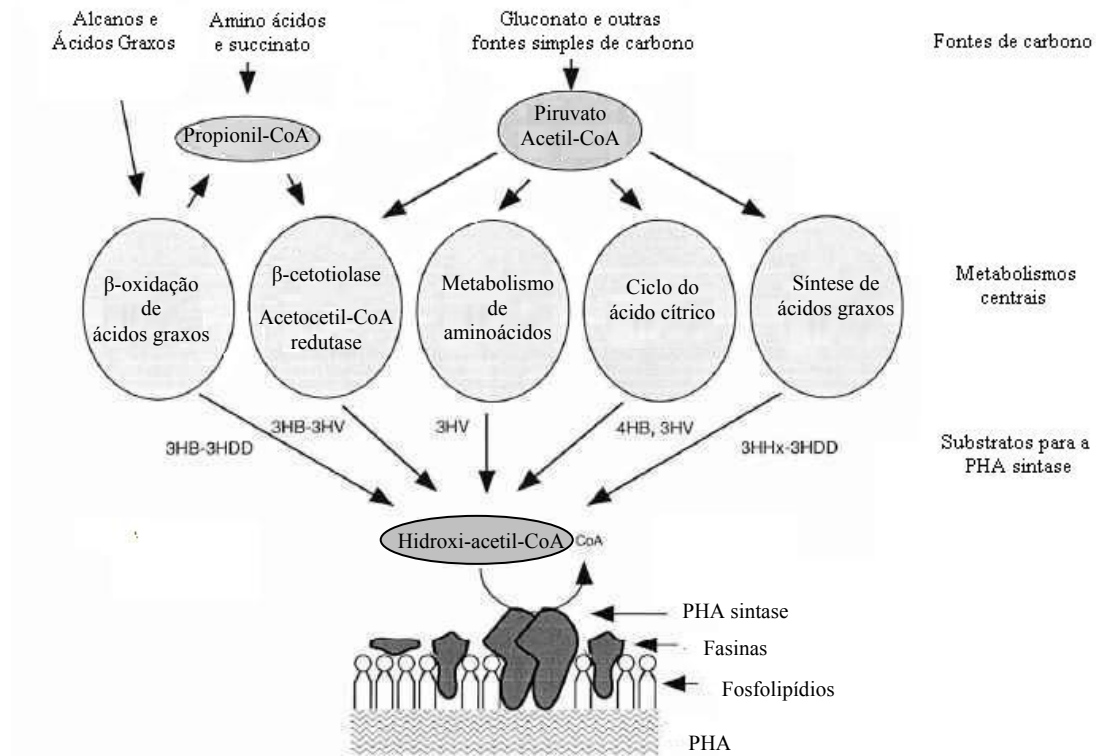


Figura 2.5: Diferentes rotas metabólicas para consumo de substrato (REHM e STEINBÜCHEL, 1999).

As diferentes rotas metabólicas para a síntese de PHAs foram bastante estudadas na bactéria *R. eutropha*, ilustrada na Figura 2.6. Dependendo da fonte de carbono encontrada pela bactéria, ela desvia o metabolismo para uma determinada rota metabólica.

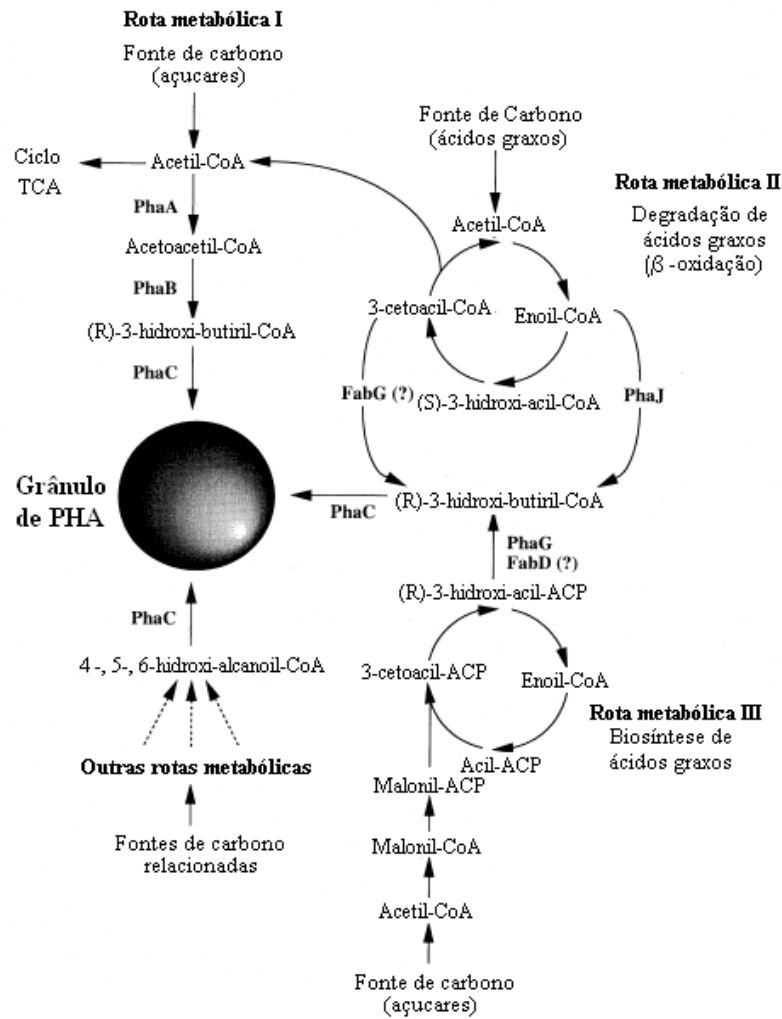


Figura 2.6: Rotas metabólicas que fornecem monômeros para a biosíntese de PHAs na bactéria *R. eutropha* (SUDESH et al., 2000).

A Figura 2.7 mostra o esquema clássico de reação de obtenção do P(3HB) quando utilizado fontes de açúcares para a maioria das bactérias produtoras de P(3HB), excetuando as que não possuem a enzima PhaA, para as quais o início do esquema de reação permanece desconhecido. Esta reação corresponde à rota metabólica I da Figura 2.6. Nesta reação, observa-se que duas moléculas de Acetil-coenzima A são condensadas a Acetoacetyl-coenzima A, pela ação da enzima β -cetotiolase (PhaA). A Acetoacetyl-coenzima A é reduzida a 3-hidroxi-butiril-coenzima A (monômero) pela ação da enzima Acetoacetyl-coenzima A redutase NADPH dependente (PhaB). Pela ação da enzima PHA sintase (PhaC), é obtido o polímero (SUDESH et al., 2000).

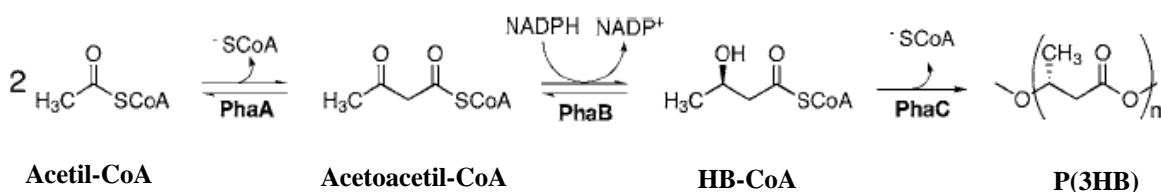


Figura 2.7: Esquema de reação de obtenção do P(3HB) (STUBBE et al., 2005).

De acordo com REHM (2003), foram obtidas seqüências de nucleotídeos de 59 genes de PHA sintase encontradas em 45 bactérias diferentes. Uma extensiva comparação entre as PHA sintases mostraram que estas enzimas possuem uma forte similaridade (8 a 96% de aminoácidos idênticos). Os autores construíram a árvore filogenética (Figura 2.8) baseada no múltiplo alinhamento dos genes que dá suporte à classificação das PHA sintases.

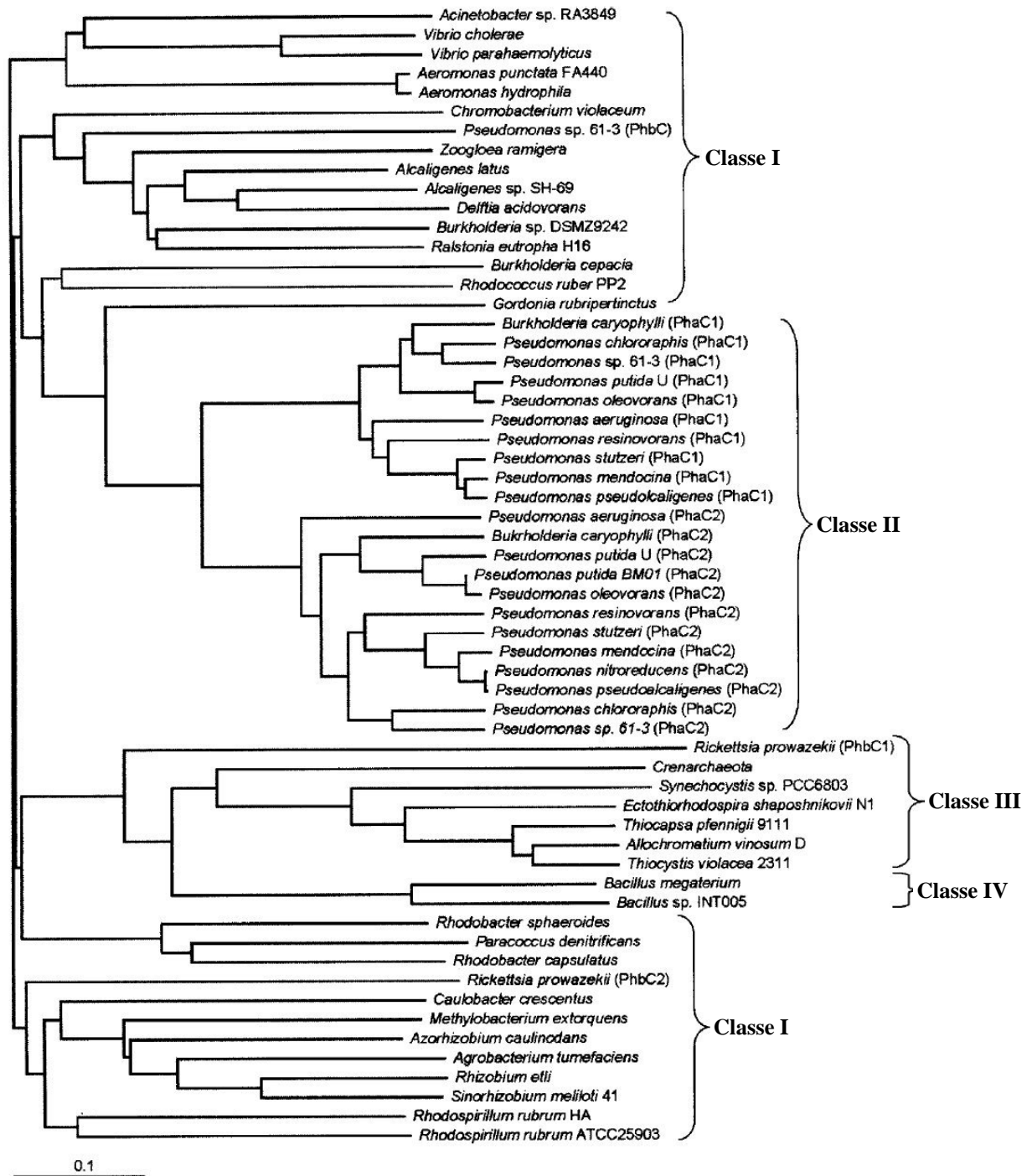






Figura 2.8: Árvore filogenética das 59 PHAs sintases (REHM, 2003).

Na árvore filogenética mostrada na Figura 2.8, observa-se uma escala (valor 0,1), que indica a distância evolutiva, sendo um valor de referência para a comparação entre as

espécies. Neste caso, a distância corresponde a 1 aminoácido trocado a cada 10 posições de aminoácidos (REHM, 2003).

As PHA sintases são divididas em quatro grupos, de acordo com a estrutura primária deduzida das seqüências de genes, especificidade ao substrato e subunidade de composição (REHM, 2003). A Tabela 2.4 mostra as quatro classes de PHA sintases, também identificadas na Figura 2.8.

Tabela 2.4: Divisão das PHA sintases (VALAPPIL et al., 2007).

Classe	Subunidade	Microrganismos	Substrato da enzima
I	 PhaC ~ 60 – 73 kDa	<i>Ralstonia eutropha</i> + maioria das outras bactérias exceto as listadas abaixo	3HA _{SCL} -CoA [~ C ₃ -C ₅] e 4HA _{SCL} -CoA 5HA _{SCL} -CoA, 3MA _{SCL} -CoA
II	 PhaC ~ 60 – 65 kDa	<i>Pseudomonas oleovorans</i> + maioria das <i>Pseudomona sp.</i>	3HA _{MCL} -CoA [~ ≥C ₅]
III	 PhaC PhaE ~ 40 kDa ~ 40 kDa	<i>Allochromatium vinosum</i> <i>Thiocapsa pfenningii</i> + maioria das <i>Cianobactérias.</i>	3HA _{SCL} -CoA [~ C ₃ -C ₅] (3HA _{MCL} -CoA [~ C ₆ -C ₈] e 4HA-CoA, 5HA-CoA)
IV	 PhaC PhaR ~ 40 kDa ~22kDa	<i>Bacillus megaterium</i> + maioria das bactérias do gênero <i>Bacillus.</i>	3HA _{SCL} -CoA [~ C ₃ -C ₅]

As Classe I e II de PHA sintases são formadas por enzimas de um único tipo de subunidade (PhaC) com massa molar entre 60 e 73 kDa. As PHA sintases da classe I, como a encontrada na bactéria *R. eutropha*, utilizam preferencialmente hidroxialcil de cadeia curta (contendo 3 a 5 carbonos), enquanto que as da classe II, encontradas por exemplo na bactéria *P. aeruginosa*, utilizam preferencialmente monômeros (substratos para a PHA sintase) de cadeia média, contendo de 6 a 14 carbonos. Na Classe I encontra-se a maioria das bactérias que produzem PHAs. A Classe III de PHA sintases é formada por enzimas constituídas de 2 tipos de subunidades, PhaC e PhaE, com massas molares de aproximadamente 40 kDa cada. A PhaC da Classe III mostra similaridade de 21-28% com a PhaC da classe I e II, enquanto que a PhaE não apresenta similaridade com outras PHA sintases. Bactérias como a *A. vinosum* representam a classe III de PHA sintases, as quais dão preferência aos monômeros com até oito carbonos. A Classe IV, criada recentemente, é representada pela PHA sintase encontrada

na *B. megaterium*, similar a PHA sintase encontrada na Classe III, sendo a PhaE substituída pela PhaR, com massa molecular de aproximadamente 22 kDa. As PHA sintases da Classe IV têm preferência por hidroxialcil de cadeia curta. Esta foi a última classe a ser reconhecida e permanece pouco estudada (REHM e STEINBÜCHEL, 1999; STEINBÜCHEL, 2001; REHM, 2003; VALAPPIL et al., 2007), sendo a classe do microrganismo estudado nesta dissertação.

Exceções a essa classificação foram encontradas na PHA sintase da *Thiocapsa pfennigii* (contém duas unidades diferentes das relatadas acima com aproximadamente 85% de similaridade com a PhaC da classe III), PHA sintase da *Aeromonas punctata* (composta por uma subunidade com 45% de similaridade a da Classe I) e PHA sintase da *Pseudomonas sp.* 61-3 (possui duas subunidades, PhaC1 e PhaC2, muito similares à da Classe II, diferenciando-se com respeito à especificidade ao substrato) (REHM e STEINBÜCHEL, 1999; STEINBÜCHEL, 2001; REHM, 2003).

A Figura 2.9 mostra, para cada classe, os genes da PHA sintase e genes que codificam outras proteínas relacionadas ao metabolismo do PHA, que estão agrupados no genoma das bactérias.

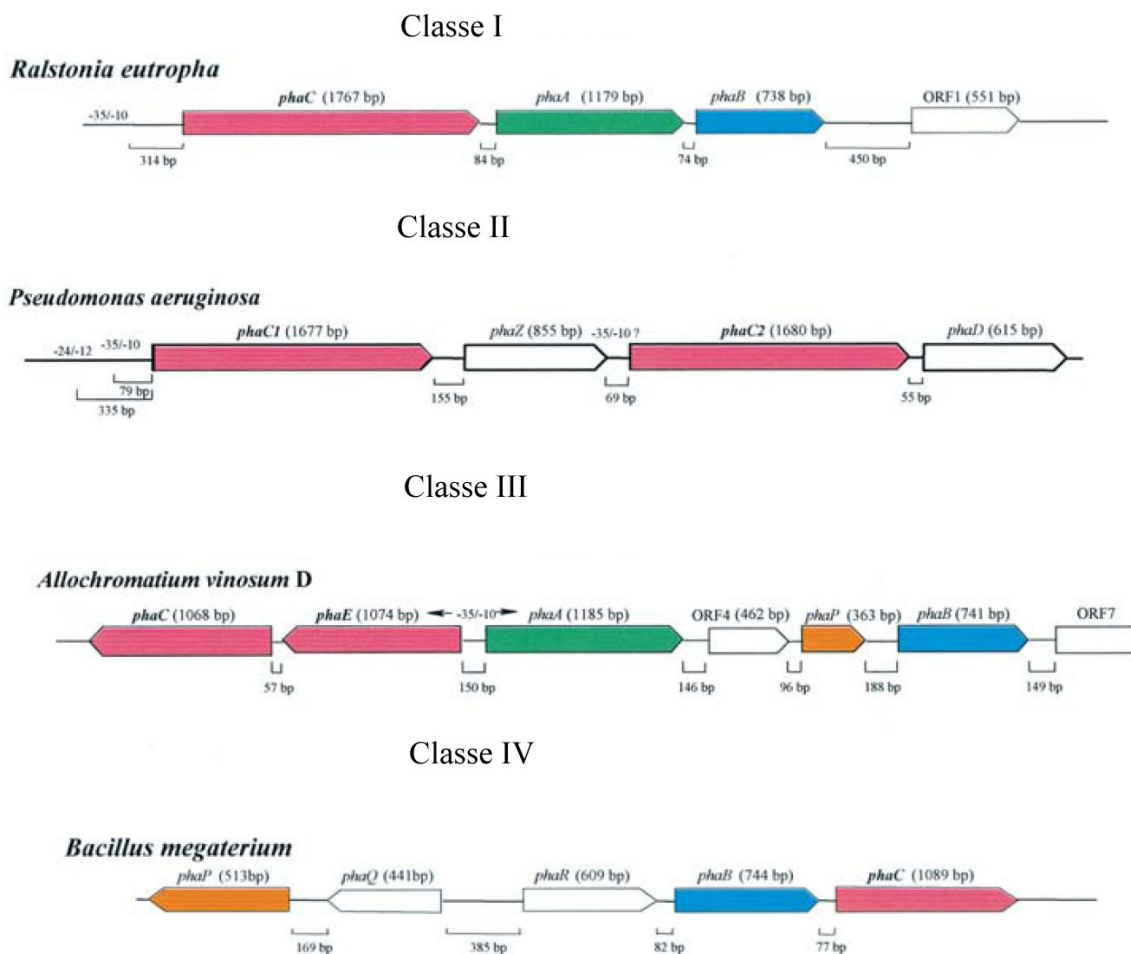


Figura 2.9: Representação da organização dos genes que codificam as enzimas das quatro classes de PHA sintase (REHM, 2003).

Na *R. eutropha*, representante da classe I, os genes que codificam a PHA sintase (*phaC*), β -cetotiolase (*phaA*) e acetoacetil coenzima A redutase (*phaB*) formam o operon *phaCAB* (Figura 2.9). Algumas espécies que fazem parte da Classe I, como a *Paracoccus denitrificans*, possuem alguns genes adjacentes ao da PHA sintase, como *phaP* (gene que codifica as fasinias) e *phaR* (gene que codifica proteínas com funções reguladoras), que estão relacionados à síntese de PHAs (REHM, 2003; LUENGO et al., 2003; STUBBE et al., 2005).

As bactérias do gênero *Pseudomonas*, que compõem a Classe II de PHA sintases, possuem dois genes de *phaC* separados pelo gene *phaZ*, que codifica a PHA depolimerase intracelular (Figura 2.9). Além disso, após o segundo gene *phaC* está localizado o gene *phaD*, que codifica uma proteína estrutural com funções desconhecidas. Algumas espécies podem conter ainda, após a *phaD*, os genes *phaI* e *phaF*, transcritos em direção oposta aos demais genes, que têm funções de codificarem proteínas estruturais e regulatórias (REHM, 2003; LUENGO et al., 2003).

A Classe III de PHA sintases possui os genes *phaC* e *phaE* diretamente ligados em seus genomas. Na bactéria *A. vinosum*, *phaA* e *phaB* estão localizados em direção oposta (Figura 2.9).

As bactérias que fazem parte da classe IV, gênero *Bacillus*, possuem os genes *phaC* e *phaR* separados pelo *phaB* (Figura 2.9). Em direção oposta e antes do operon *phaCBR*, encontra-se os genes *phaP* e *phaQ* (codificam respectivamente as proteínas PhaP e PhaQ). A *B. megaterium* não apresenta o gene *phaA*. A proteína PhaP encontrada nos grânulos de P(3HB) da bactéria *B. megaterium* é diferente das fasinias encontradas para as bactérias de outras classes. A PhaR encontrada nos corpos de inclusão da *B. megaterium* é diferente da proteína codificada pelo gene *phaR* encontrado na classe I de PHA sintases. A PHA sintase da *B. megaterium* pode ser encontrada na forma ativa quando as células estão acumulando PHA e inativa em células que não estão acumulando. A PhaR pode ser a ativadora da PhaC (MACCOOL e CANNON, 1999 e 2001; REHM 2003).

LEE et al. (2004) sugerem que a proteína PhaQ encontrada na *B. megaterium* auto-regula negativamente sua própria expressão. Isso significa que a proteína PhaQ se liga ao operon impedindo a transcrição do gene. Além disso, a PhaQ pode ser também responsável pela repressão do gene *phaP*. A PhaQ é repressora sensível a P(3HB), isto é, a PhaQ é capaz de detectar o início da síntese de P(3HB) e os resultados sugerem que os grânulos de P(3HB) inibem o complexo PhaQ-DNA liberando o gene para transcrição. Portanto, o P(3HB) pode atuar como indutor para expressão do gene *phaP* pela mediação do sistema regulatório da PhaQ.

A Figura 2.10 mostra modelos tridimensionais das PHA sintases de cada classe. Em todas as classes foram encontrados resíduos dos mesmos aminoácidos (Cisteína, Aspartato e Histidina, circulos na Figura 2.10), que evidenciam sua participação como sítio catalítico para a reação.

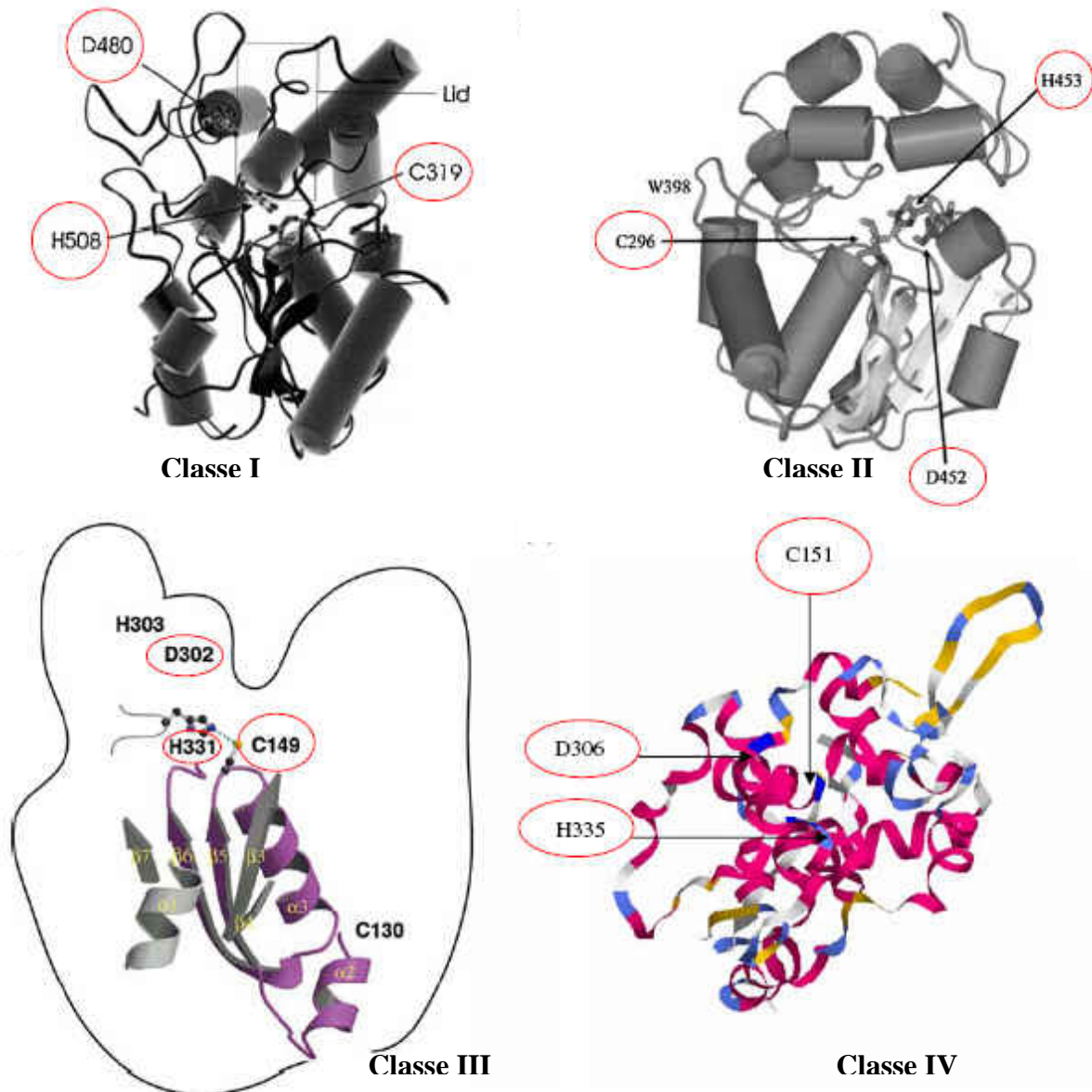


Figura 2.10: Modelo esquemático para as PHA sintases, tríade catalítica de resíduos (cisteína-aspartato-histidina) esta circulado (VALAPPIL et al., 2007).

A Figura 2.11 mostra um esquema de reação, encontrado em STUBBE et al. (2005), que ocorre no sítio catalítico para a formação de polímero de PHA sintases das Classe I e III. O mecanismo (a) envolve um sítio ativo com duas proteínas ligando-se a monômeros. De acordo com esse mecanismo, duas cisteínas, uma para cada monômero, são envolvidas em catálise covalente. O resíduo de histidina é responsável por ativar o resíduo de cisteína através de um ataque nucleofílico. A ativação da hidroxila do hidroxibutirato-CoA por ataque nucleofílico envolve o aspartato que funciona como base catalítica. Assim, existe uma cadeia de polímero em crescimento para cada dímero de sintase. O mecanismo (b) envolve catálise covalente com uma cisteína (uma PHA sintase). Neste caso, um segundo hidroxibutiril-CoA ligado a PHA sintase gera duas moléculas unidas de hidroxibutiril-CoA, que são atacados covalentemente pela cisteína, cedendo a Coenzima A.

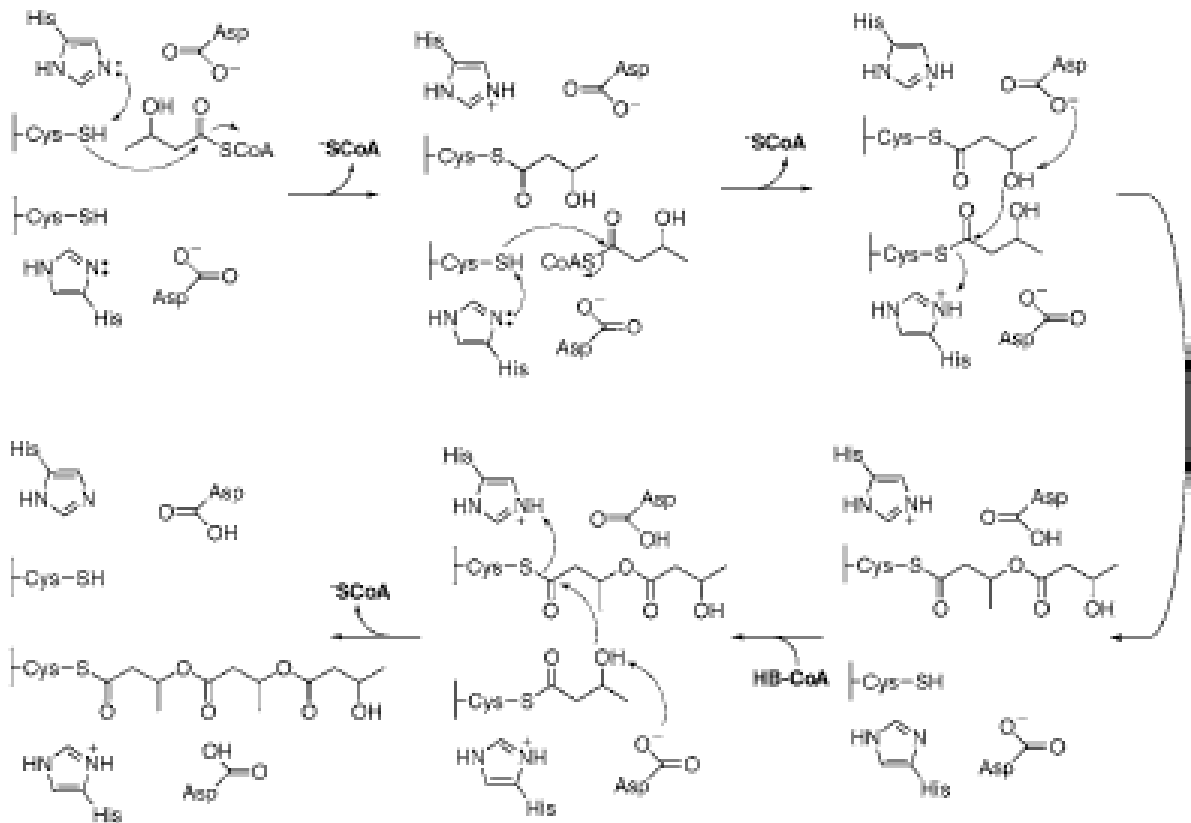
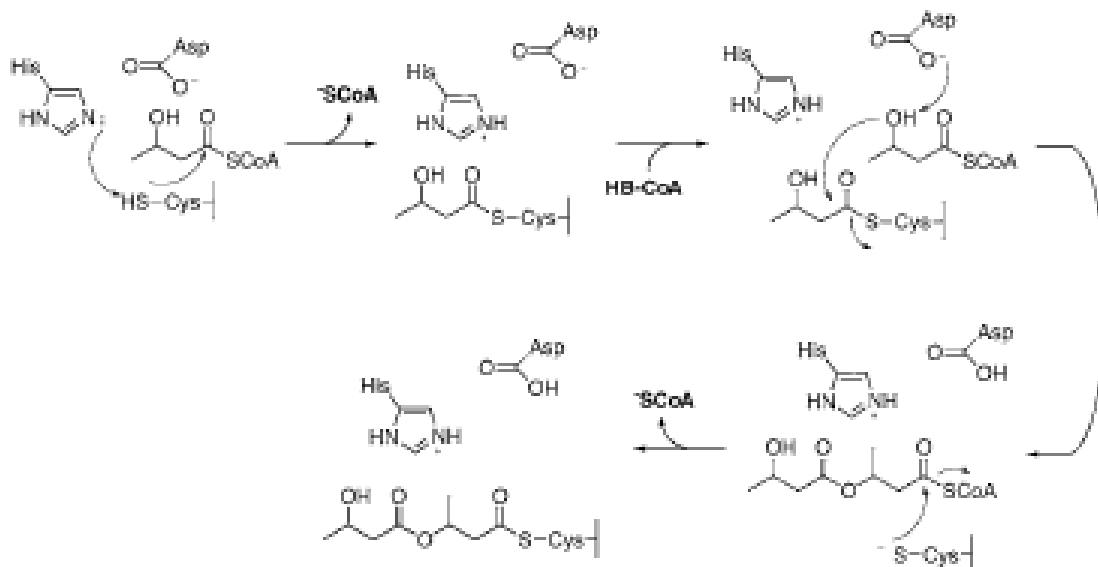
a**b**

Figura 2.11: Mecanismos proposto para a reação de polimerização das Classes I e III de PHA sintases envolvendo dois (a) ou um (b) intermediário (STUBBE et al., 2005).

Um mecanismo muito semelhante ao mostrado anteriormente foi proposto em REHM (2003) para a PHA sintase da Classe II, conforme mostra a Figura 2.12.

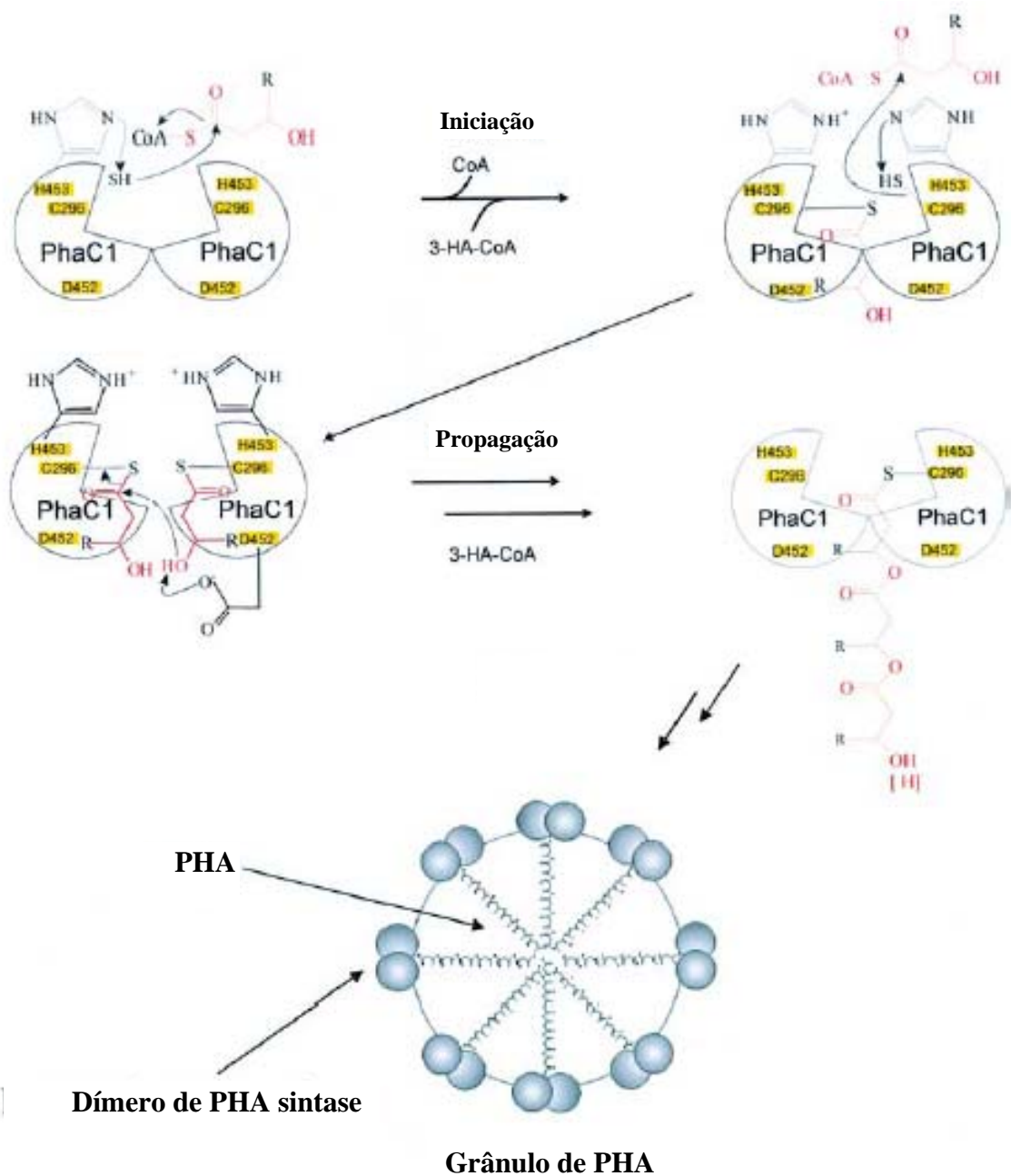


Figura 2.12: Mecanismos proposto para reação de polimerização da Classe II de PHA sintase (REHM, 2003).

Não foi encontrado nenhum mecanismo proposto para as PHA sintases da Classe IV.

Em MCCOOL et al. (1996) os autores sugeriram que o acúmulo de PHA para a bactéria *B. megaterium* pode ser regulado pelo ciclo de crescimento e o procedimento de acúmulo concorre com o funcionamento do ciclo do ácido cítrico.

VAZQUEZ et al. (2003) sugerem que existe uma associação para a bactéria *B. megaterium* no acúmulo de P(3HB) e a atividade da enzima fosfotransbutirilase (enzima que participa da síntese de ATP), pelas seguintes razões encontradas nos seus experimentos: i) a expressão da fosfotransbutirilase e acúmulo de P(3HB) ocorrem simultaneamente durante o crescimento; ii) aminoácidos ramificados que são indutores da síntese dessa enzima aumentaram o acúmulo de P(3HB); iii) indutores naturais dessa enzima também foram utilizados para garantir que não fora devido aos aminoácidos que houve aumento no acúmulo de P(3HB). A bactéria modificada contendo o gene actBm, que ativa a expressão da fosfotransbutirilase, também causou aumento de acúmulo comparando com linhagem selvagem. Eles verificaram que a atividade da enzima e o acúmulo de P(3HB) iniciaram simultaneamente quando o pH do meio, que era 7, diminuiu para aproximadamente 5. É possível que tanto a enzima como o P(3HB) estejam incluídos na regulação do sistema característico do estado que precede a esporulação da bactéria.

2.2.5 Grânulo de PHA

PHAs existem como inclusões discretas tipicamente com diâmetros entre 0,2-0,5 μm , envolto por uma membrana de 2nm de espessura, localizado no citoplasma das células e podem ser visualizados em microscópio com contraste de fase devido sua alta refratividade (DAWES e SENIOR, 1973).

Grânulos contendo mlcPHA parecem ser mais largos que os grânulos contendo sclPHA. Ocorrem também diferenças em suas estruturas, existem duas camadas cristalinas de proteínas separadas por uma camada de fosfolipídios no caso dos grânulos de mlcPHA (ZINN et al., 2001).

Os corpos de inclusões contendo sclPHA isolados da *B. megaterium* são compostos por 97,7% de PHA, 1,87% de proteínas e 0,46% de lipídios, com proteínas e fosfolipídios formando uma camada (SUDESH et al., 2000).

Um esquema do grânulo contendo sclPHA é mostrado na Figura 2.13. O centro do grânulo, composto por PHA, é recoberto por uma camada de lipídios integrados às proteínas. A monocamada de fosfolipídios tem seu lado hidrofóbico direcionado para o centro do grânulo.

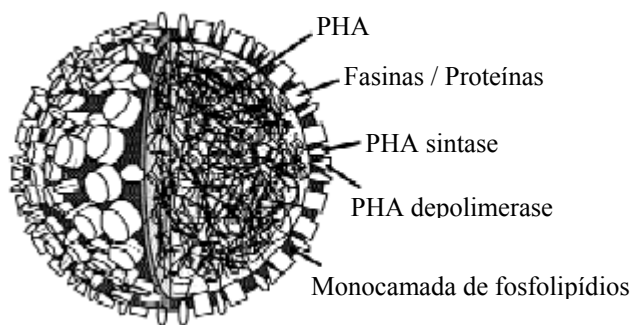


Figura 2.13: Esquema do grânulo de PHA (ZINN et al., 2001).

Proteínas encontradas nos grânulos podem ser de quatro tipos diferentes: PHA polimerase, PHA depolimerase, fasinias (função de estabilização do grânulo) e proteínas com funções desconhecidas (possivelmente enzimas que catalisam a formação inicial dos grânulos e proteínas com funções regulatórias) (ZINN et al., 2001).

As fasinias provavelmente estão envolvidas na estabilização da inclusão de PHA, que se encontra no estado amorfo e é hidrofóbico, no citoplasma hidrofílico da bactéria. Além disso podem estar envolvidas diretamente na formação e no tamanho do grânulo (SUDESH et al., 2000).

A camada de fosfolipídios pode ter a função de proteção, evitando o contato do polímero com a água, o que poderia levar o polímero da forma amorfa para a cristalina (LUENGO et al., 2003).

A Figura 2.14 mostra a microscopia de células de *B. megaterium* em diferentes tempos de cultivos, nota-se que com o aumento do acúmulo, as células que tem forma de bastonetes vão ficando mais arredondadas para acomodar melhor o polímero. Este arredondamento das células também foi descrito por ANDERSON e DAWES (1990).

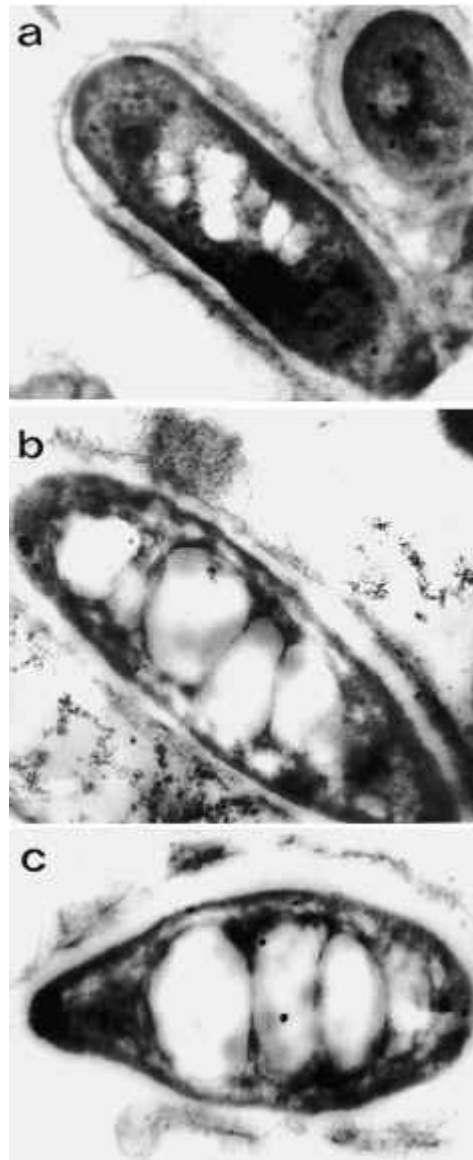


Figura 2.14: Microscopia de transmissão de elétrons (x 30.000) de células de *B. megaterium* em diferentes tempos de cultivo (Gouda et al., 2001).

MCCOOL et al. (1996), acompanharam o acúmulo de PHA em grânulos na *B. megaterium*, em diferentes estágios do crescimento em meio mínimo e meio rico pela análise dos grânulos em microscópio. Ambos meios apresentaram resultados similares. Células crescidas durante toda noite foram inoculadas e analisadas em diferentes estágios de crescimento. Foi verificado que durante a fase lag (adaptação) os corpos de inclusão diminuíam rapidamente em tamanho e número por células. Durante a fase de crescimento exponencial da célula, aumentou o volume relativo dos corpos de inclusão. Na fase estacionária as células pareciam estar totalmente cheias, portanto não houve aumento durante esta fase. Culturas mais velhas, isto é, mais tempo de cultivo na fase estacionária, mostraram consumo de PHA, diminuindo o tamanho e número de grânulos.

MACCOOL e CANNON (1999) monitoraram a quantidade de proteína PhaP dentro dos corpos de inclusão da *B. megaterium* durante o crescimento celular e verificaram que a

quantidade dessa proteína diminui durante a primeira metade da fase de adaptação (fase lag) da bactéria, aumenta no final da fase lag até a metade da fase de crescimento exponencial, decresce durante o final da fase exponencial e volta a crescer durante a fase estacionária. Este resultado sugere que os grânulos de PHA inclusos na célula são também fontes de aminoácidos além de serem fontes de carbono e energia. Cabe ressaltar que a PhaP encontrada na *B. megaterium* é diferente da PhaP (fasinas) encontrada em outras bactérias.

2.2.6 Produção de PHAs por *Bacillus*

Um dos fatores que afetam o custo de produção é o preço da fonte de carbono sendo necessário encontrar bactérias capazes de crescer em fontes mais baratas ou resíduos agroindustriais (GOUDA et al., 2001; BRAUNEGG, 2001; VALAPPIL et al., 2007).

A bactéria *B. megaterium* é capaz de crescer e acumular PHAs a partir de diversas fontes de carbono como frutose, glicose, xilose, lactose, sacarose, maltose, gluconato de sódio, melação de cana entre outras fontes (GOUDA et al., 2001; FULL et al., 2006).

GOUDA et al. (2001) testaram o crescimento de *B. megaterium* e produção de P(3HB) e outros PHAs em melação de cana de açúcar como fonte de carbono e rejeito de licor de milho como fonte de nitrogênio, buscando uma alternativa mais barata de matéria prima. No cultivo em biorreator com volume de 4L, obtiveram um acúmulo de 59,4% de P(3HB) nas células e atingiram 3,6 g/L de células. Os autores testaram também diversas fontes de nitrogênio e verificaram que o cloreto de amônio foi o que possibilitou um maior acúmulo, seguido pelo licor de milho e outros sais de amônio como o sulfato de amônio. Além disso testaram várias fontes de carbono, obtendo o maior rendimento em P(3HB) foi obtido com glicose seguido pelo melação de cana e outros açúcares como frutose e sacarose.

OMAR et al. (2001) cultivaram *B. megaterium* em estufa incubadora rotatória usando xarope de tâmaras e melação de beterraba como fonte de carbono, obtiveram um acúmulo de 52% e 50% de P(3HB) nas células, respectivamente. Verificaram também que o cloreto de amônio foi a fonte de nitrogênio que possibilitou maior acúmulo de biopolímero, seguida de acetato de amônio, nitrato de amônio e sulfato de amônio. Foi realizado também experimento em biorreator de 30L, utilizando meio mineral contendo 2% de xarope de tâmaras e 0,5% de cloreto de amônio. O resultado que eles obtiveram é mostrado na Figura 2.15. Segundo os autores, devido à falta de nitrogênio e provavelmente outros nutrientes, ocorreu esporulação levando ao consumo de P(3HB), obtendo menor acúmulo em relação ao experimento realizado em estufa incubadora rotatória. Além disso os autores verificaram que o acúmulo de P(3HB) na *B. megaterium* é associado ao crescimento celular.

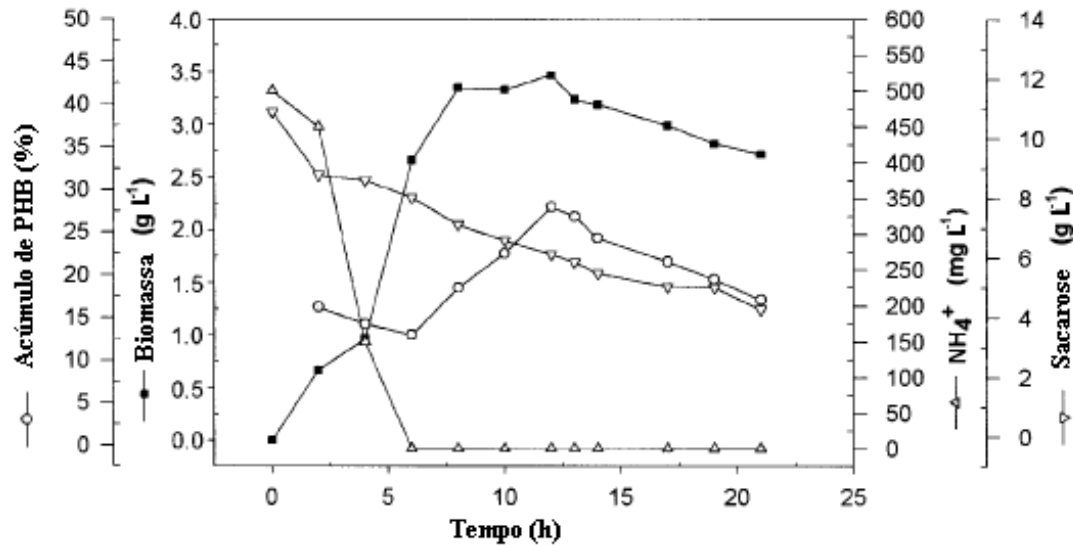


Figura 2.15: Cultivo batelada em biorreator de 30L da *B. megaterium* utilizando xarope de tâmaras e cloreto de amônia (OMAR et al., 2001).

MCCOOL et al. (1996) acompanharam o acúmulo de PHA em grânulos na *B. megaterium* em diferentes estágios do crescimento. Os resultados sugeriram que o crescimento no acúmulo de PHA foi maior que o crescimento, em peso seco, das células durante as fases de crescimento exponencial e estacionária, isto é, a taxa de acúmulo de polímero foi maior que a taxa de crescimento celular. Além disso, verificaram que a taxa de acúmulo de PHA durante a fase estacionária diminuiu em relação à taxa de acúmulo durante a fase de crescimento exponencial.

SLEPECKY e LAW (1961) verificaram as condições e a relação entre a produção de polímero e a formação de esporos em duas linhagens da bactéria *B. megaterium*, sendo uma linhagem formadora de esporos enquanto que a outra linhagem, *B. megaterium* KM, não esporula. Quando a linhagem que esporula é cultivada em meio que favorece a formação de polímero, pela adição de glicose e acetato ao meio, não há praticamente formação de esporo e a produção e utilização do biopolímero segue cinética similar da linhagem que não forma esporo, porém com rendimento menor. Em meio favorável à formação de esporos, menor quantidade de polímero é produzida e uma rápida utilização deste polímero precede a esporulação. No caso em que for utilizado meio favorável à formação de polímero combinada com uma condição de agitação vigorosa, ocorrerá produção e consumo de polímero com formação de esporo.

WU et al. (2001) isolaram de um solo contaminado com melão, uma linhagem produtora de PHAs. Esta foi identificada como do gênero *Bacillus*. Em seus experimentos eles verificaram que a produção de polímero é associada ao crescimento. Além disso, observaram que as técnicas normalmente utilizadas em linhagens produtoras para aumentar a produção de P(3HB), limitação de nitrogênio, fósforo e oxigênio, mostram um efeito inverso na *Bacillus* utilizada, pois estes procedimentos favorecem a formação de esporo. A energia requerida para a esporulação deverá vir da degradação do P(3HB) e da fonte de carbono e nutrientes do meio de cultura, sendo que o balanço da utilização destes decidirá a percentagem de acúmulo final de P(3HB) nas células.

VALAPPIL et al. (2007) reportam o efeito do pH em cultivos contendo *Bacillus cereus*. Valores baixos de pH, próximo a 5, inibem totalmente a utilização do polímero bem como a formação de esporos.

FULL et al. (2006) isolaram uma linhagem nova de *Bacillus*, denominada por eles CL1, semelhante à *B. megaterium*, e fizeram experimentos em estufa incubadora rotatória com diferentes fontes de carbono. A Tabela 2.5 mostra os resultados onde se pode observar que os autores obtiveram um alto rendimento de polímero chegando a 90% de polímero acumulado. Os autores também testaram o crescimento da *B. megaterium* ATCC 14581 em diferentes açúcares tais com: rafinose, sacarose, glicose, frutose, galactose, maltose, xilose e ribose, os resultados de acúmulo não foram mostrados. Mostraram que a *B. megaterium* é estritamente aeróbia enquanto que a bactéria encontrada por eles é capaz de crescer na ausência de oxigênio.

Tabela 2.5: Cultivo de *Bacillus* CL1 em substratos diferentes (FULL et al., 2006).

Fonte de carbono	Concentração	Biomassa (mg)	PHA (mg/mL)	PHA (%)
proteína de soja	0,2%	0,35	0,09	25,4
Rafinose	10 mmol·L ⁻¹	3,35	3,00	89,7
Glicose	30 mmol·L ⁻¹	3,42	3,12	90,9
Frutose	30 mmol·L ⁻¹	3,39	2,93	86,3
Sacarose	15 mmol·L ⁻¹	3,31	2,87	87,0
Lactose	30 mmol·L ⁻¹	3,28	2,68	81,7
Glicerol	30 mmol·L ⁻¹	2,70	1,41	52,1

ASLIM et al. (2002), isolaram bactérias capazes de produzir P(3HB) de diferentes solos, todas do gênero *Bacillus*, uma das linhagens da *B. megaterium* foi a que acumulou mais polímero chegando próximo a 50%.

Bactérias do gênero *Bacillus* também são capazes de acumular copolímeros, como mostra a Tabela 2.6

Tabela 2.6: Produção de PHAs por diferentes bactérias (VALAPPIL et al., 2007).

Bactéria (<i>Bacillus</i> spp.)	Acúmulo de PHA (%)	Unidades monoméricas	Fonte de carbono
<i>Bacillus</i> sp. JMa5	35	3HB ¹	Melaço
<i>B. circulans</i> DSM 1529	43,7	3HB	Acetato e 3-hidroxi- <i>butirato</i>
	6,80	3HB, 3HV ²	Propionato
<i>B. sphaericus</i>	30,2	3HB	Sacarose
<i>B. sphaericus</i> DSM 28	4,50	3HB, 3HV	Valerato
<i>B. brevis</i>	32,1	3HB	Sacarose
<i>B. licheniformis</i> DSM394	25,8	3HB	Acetato e 3-hidroxi- <i>butirato</i>
	6,20	3HB, 3HV	Propionato
<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7	17,0	3HB	Acetato e 3-hidroxi- <i>butirato</i>
	5,10	3HB, 3HV	Propionato
<i>B. laterosporus</i> DSM335	29,5	3HB	Acetato e 3-hidroxi- <i>butirato</i>
	5,00	3HB, 3HV	Propionato
<i>B. macerans</i> DSM7068	40,5	3HB	Acetato e 3-hidroxi- <i>butirato</i>
	4,70	3HB, 3HV	Propionato
<i>B. subtilis</i> DSM10	33,5	3HB	Acetato e 3-hidroxi- <i>butirato</i>
	6,60	3HB, 3HV	Valerato
<i>B. thuringiensis</i> DSM2046	47,6	3HB	Acetato e 3-hidroxi- <i>butirato</i>
	7,20	3HB, 3HV	Propionato
<i>B. mycoides</i> DSM 2048	44,7	3HB	Acetato e 3-hidroxi- <i>butirato</i>
	7,50	3HB, 3HV	Propionato
<i>B. mycoides</i> RLJB-107	69,4 ^a	3HB	Sacarose
<i>B. megaterium</i> DSM90	47,2	3HB	Acetato e 3-hidroxi- <i>butirato</i>
	8,20	3HB, 3HV	Propionato
<i>B. cereus</i> DSM31	41,4	3HB	Acetato e 3-hidroxi- <i>butirato</i>
	7,30	3HB, 3HV	Propionato
<i>B. cereus</i> UW85	8,90	3HB, 3HV, 6HHx ³	ϵ -caprolactana e Glicose
	18,8	3HB, 3HV	Valerato
	32,9	3HB, 3HHx ⁴	Hexanoato ou Glicose
	96,5	3HB, 4HB ⁵ , 3HHx	4-hidroxi- <i>butirato</i>
<i>Bacillus</i> sp. INT005	97,3	3HB, 3HHx, 6HHx	ϵ -caprolactana
	2,20	3HB, 3HHx	Hexanoato
<i>B. cereus</i> ATCC14579	ND ^b	3HB, 3HO ⁶	Octanoato

¹3-hidroxi-*butirato*; ²3-hidroxi-*valerato*; ³6-hidroxi-*hexanoato* ; ⁴3-hidroxi-*hexanoato*; ⁵4-hidroxi-*butirato* (4HB); ⁶3-hidroxi-*octanoato* (3HO)

^a PHA estimado por método que pode superestimar o valor acumulado.

^b não detectado

2.2.7 Extração de biopolímero de PHAs

Os PHAs, como mencionado anteriormente, são obtidos em corpos de inclusão dentro das células e para poder utilizá-los se faz necessário uma metodologia para separar este polímero da célula.

Primeiro é necessário separar as células do meio de cultura, para isso são utilizados métodos como centrifugação, filtração ou floculação. O próximo passo é a recuperação do polímero de dentro das células, onde se pode escolher basicamente entre duas metodologias: extração do polímero com solventes orgânicos ou digestão da célula dissolvendo somente o que não for polímero (LEE, 1996a; ZINN et al., 2001).

A extração utilizando solventes orgânicos é feita mediante solubilização do polímero contido nas células e posterior recuperação por precipitação em metanol ou etanol. As células concentradas devem ser secas em liofilizador ou em spray-dryer. Os solventes comumente empregados são clorofórmio, diclorometano, propileno carbonato, dicloroetano entre outros. Devido à grande viscosidade, mesmo para soluções diluídas de PHA, é necessário o emprego de grandes quantidades de solvente (LEE, 1996a; ZINN et al., 2001).

Em TERADA e MARCHESSAULT (1999) pode-se encontrar os parâmetros de solubilidade do P(3HB) em diversos solventes. Em todos os casos os parâmetros são válidos para o polímero na forma amorfa. Segundo os autores a estrutura cristalina torna o P(3HB) inacessível aos solventes, o que pode tornar o polímero insolúvel a esses solventes na temperatura ambiente.

RAMSAY et al. (1994) mostraram que o tempo de contato com solventes clorados e a temperatura dos mesmos afetam a massa molar do polímero obtido, mostrando que pode ocorrer degradação.

No caso da digestão das células, solubilizando a parte não-polímero, podem se aplicar hidrólise ácidas, hipoclorito alcalinos ou coquetéis de enzimas e detergentes aniônicos (DAWES e SENIOR, 1973; LEE, 1996a; ZINN et al., 2001).

Bactérias contendo biopolímeros tratadas com hipocloritos alcalinos ou hidrólises ácidas recuperam um polímero com ponto de fusão menor que aqueles onde as células são liofilizadas e se utiliza um solvente neutro diretamente para fazer a extração (DAWES e SENIOR, 1973), mostrando a degradação do biopolímero durante a extração por digestão.

HOLMES e LIM (1990) desenvolveram um processo para recuperação de polímero utilizando tratamento térmico, coquetel de enzimas e detergente aniônicos para digestão da célula. Este método possui a vantagem de não causar degradação do biopolímero durante a extração, porém envolve várias etapas tornando a separação muito demorada e, além disso, o uso de enzima torna mais caro o processo devido ao seu alto custo.

HORI et al. (2002) modificaram geneticamente a bactéria *B. megaterium*. Esta rompe sua membrana citoplasmática e libera o polímero para o meio externo quando detecta uma quantidade baixa específica de açúcar.

2.3 Modelos de Crescimento Microbiano

Foram encontrados três modelos distintos, não estruturados, na literatura para a predição do crescimento microbiano: biomassa total (X_T) e biomassa residual (X_R), produção de P(3HB) (P), Consumo da fonte de carbono, açúcar (S), e consumo de nitrogênio (N).

O modelo não estruturado utiliza balanços de massa e cinética de crescimento microbiano, consumo de substrato, formação de produtos, mas sem utilizar metabólitos internos da célula. É um tipo de modelo simplificado e eficiente para casos onde não se tem interesse em metabólitos.

O modelo descrito a seguir é o modelo de Mulchadani (apud KHANNA e SRIVASTAVA, 2005a). Neste modelo a biomassa total (X_T) é formada por dois componentes: um componente cataliticamente ativo, composto por proteínas e ácidos nucleicos, chamado de biomassa residual (X_R) e o P(3HB) que é o componente inerte (P), conforme mostra a Equação 2.1.

$$X_T = X_R + P \quad (2.1)$$

A biomassa residual é representada pela Equação 2.2, onde a taxa de crescimento específico (μ) é dada pelo modelo de Monod multiplicado por um termo que representa a inibição por substrato, representada pela Equação 2.3. O fator limitante considerado é a razão nitrogênio fonte de carbono (N/S).

$$\frac{dX_R}{dt} = \mu \cdot X_R \quad (2.2)$$

$$\mu = \left(\mu_m \cdot \frac{(N/S)}{K_S + (N/S)} \right) \cdot \left(1 - \left(\frac{(N/S)}{NS_M} \right)^n \right) \quad (2.3)$$

onde μ_m é a taxa de crescimento máxima específica, K_S é a constante de saturação do substrato limitante, NS_M é o máximo valor para a razão nitrogênio/fonte de carbono, onde a taxa de crescimento específico torna-se zero e n é um expoente do termo de inibição

A produção de P(3HB) é representada pela Equação 2.4, equação de Luedeking e Piret para formação de produto, composta por dois termos um associado e outro não associado ao crescimento microbiano no qual k_1 e k_2 são as constantes dos termos, respectivamente.

$$\frac{dP}{dt} = k_1 \cdot \mu \cdot X_R + k_2 \cdot X_R \quad (2.4)$$

O consumo do açúcar, fonte de carbono, é dado pela Equação 2.5, que considera que esse substrato é utilizado na produção da biomassa residual, produção do biopolímero e na manutenção celular.

$$\frac{dS}{dt} = - \left(k_7 \cdot \frac{dX_R}{dt} + k_8 \cdot \frac{dP}{dt} + k_6 \cdot X_R \right) \quad (2.5)$$

onde k_7 é a constante do termo de consumo de açúcar devido ao crescimento celular, k_8 a constante do termo de consumo de açúcar devido a formação do polímero e k_6 constante do termo de consumo de açúcar devido a manutenção celular. Rearranjando os termos obtém-se a Equação 2.6, onde se observa que são necessários apenas dois parâmetros para descrever esta equação, ou seja: $\alpha = k_7 + k_1 \cdot k_8$ e $\gamma = k_2 \cdot k_8 + k_6$, apesar dos autores terem estimados todos os parâmetros das Equações 2.4 e 2.5 separadamente.

$$\frac{dS}{dt} = - \left[(k_7 + k_1 \cdot k_8) \cdot \mu \cdot X_R + (k_2 \cdot k_8 + k_6) \cdot X_R \right] \quad (2.6)$$

O consumo de nitrogênio é dado pela Equação 2.7, onde é considerado que o nitrogênio é utilizado somente para produção de biomassa residual.

$$\frac{dN}{dt} = -k_3 \cdot \mu \cdot X_R \quad (2.7)$$

onde k_3 é a constante do termo relacionado com o consumo de nitrogênio para produção celular.

O modelo de MULCHADANI possui 10 parâmetros para serem estimados com dados experimentais.

Outro modelo foi proposto em RAJE e SRIVASTAVA (1998), este foi desenvolvido para o cultivo batelada da bactéria *R. eutropha* com frutose como fonte de carbono e sulfato de amônio (fonte de nitrogênio) como substrato limitante. Os autores propuseram um modelo baseado no modelo proposto por Mulchadani (apud PATWARDHAN e SRIVASTAVA, 2004) descrito acima, e observações do trabalho de Heinzle e Laffarty (apud RAJE e SRIVASTAVA, 1998).

Neste modelo foi considerado que somente o nitrogênio (N) é o substrato limitante que afeta as cinéticas de crescimento e conta com 16 parâmetros a serem estimados. A produção de biomassa total também é dada pela soma da biomassa residual e polímero formado conforme Equação 2.1 e a biomassa residual é representada pela Equação 2.2. Porém, neste modelo a taxa de crescimento específico (μ) é formada pelas cinéticas de crescimento de Monod e sigmoidal como mostra a Equação 2.8, onde somente a concentração de nitrogênio é

utilizada, e conta com termo responsável pela inibição por substrato, ou seja, a razão nitrogênio/fonte de carbono.

$$\mu = \left(\mu_1 \cdot \frac{N}{K_{S1} + N} + \mu_2 \cdot \frac{\left(\frac{N}{K_{S2}}\right)^m}{1 + \left(\frac{N}{K_{S2}}\right)^m} \right) \cdot \left(1 - \left(\frac{N/S}{NS_M}\right)^n \right) \quad (2.8)$$

onde μ_1 e μ_2 são as taxas de crescimento referentes aos modelos de Monod e sigmoidal, respectivamente. K_{S1} e K_{S2} são constantes do modelo, n e m expoentes do modelo e NS_M é a máxima razão nitrogênio/carbono na qual a taxa de crescimento específico torna-se zero.

A produção de P(3HB) é mostrada pela Equação 2.9, que considera a produção associada e não associada ao crescimento. O termo não associado ao crescimento considera a inibição pelo produto e a contribuição da produção quando a concentração de nitrogênio é baixa. Quando a concentração de nitrogênio é alta a contribuição é dada pelo termo associado ao crescimento.

$$\frac{dP}{dt} = (k_4 \cdot (X_R - X_{Rmin}) - k_5 \cdot P) \cdot \frac{K_{PS}}{K_{PS} + N} + k_0 \frac{dX_R}{dt} \quad (2.9)$$

onde k_4 é a constante do termo não associado ao crescimento, X_{Rmin} é o mínimo valor de X_R logo após o início da produção de P(3HB), k_5 é a constante do termo não associado ao crescimento referente a inibição pelo produto, k_0 é a constante do termo associado ao crescimento e K_{PS} é uma constante.

O consumo de açúcar e o consumo de nitrogênio são dados pelas mesmas equações propostas no modelo de Mulchadani, Equações 2.5 e 2.7, respectivamente.

PATWARDHAN e SRIVASTAVA (2004) estenderam este modelo para cultivo em batelada alimentada pela incorporação de fatores de diluição.

KHANNA e SRIVASTAVA (2005a) desenvolveram um modelo também para a produção em batelada de P(3HB) pela bactéria *R. eutropha* crescendo com frutose como fonte de carbono e uréia como fonte de nitrogênio. Este modelo é semelhante ao modelo de RAJE e SRIVASTAVA (1998). Neste modelo é necessária a estimação de 15 parâmetros. Do mesmo modo que os modelos anteriores, a biomassa total é composta pela biomassa residual mais polímero (Equação 2.1) e a biomassa residual representada pela Equação 2.2. Porém, o nitrogênio e a fonte de carbono são considerados substratos limitantes separadamente e a taxa de crescimento específico (μ) é expressa pela relação sigmoidal e é função da concentração dos dois substratos limitantes (nitrogênio e fonte de carbono) como mostra a Equação 2.10. Os termos de inibição por substrato são considerados também separadamente ao contrário dos modelos anteriores.

$$\mu = \mu_m \left[\frac{(S)^{n_S}}{(K_{SS})^{n_S} + (S)^{n_S}} \right] \cdot \left[\frac{(N)^{n_N}}{(K_{NS})^{n_N} + (N)^{n_N}} \right] \cdot \left[1 - \left(\frac{S}{S_m} \right)^{e_S} \right] \cdot \left[1 - \left(\frac{N}{N_m} \right)^{e_N} \right] \quad (2.10)$$

onde μ_m é a taxa de crescimento máxima, K_{SS} e K_{SN} são constantes para os substratos limitantes: fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente. S_m e N_m são as concentrações máximas de fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente, na qual a taxa de crescimento específico torna-se zero. n_S , n_N , e_S e e_N são expoentes do modelo.

A equação que descreve a formação do polímero segue o modelo de Luedeking e Piret, a mesma utilizada no modelo de Mulchadani (Equação 2.4).

O consumo de açúcar é devido à formação da biomassa residual, produção do polímero e manutenção da biomassa existente, conforme pode ser visto na Equação 2.11, novamente a mesma forma de equação utilizada nos outros modelos.

$$\frac{dS}{dt} = - \left(\frac{1}{Y_{RS}} \cdot \frac{dX_R}{dt} + \frac{1}{Y_{PS}} \cdot \frac{dP}{dt} + m_S \cdot X_R \right) \quad (2.11)$$

onde Y_{RS} é o rendimento da biomassa residual em relação à fonte de carbono, o Y_{PS} é o rendimento de polímero em relação à fonte de carbono e m_S representa o coeficiente do termo referente a utilização de açúcar para a manutenção celular. Rearranjando os termos chega-se a Equação 2.12.

$$\frac{dS}{dt} = - \left(\left(\frac{1}{Y_{RS}} + \frac{k_1}{Y_{PS}} \right) \cdot \frac{dX_R}{dt} + \left(\frac{k_2}{Y_{PS}} + m_S \right) \cdot X_R \right) \quad (2.12)$$

Substituído os termos entre parêntesis pelas constantes α e γ , definidas anteriormente, tem-se a equação na sua forma final, representada pela Equação 2.13. Diferentemente do trabalho de Mulchadani, os autores utilizaram esta equação para a estimação dos parâmetros α e γ ,

$$\frac{dS}{dt} = -(\alpha \cdot \mu + \gamma) \cdot X_R \quad (2.13)$$

onde

$$\alpha = \frac{1}{Y_{RS}} + \frac{k_1}{Y_{PS}} \quad \text{e} \quad \gamma = \frac{k_2}{Y_{PS}} + m_S.$$

O consumo de nitrogênio é devido à formação da biomassa residual e manutenção da biomassa existente conforme pode ser visto na Equação 2.14.

$$\frac{dN}{dt} = - \left(\frac{\mu}{Y_{RN}} + m_N \right) \cdot X_R \quad (2.14)$$

onde Y_{RN} é o rendimento da biomassa residual em relação a fonte de nitrogênio e m_N representa o coeficiente de utilização de nitrogênio para a manutenção celular.

Em KHANNA e SRIVASTAVA (2005b) o modelo foi estendido para batelada alimentada, também pela introdução de termos de diluição.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Microrganismo

Inicialmente trabalhou-se com uma bactéria obtida na FIOCRUZ, cuja identificação é mostrada no Capítulo 4. Foram feitos testes em diferentes meios de cultivos para verificar o crescimento celular e a produção de P(3HB) por esta bactéria. Em todos os meios houve crescimento celular, contudo não houve produção satisfatória de polímero (menos que 3% de acúmulo). Dessa forma iniciamos novamente o trabalho com outra bactéria.

A bactéria utilizada para produção de poli(3-hidroxi-butirato) foi cedida pelo Laboratório de Bioprocessos da COPPE/UFRJ. Esta foi identificada como *Bacillus megaterium* que é reconhecidamente produtora de P(3HB).

Os dois microrganismos utilizados foram identificados utilizando seqüenciamento e análise de árvore filogenética de fragmentos de DNAr 16S realizado pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CQPBA) da UNICAMP.

A bactéria foi armazenada congelada no meio de cultura com 20% de glicerol, crioprotetor, que tem a função de proteger as células para não romper durante o congelamento.

Em todos os experimentos realizados, as células foram observadas em microscópio com contraste de fase utilizando uma lente de aumento de 1000x. Na Figura 3.1 pode-se observar uma fotografia da bactéria obtida com câmera digital com zoom de 4x direto na lente do microscópio. Esta fotografia corresponde a uma amostra tirada do experimento em biorreator com 7 horas de cultivo de *Bacillus megaterium*, os pontos brancos dentro das células podem ser polímero ou esporo, não sendo possível diferenciá-los somente pela fotografia.

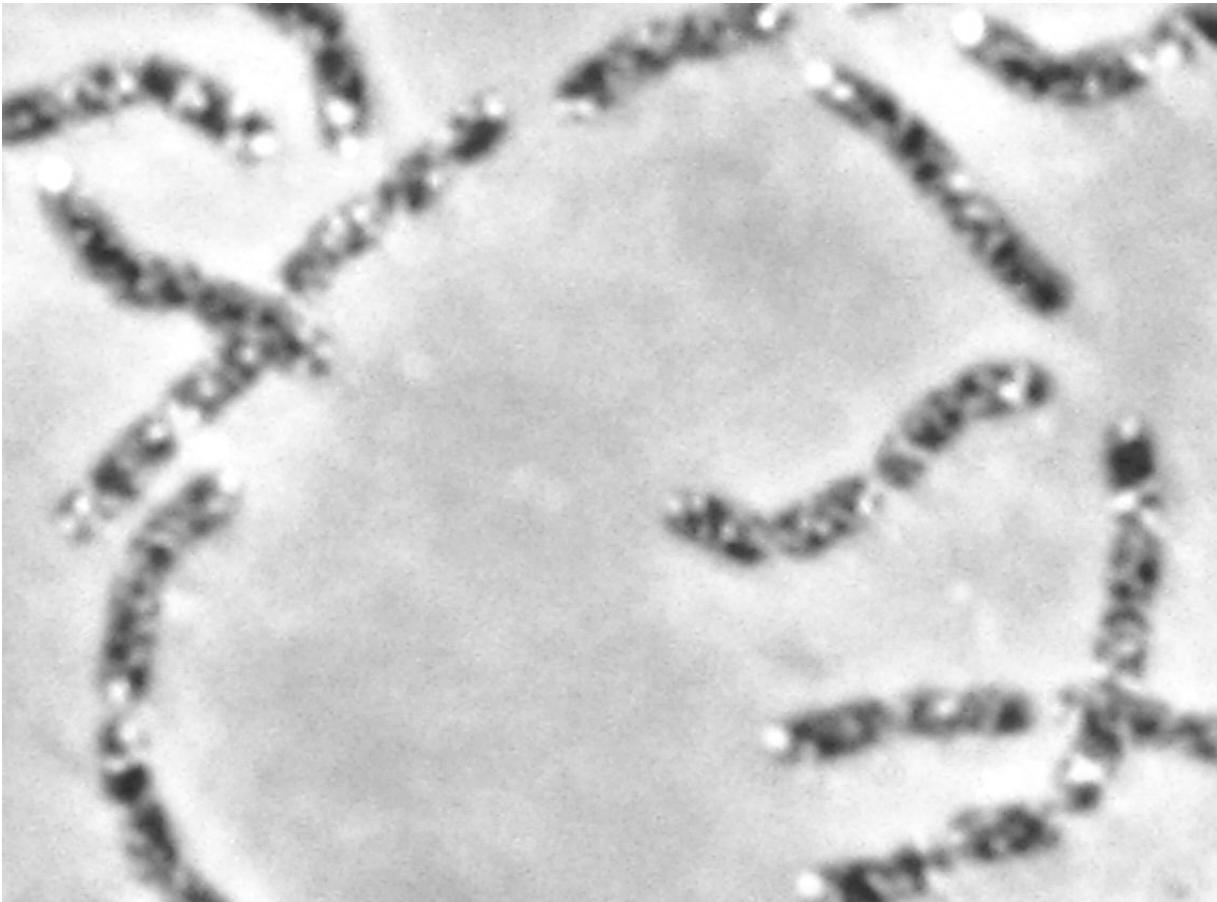


Figura 3.1: Fotografia da *Bacillus megaterium* contendo biopolímero e ou esporos (4000x).

3.2 Meio de Cultura

O meio de cultivo empregado nos experimentos foi o meio mineral sugerido por WANG e LEE (1997). O meio é preparado conforme as composições mostradas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Meio mineral utilizado nos cultivos.

Componente	Composição (g L ⁻¹)
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,008
Na ₂ HPO ₄	3,6
KH ₂ PO ₄	1,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,05
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01
Ácido Cítrico	0,1

Adiciona-se a esse meio, 1 mL de solução de micronutrientes a cada litro de meio mineral. A composição da solução de micronutrientes é mostrada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Solução de micronutrientes.

Componente	Composição (mg L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	300
CoCl ₂ .6H ₂ O	200
ZnSO ₄ .7H ₂ O	30
MnCl ₂ .4H ₂ O	30
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	30
NiSO ₄ .7H ₂ O	30
CuSO ₄ .5H ₂ O	10

A fonte de carbono utilizada foi a sacarose e a fonte de nitrogênio foi sulfato de amônio. Nos experimentos em estufa incubadora rotatória as concentrações de sacarose e sulfato de amônio variaram respectivamente entre 10-50 g L⁻¹ e 0,67-6 g L⁻¹ conforme o planejamento experimental realizado. No caso dos cultivos em biorreator, a concentração de sacarose e sulfato de amônio foram respectivamente, 16 g L⁻¹ e 2 g L⁻¹, escolhidas conforme o resultado dos experimentos do planejamento. Em todos os casos o pH inicial é ajustado para 7.

3.3 Experimentos em Estufa Incubadora Rotatória

A reativação da bactéria foi realizada em cultivo em frasco cônico contendo meio mineral com 30 g/L de sacarose e 5 g/L de sulfato de amônio em estufa incubadora rotatória, 160 rpm e temperatura de 30°C, por um período de 18 horas (pré-inóculo). Após este período, foram adicionados 5% deste pré-inóculo em outro frasco contendo o mesmo meio (inóculo), nas mesmas condições de agitação e temperatura. Aproximadamente 5 horas depois, no início da fase de crescimento exponencial, alíquotas de 5% do inóculo foram transferidas para diversos frascos cônicos, com diferentes concentrações de sacarose e sulfato de amônio, conforme o planejamento de experimentos realizado em estufa incubadora rotatória nas mesmas condições de agitação e temperatura do inóculo e pré-inóculo. Este procedimento está exemplificado na Figura 3.2.

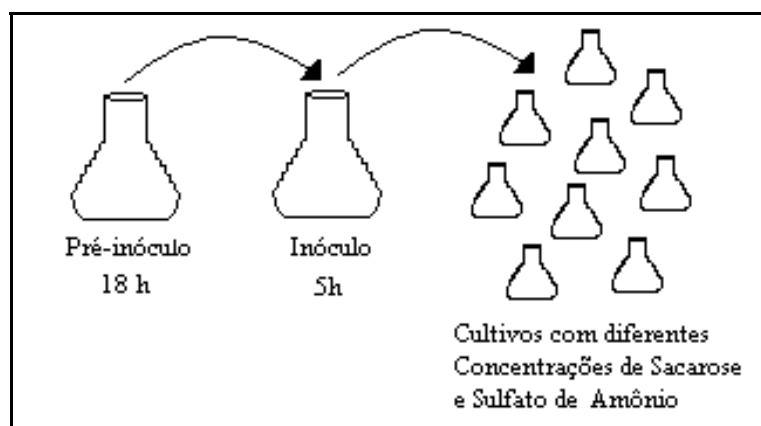


Figura 3.2: Desenho esquemático do procedimento de inóculo.

Para a realização dos experimentos, as soluções foram preparadas, colocadas em frascos cônicos limpos e então esterilizadas em autoclave por 15 minutos na temperatura de 121°C.

3.3.1 Planejamento de experimentos

A fim de se determinar a concentração inicial ótima de sacarose (S), bem como a razão carbono/nitrogênio ($C:N$) inicial para maior crescimento, foi realizado um planejamento fatorial 2^2 composto, com três repetições no ponto central, conforme a Tabela 3.3, no qual as variáveis independentes foram: razão carbono/nitrogênio e concentração de sacarose. As variáveis dependentes foram a concentração de biomassa, porcentagem de P(3HB) acumulado e sacarose residual no meio de cultivo. Na tabela, também é mostrada a concentração de sulfato de amônio (FN) inicial de forma a manter a razão carbono/nitrogênio proposta. O tempo de cultivo para cada conjunto de experimento foi de 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas.

Tabela 3.3: Planejamento de experimentos de cultivos realizado.

EXP	$X_1 (S)$	$X_2 (C:N)$	$S (g/L)$	$C:N$	$FN (g/L)$
1	1	1	44	22	2,00
2	1	-1	44	8	5,50
3	-1	1	16	22	0,73
4	-1	-1	16	8	2,00
5	0	$-\sqrt{2}$	30	5	6,00
6	0	$\sqrt{2}$	30	25	1,20
7	$-\sqrt{2}$	0	10	15	0,67
8	$\sqrt{2}$	0	50	15	3,33
9a	0	0	30	15	2,00
9b	0	0	30	15	2,00
9c	0	0	30	15	2,00

As variáveis codificadas referentes, respectivamente, a sacarose e a razão carbono/nitrogênio são mostradas nas Equações 3.1 e 3.2.

$$X_1 = \frac{S - 30}{14} \quad (3.1)$$

$$X_2 = \frac{C : N - 15}{7} \quad (3.2)$$

Para a análise dos resultados do planejamento experimental, utilizou-se o software STATISTICA versão 7.0.

3.4 Experimentos em Biorreator

Para realização dos cultivos em escala maior, utilizou-se um biorreator experimental. Este consiste em um vaso de vidro com capacidade de quatro litros, acoplado a um sistema de controle digital integrado, sendo possível o controle de algumas variáveis de processo, tais como temperatura, agitação, pH e pO₂. Este sistema permite, também, estipular uma determinada aeração, mas esta não pode ser controlada automaticamente. O equipamento é fabricado pela B. Braun Biotech International Co., Alemanha, e é vendido com o nome comercial BIOSTAT[®] B. O sistema pode ser observado na Figura 3.3.

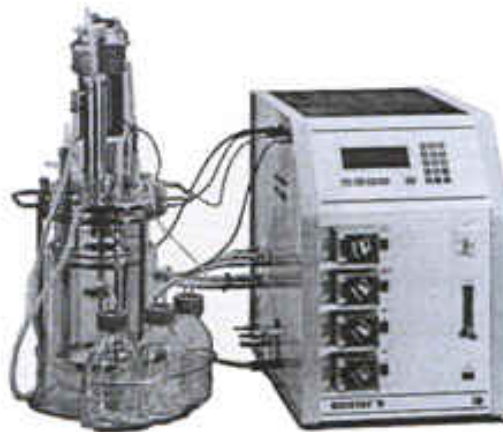


Figura 3.3: Biorreator experimental utilizado.

Este sistema opera conectado a um computador remoto capaz de receber sinais da planta e enviar comandos para a mesma usando como interface o software MATLAB, responsável pela aquisição de dados, monitoramento e controle. Está programada aquisição automática de dados a cada 5 segundos de cultivo. Nos gráficos foram apresentados dados a cada 5 minutos sem que se perdesse nenhum detalhe e nas tabelas do Apêndice B os dados adquiridos pelo MATLAB são apresentados a cada 30 minutos, com ampliação de dados a cada 10 minutos na região onde ocorrem mudanças significativas.

Para esterilizar o sistema, primeiramente autoclava-se o biorreator fechado com água destilada por 30 minutos na temperatura de 121°C. Depois descarta-se a água e coloca-se o meio de cultura a ser utilizado, fecha-se todo o sistema e autoclava-se por 20 minutos. O sistema permanece fechado até o momento de adição do inóculo, onde passa a se injetar ar estéril.

Do mesmo modo que foi feito nos experimentos em estufa incubadora rotatória, a bactéria antes de ser inoculada no biorreator é reativada em estufa incubadora rotatória por 18 horas. É então, transferida para outro frasco (inóculo) por 5 horas para atingir-se o crescimento exponencial antes de transferir o inóculo para o biorreator. Estes procedimentos de inóculo foram realizados nas mesmas condições de temperatura e agitação dos cultivos do planejamento. As concentrações no pré-inóculo, no inóculo e no biorreator foram de 16 g/L para a sacarose e de 2g/L de sulfato de amônio.

No experimento em biorreator o pH foi mantido igual a 7, utilizando-se a base NaOH 2M e o ácido H₃PO₄ 2M para a correção. A temperatura foi mantida constante em 30°C, a aeração utilizada foi de 4 L/min e o percentual de oxigênio dissolvido (pO₂) foi controlado pela variação na velocidade de agitação a fim de manter o valor de pO₂ maior que 40%. O cultivo em biorreator teve duração de 24 horas, sendo coletada amostra a cada hora.

3.4.1 Determinação de variáveis do biorreator

Para escolher o intervalo da velocidade de agitação e vazão de aeração no biorreator realizaram-se experimentos, segundo planejamento fatorial 2² (Tabela 3.4), composto com três repetições no ponto central, para determinação da influência da velocidade de agitação e a vazão de aeração no coeficiente de transferência de massa (k_{La}).

Tabela 3.4: Planejamento de experimentos para determinação do k_{La} .

EXP	X ₃	X ₄	Agitação (rpm)	Aeração (L/min)	Aeração (vvm)
1	1	1	700	7,2	1,8
2	1	-1	700	2,8	0,7
3	-1	1	300	7,2	1,8
4	-1	-1	300	2,8	0,7
5	0	$-\sqrt{2}$	500	1,88	0,5
6	0	$\sqrt{2}$	500	8,11	2
7	$-\sqrt{2}$	0	217	5,0	1,25
8	$\sqrt{2}$	0	782	5,0	1,25
9a	0	0	500	5,0	1,25
9b	0	0	500	5,0	1,25
9c	0	0	500	5,0	1,25

As variáveis codificadas referentes, respectivamente, a agitação (AG), medida em rpm, e aeração (AE), medida em L/min são mostradas nas Equações 3.3 e 3.4.

$$X_3 = \frac{AG - 500}{200} \quad (3.3)$$

$$X_4 = \frac{AE - 5}{2,2} \quad (3.4)$$

Os experimentos foram realizados em meio mineral sem células na temperatura de 30°C. Para cada experimento, conforme especificação da aeração e rotação media-se o oxigênio dissolvido ao longo do tempo pela injeção de ar partindo-se de 0%, mediante injeção de nitrogênio, até atingir a saturação.

Considerando a equação de balanço de oxigênio conforme Equação 3.5:

$$\frac{dOx}{dt} = k_L a \cdot (Ox_{sat} - Ox) \quad (3.5)$$

onde Ox_{sat} é a concentração de saturação do oxigênio na fase líquida, função da temperatura e pressão.

Integrando-se a Equação 3.5 do tempo $t = 0$ até $t = t$, obtém-se a Equação 3.6:

$$\ln \left(\frac{Ox_{sat} - Ox(t)}{Ox_{sat} - Ox_0} \right) = k_L a \cdot t \quad (3.6)$$

Fazendo-se uma regressão linear nos valores obtidos experimentalmente, de acordo com a Equação 3.6, obtém-se como coeficiente angular o valor do $k_L a$.

Para a análise dos resultados do planejamento experimental, utilizou-se o software STATISTICA versão 7.0.

3.5 Métodos Analíticos

3.5.1 Determinação de biomassa

A determinação da biomassa total é feita por medidas gravimétricas (massa seca). Amostras em duplicata (10-30 mL) são coletadas dos cultivos, centrifugadas à 3500 rpm, lavadas e colocadas em estufa à vácuo a 80 °C até atingirem peso constante. Tendo-se medido previamente a massa de cada frasco vazio, o valor de biomassa total é correspondente ao valor

pesado menos o valor do frasco vazio, considerando o volume coletado. Como o biopolímero é acumulado internamente, a biomassa residual é calculada diminuindo-se da biomassa total a quantidade de polímero obtida.

3.5.2 Determinação de poli(3-hidroxi-butirato)

A quantidade de P(3HB) é obtida através do método de propanólise, segundo RIIS e MAI (1988). Coloca-se aproximadamente 40 mg de células secas em um frasco, adicionam-se 2 mL de 1,2-dicloroetano, 2 mL de n-propanol acidificado (4 partes de n-propanol para 1 parte de ácido clorídrico) e 2 μ L de solução de padrão interno, composto por 2 g de ácido benzóico em 50 mL de n-propanol. O frasco, hermeticamente fechado, é deixado em banho a 100 °C por duas horas com agitação intermitente. Posteriormente, ele é resfriado até atingir a temperatura ambiente e é adicionado 4 mL de água destilada. Da fase orgânica resultante é obtido o cromatograma. É necessário construir uma curva de calibração, correlacionando-se as áreas de massas conhecidas de P(3HB) padrão (Sigma-Aldrich), com a área do padrão interno. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso Shimadzu 14B, com detector de ionização de chama. A coluna utilizada foi uma Carbowax 60 m x 0,25 mm. Uma curva padrão é mostrada na Figura 3.4, onde pode-se observar a equação da reta e o valor do R^2 .

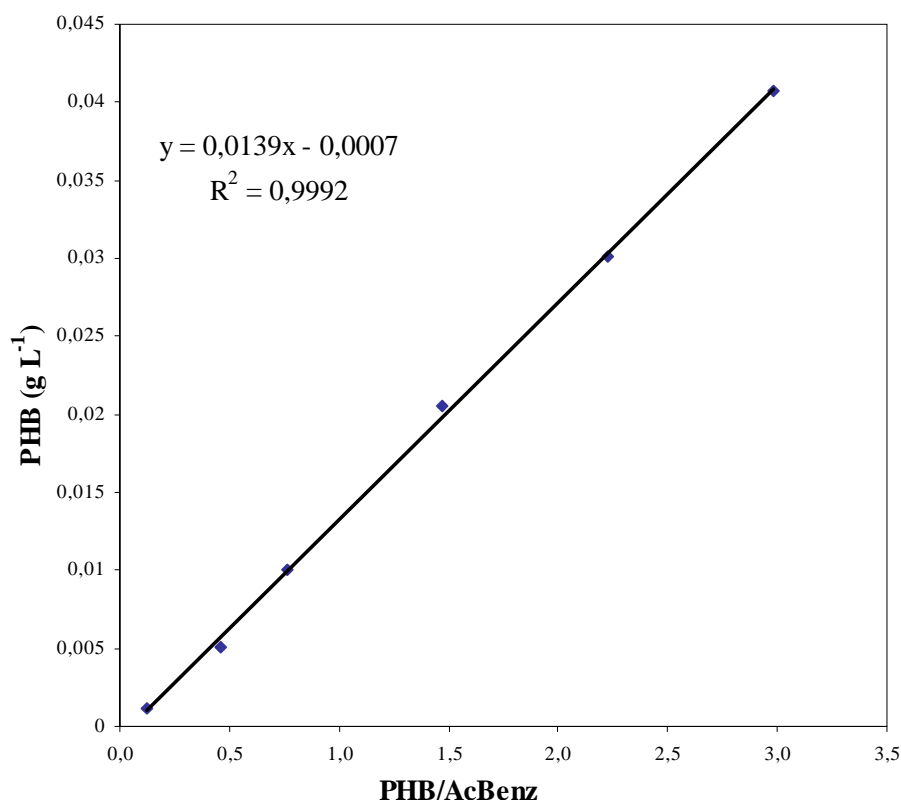


Figura 3.4: Curva de calibração para determinação da quantidade de P(3HB).

Para cada experimento, uma curva de calibração foi feita para diminuir os erros devido às variações na temperatura do banho. Com o valor obtido em gramas de polímero e células totais, obtém-se a percentagem de polímero acumulado na célula sendo calculado pela Equação 3.7.

$$\%PHB = \frac{PHB}{X_R} \cdot 100 \quad (3.7)$$

3.5.3 Determinação de sacarose

A análise de sacarose foi feita pelo método Fenol-Ácido Sulfúrico. Segundo Dubois et al. (1956), açúcares, oligossacarídeos e polissacarídeos ao reagirem com ácido sulfúrico concentrado e fenol, originam um composto alaranjado. Adotou-se o seguinte procedimento: adicionam-se 500 μL de amostra previamente diluída, 500 μL de solução de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e esperam-se 30 minutos para realizar as leituras no espectrofotômetro a 490 nm. A curva de calibração é mostrada na Figura 3.5, onde pode-se observar também a equação da reta e o valor do R^2 na faixa de concentração de trabalho.

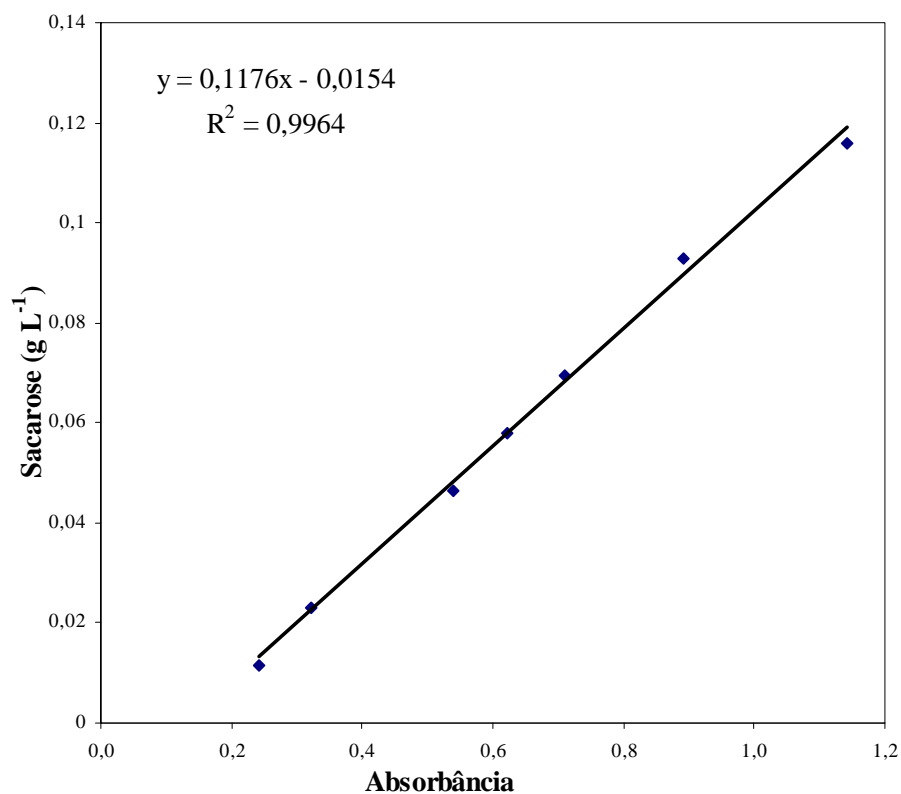


Figura 3.5: Curva de calibração para determinação de sacarose.

A sacarose também foi analisada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), Perkin Elmer série 200, coluna Rezex-RHM 300 mm x 7,8 mm, utilizando, como fase móvel, água padrão HPLC, à temperatura de 80 °C e vazão de 0,6 mL/min. O HPLC é acoplado a um computador com o software TotalChrom 3.0 o qual realiza a integração das áreas ou altura dos picos. A coluna utilizada hidrolisa a sacarose em glicose e frutose. A Figura 3.6 mostra os picos obtidos na injeção de uma solução padrão contendo 3 g/L de sacarose, os picos de glicose e frutose tem os tempos de retenção iguais a 9,8 e 10,5 min, respectivamente. O valor da sacarose é obtido pela soma da glicose mais frutose.

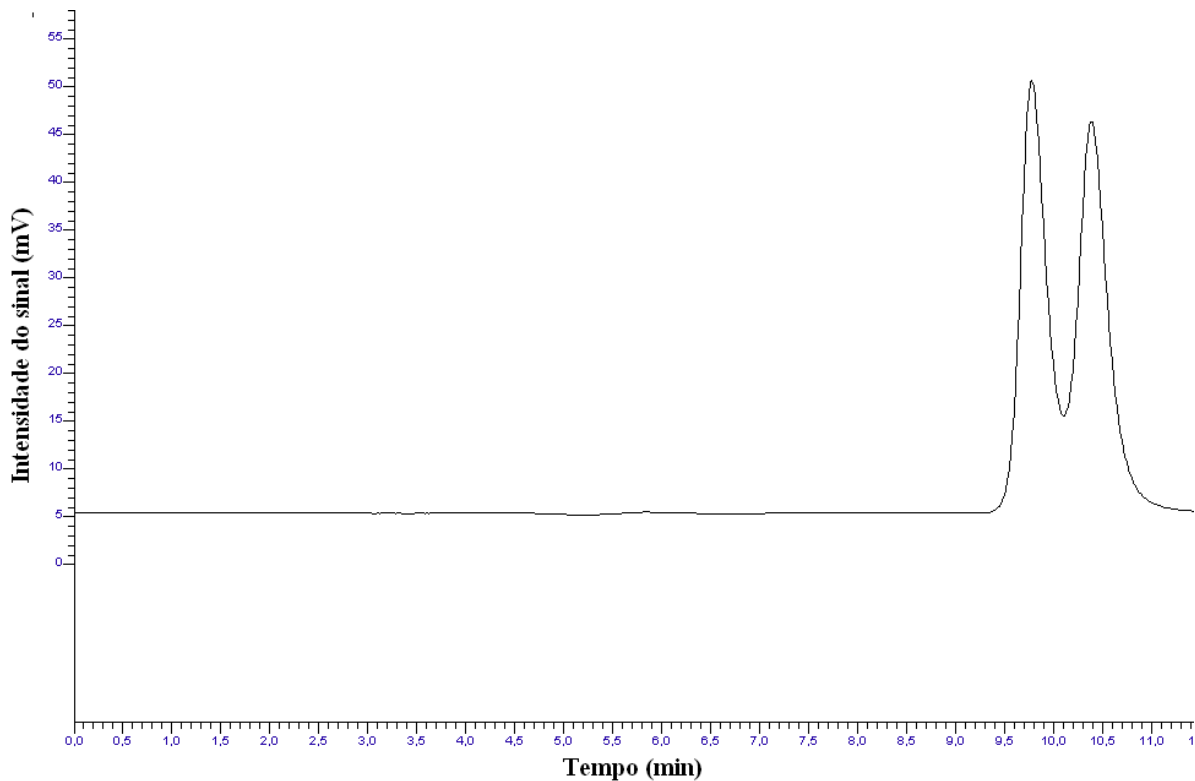


Figura 3.6: Cromatograma da sacarose obtido no HPLC.

A Figura 3.7 e Figura 3.8 mostram as curvas padrões da glicose e da frutose respectivamente.

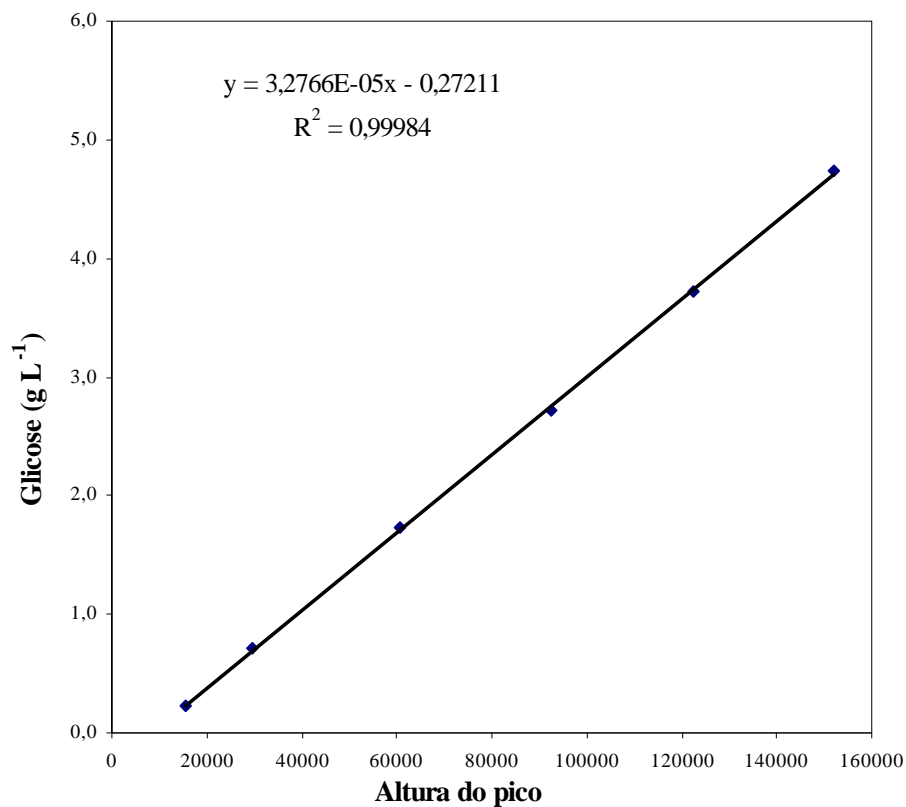


Figura 3.7: Curva padrão de glicose.

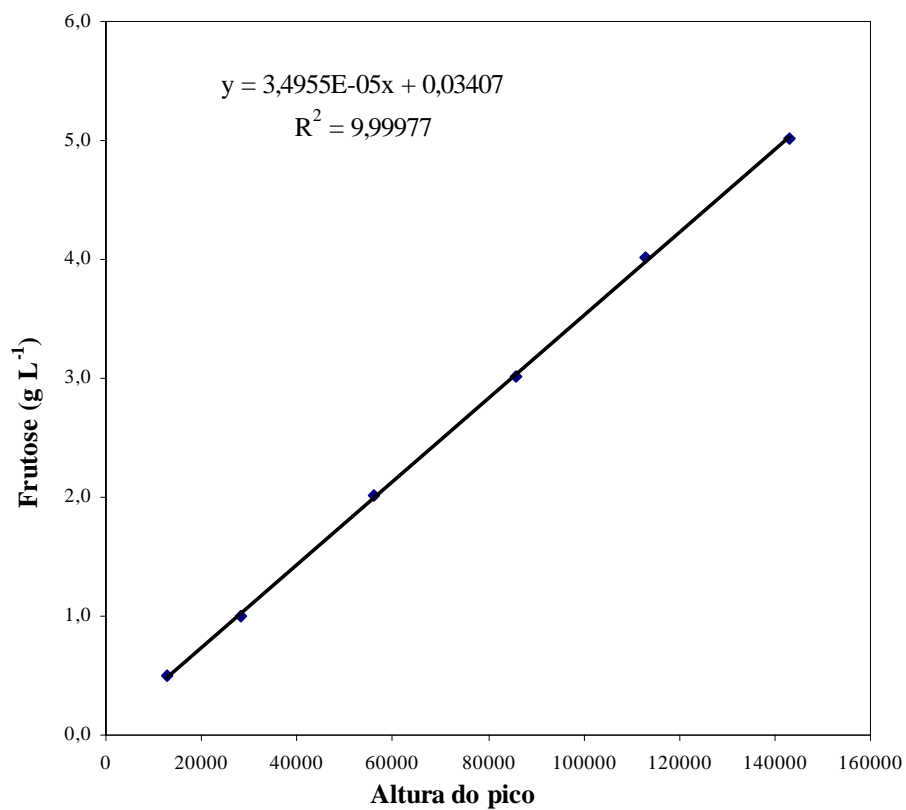


Figura 3.8: Curva padrão de frutose.

3.5.4 Determinação de nitrogênio

O nitrogênio foi analisado pelo método indofenol (Weatherburn, 1967), o qual se baseia na formação de uma coloração azul, reação de Berthelot, resultante da reação do íon amônia com hipoclorito de sódio e compostos fenólicos na presença de nitroprussiato de sódio, que é o catalisador. Para a análise utiliza-se 100 μ L de amostra previamente diluída. Adicionam-se 5 mL de reagente A (5 g de fenol e 25 mg de nitroprussiato de sódio para 500 mL de água deionizada) e 5 mL de reagente B (2,5 g de hidróxido de sódio e 4,2 mL de hipoclorito de sódio, completar o volume para 500 mL), nesta ordem para garantir a estabilidade da cor. Os frascos foram deixados por 20 min em um banho a 37 °C no escuro. A cor azul foi medida em espectrofotômetro a 625 nm. O intervalo linear de detecção é de 0,5 a 6 μ g de nitrogênio da amônia. A curva padrão foi feita de 0,05 a 0,3 g/L de sulfato de amônio, respeitando a linearidade (Figura 3.9). As quantidades de nitrogênio foram calculadas diretamente da quantidade de sulfato de amônio medido, através da relação das massas molares destas espécies.

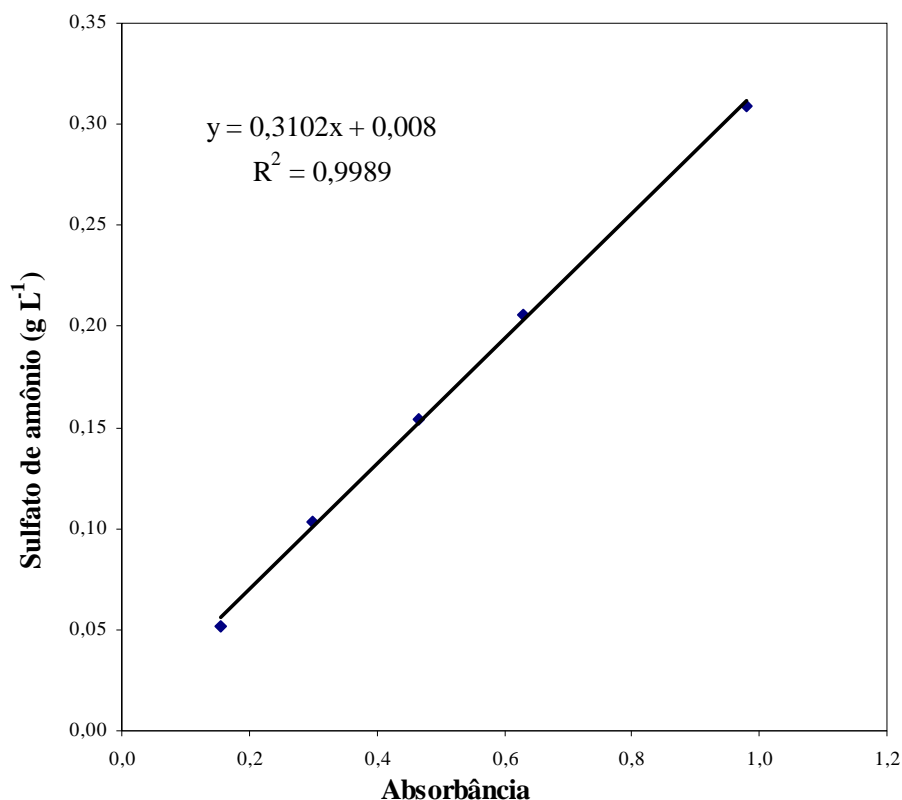


Figura 3.9: Curva padrão de sulfato de amônio.

3.6 Modelo Proposto de Crescimento Microbiano

Realizaram-se modificações nos modelos encontrados na literatura, descritos no Capítulo 2 a fim de melhorar os ajustes dos dados experimentais. Continuou-se considerando a biomassa total sendo a soma da biomassa residual mais o polímero.

Na equação que descreve a formação de biomassa residual passou-se a considerar a morte celular, conforme mostra a Equação 3.8.

$$\frac{dX_R}{dt} = \mu \cdot X_R - k_d \cdot X_R \quad (3.8)$$

onde k_d é a constante do termo representativo da morte celular e μ é a taxa de crescimento específica é dada pela Equação 3.9, esta considera tanto a fonte de carbono quanto nitrogênio como substratos limitantes e utiliza o modelo de cinética de Monod. Não foi considerado inibição pelos substratos.

$$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_{SS} + S} \right) \cdot \left(\frac{N}{K_{NS} + N} \right) \quad (3.9)$$

onde μ_m é a taxa de crescimento máxima, K_{SS} e K_{SN} são constantes para os substratos limitantes: fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente.

A Equação de formação do P(3HB), diferentemente do modelo de Mulchadani, além de considerar os termos associado e não associado ao crescimento, considera também um termo de consumo de polímero pelas células, conforme mostra a Equação 3.10.

$$\frac{dP}{dt} = k_1 \cdot \mu \cdot X_R + k'_2 \cdot X_R - k_C \cdot X_R \quad (3.10)$$

onde k_C é o parâmetro associado ao consumo celular. Matematicamente a Equação 3.10 é similar à Equação 2.4, utilizada por MULCHADANI desde que haja a possibilidade do parâmetro k_2 assumir valores negativos. O termo $k_2 \cdot X_R$ utilizado por Mulchadani não seria mais somente um termo não associado ao crescimento, mas também um termo que considera o consumo do polímero pela célula. Portanto no modelo modificado, o valor de $k_2 = k'_2 - k_C$ é negativo, isso porque experimentalmente observou-se que a contribuição do termo de consumo de polímero é maior que a do termo de produção não associado ao crescimento.

As equações para consumo de açúcar e nitrogênio foram utilizadas na forma sugerida por PATWARDHAN e SRIVASTAVA (2004) (Equação 2.13 e 2.14). Sendo que para a equação do nitrogênio, o termo de manutenção celular foi desprezado o que é equivalente a Equação 2.7, onde $k_3 = 1/Y_{RN}$.

Sumarizando o modelo proposto neste trabalho, tem-se o seguinte conjunto de equações:

$$\frac{dX_R}{dt} = (\mu - k_d) \cdot X_R \quad (3.8)$$

$$\frac{dP}{dt} = (k_1 \cdot \mu + k_2) \cdot X_R \quad (2.4)$$

$$\frac{dS}{dt} = -(\alpha \cdot \mu + \gamma) \cdot X_R \quad (2.13)$$

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{RN}} \cdot X_R \quad (2.7)$$

onde $\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_{SS} + S} \right) \cdot \left(\frac{N}{K_{NS} + N} \right)$, com 9 parâmetros a serem estimados.

Os modelos descritos no Capítulo 2 e o modelo proposto nesta dissertação foram implementados no software EMSO onde foram feitas a estimação dos parâmetros dos modelos e as simulações. O método utilizado na estimação dos parâmetros foi o método dos poliedros flexíveis que é um método de busca multivariável, onde o pior vértice de um poliedro com $n+1$ vértices é substituído por um novo vértice colinear com o vértice antigo e o centróide. A Função Objetivo é dada pela soma das diferenças ao quadrado entre o valor experimental e a predição do modelo divididas pelas variâncias, ou seja, usando o método dos mínimos quadrados ponderados pelo inverso variância.

Na implementação das equações de todos os modelos descritos neste capítulo, no software EMSO, foi necessário adicionar equações condicionais para evitar que a variável S assumisse valores negativos, uma vez que os modelos não impõem restrições para o consumo de substrato, mesmo este já tendo sido completamente esgotado.

Capítulo 4

Resultados e Discussões

4.1 Identificação dos Microrganismos

Na Figura 4.1 pode-se observar a árvore filogenética que demonstra a relação filogenética entre o microrganismo utilizado para a produção de P(3HB), indicado por CQPBA 036-07 DMR 01, e linhagens de microrganismos relacionados com base em seqüência de DNAr 16S. Nesta Figura pode-se observar que o microrganismo utilizado possui 100% de homologia com a bactéria *Bacillus megaterium* DSM 32^T. Esta bactéria é gram-positiva e possui forma de bastonetes.

A bactéria obtida na FIOCRUZ, que não produzia polímero, também foi identificada pelo mesmo procedimento e é indicada na árvore filogenética, Figura 4.1, por CQPBA 036-07 DMR 02. Esta possui homologia de 98% com as linhagens de bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens*.

A escala mostrada na Figura 4.1, corresponde a distância evolutiva. É um valor de referência para comparação entre as espécies. Quanto maior a distância entre as linhagens, maior as diferenças entre elas. Neste caso a comparação foi feita entre a seqüência de DNA retiradas das amostras a serem identificadas e seqüências de microrganismos representados nas bases de dados do Genbank (base de dados de seqüência genética).

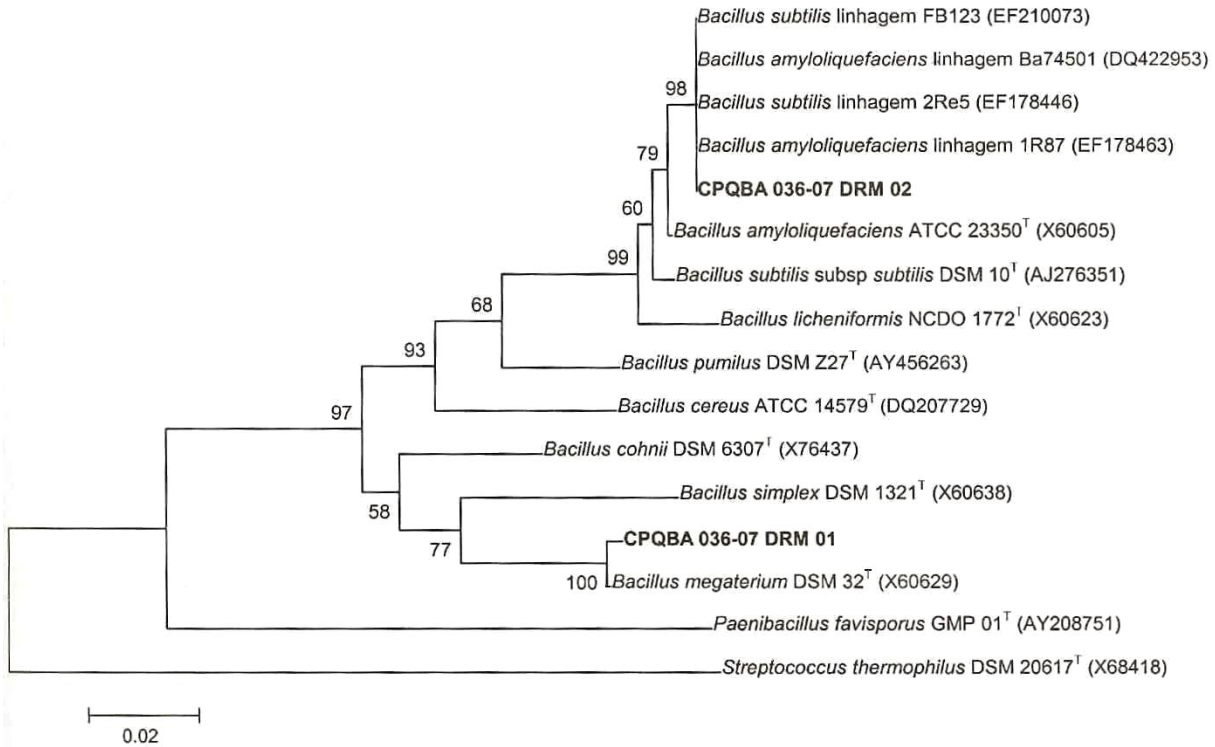


Figura 4.1: Árvore filogenética demonstrando a relação entre os microrganismos.

4.2 Experimentos em Estufa Incubadora Rotatória

Conforme foi mencionado no Capítulo 3, foram realizados experimentos em frascos cônicos em estufa incubadora rotatória, com agitação de 160 rpm e temperatura de 30°C, seguindo o planejamento fatorial 2^2 composto, com três repetições no ponto central, conforme Tabela 3.3, com o objetivo de determinar a melhor concentração inicial de sacarose e razão carbono/nitrogênio. Os resultados destes experimentos são mostrados na forma gráfica e, para cada análise realizada, foram plotados no mesmo gráfico todos os pontos do conjunto de experimentos para facilitar a comparação. O ponto central apresenta o valor médio das repetições e os seus desvios padrões foram usados como estimativas dos desvios padrões das demais condições experimentais. No Apêndice B são apresentadas as tabelas referentes aos dados experimentais.

A Figura 4.2 mostra a concentração de biomassa total obtida, apresentada em escala logarítmica, devido ao fato da cinética de crescimento microbiana ter característica exponencial. Pode-se observar que para os experimentos 3 e 7, que continham valores baixos de sacarose e nitrogênio inicial, obteve-se um menor acúmulo de biomassa total, enquanto os outros alcançaram valores próximos. Contudo o ponto 4, que também contém pouca sacarose inicial, apresentou o maior valor de biomassa total, evidenciando que a limitação de nitrogênio parece ser a causa do decréscimo na biomassa.

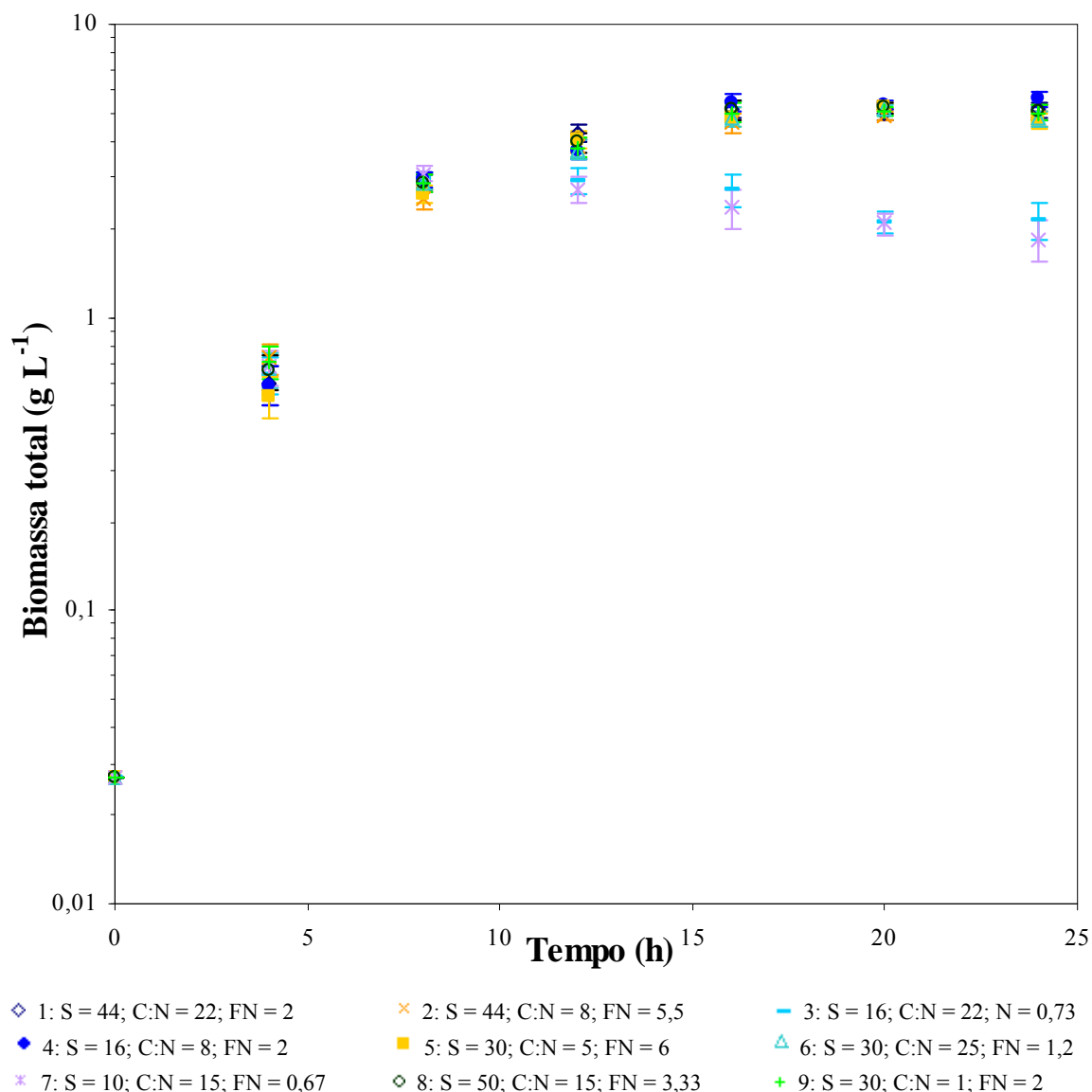


Figura 4.2: Concentração de biomassa total *versus* tempo de cultivo.

A concentração de P(3HB) obtida durante o cultivo para todo o conjunto de experimentos é mostrada na Figura 4.3, também em escala logarítmica. Observa-se que o acúmulo de polímero ocorre juntamente com o crescimento celular e inicia durante a fase de crescimento exponencial, indicando que a produção nessa bactéria pode ser associada ao crescimento. Resultado similar foi encontrado por Omar et al. (2001) utilizando outros substratos. Assim como na Figura 4.2 os experimentos 3 e 7 mostraram uma produção de P(3HB) baixa quando comparada com os outros experimentos. Observam-se também nos pontos 3 e 7 que o consumo de polímero inicia por volta de 12 horas enquanto que para os demais pontos parece haver uma tendência de consumo a partir de 20 horas, com exceção do experimento 4, o qual não apresenta queda.

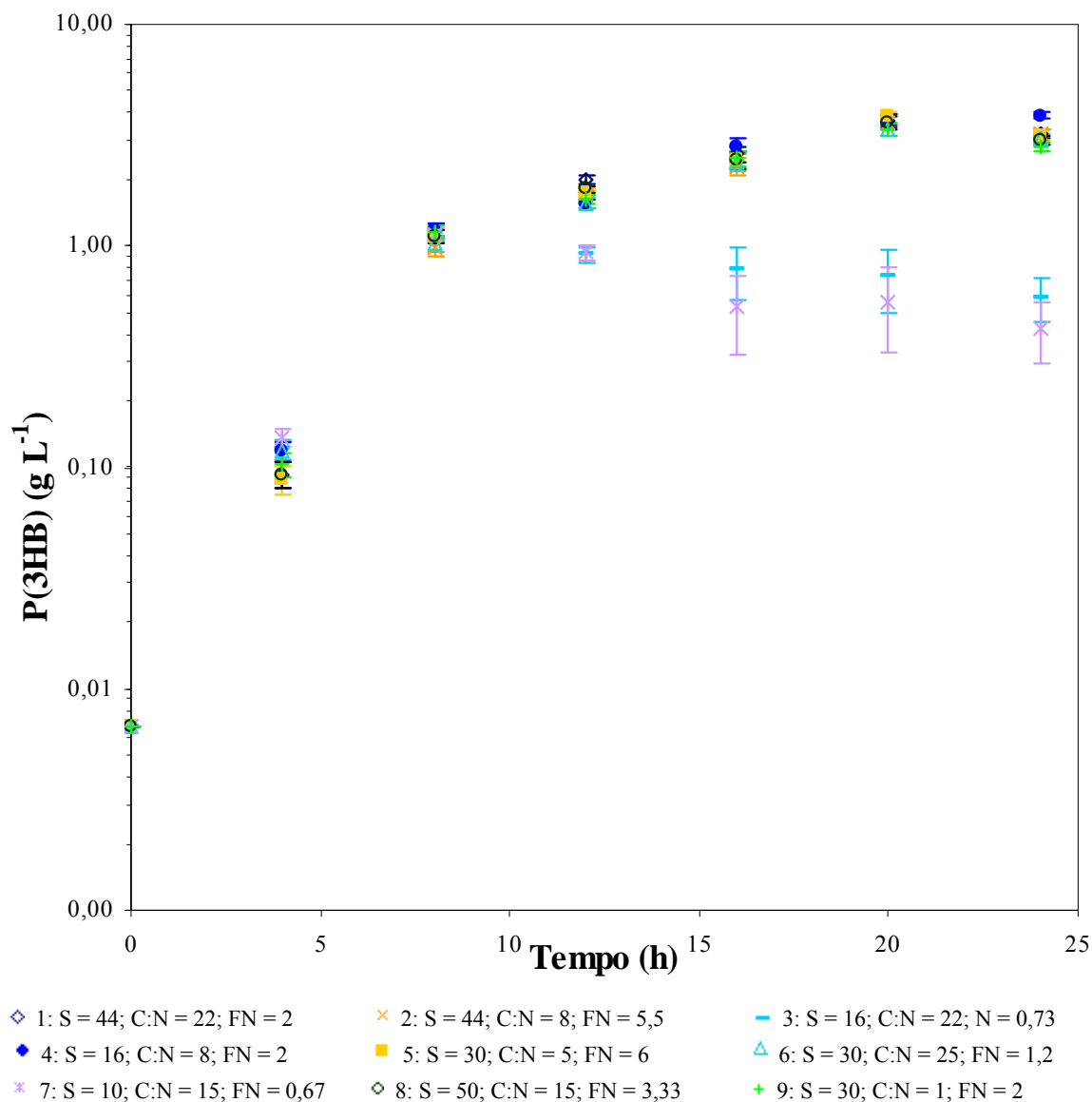


Figura 4.3: Concentração de P(3HB) *versus* tempo de cultivo.

Na Figura 4.4, a biomassa residual (descontando-se a quantidade referente ao polímero na biomassa total) é apresentada em escala logarítmica. Observa-se que a fase de crescimento exponencial termina entre 8 e 12 horas, mas o acúmulo de P(3HB), Figura 4.3, continua aumentando na fase estacionária até 20 h. É importante ressaltar que os experimentos 3 e 7 possuem uma biomassa residual próxima aos demais, evidenciando que a baixa biomassa total, Figura 4.2, se deve a menor quantidade de polímero.

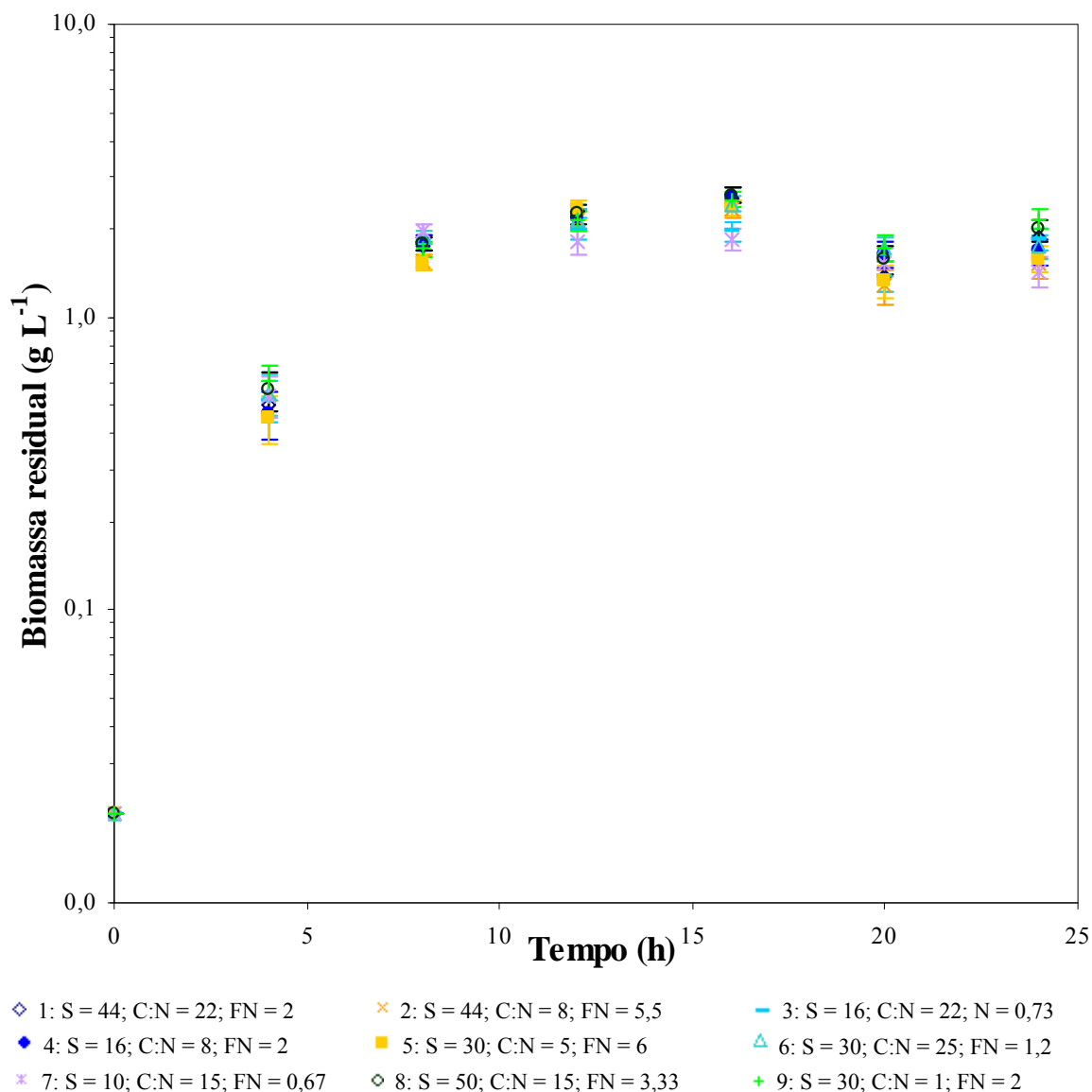


Figura 4.4: Concentração de biomassa residual *versus* tempo de cultivo.

O percentual de acúmulo do biopolímero obtido é mostrado na Figura 4.5. Observa-se que se obteve em alguns experimentos um grande acúmulo, chegando próximo a 75%, como é o caso dos experimentos com 20 horas de cultivo.

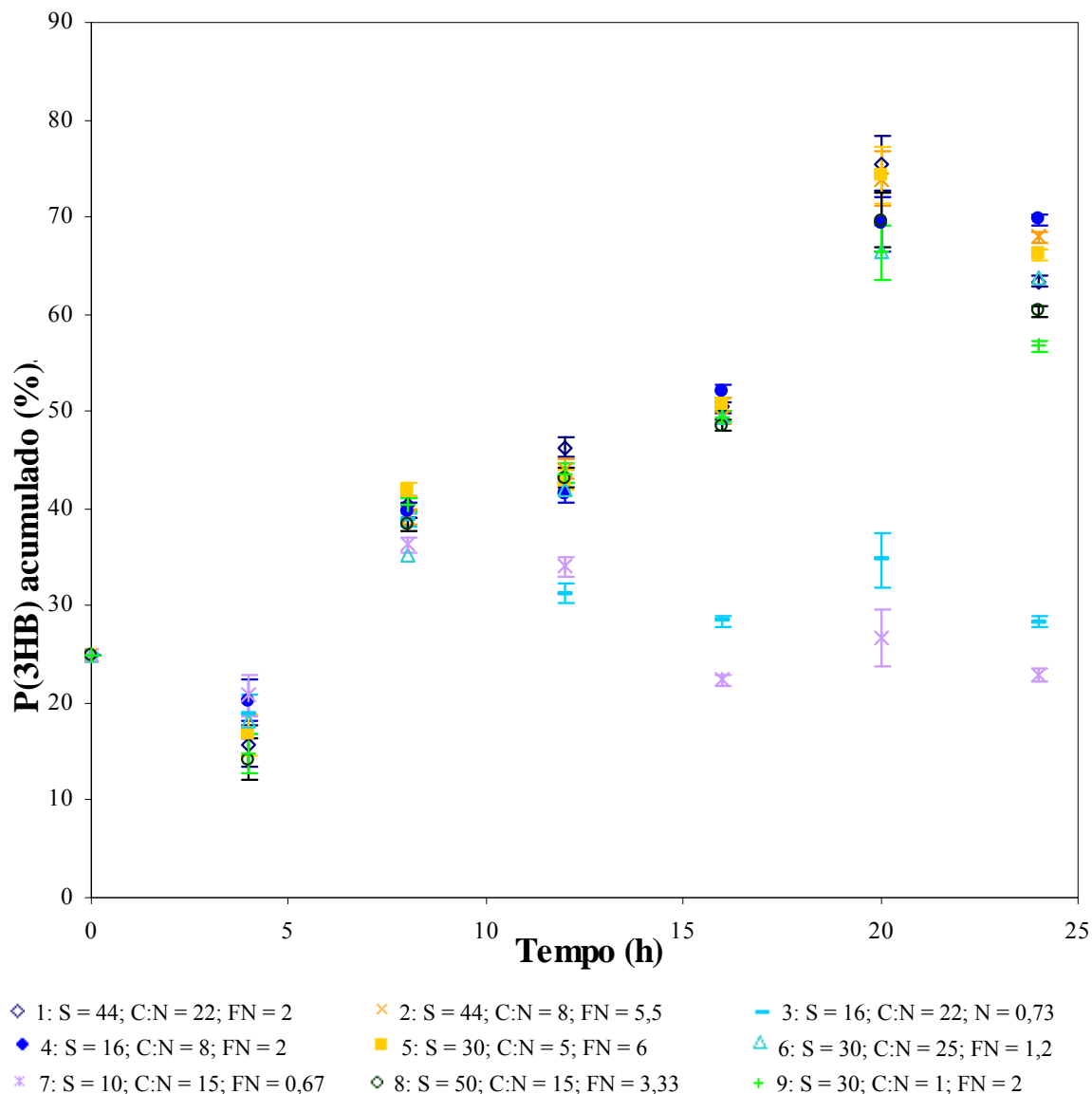


Figura 4.5: Porcentagem de P(3HB) acumulado nas células *versus* tempo de cultivo.

A Figura 4.6 mostra o consumo de sacarose, medido como açúcares totais devido ao método empregado, ao longo dos cultivos. Observa-se que para a maioria dos experimentos não houve o consumo total da sacarose, sendo alcançados valores muito baixos para os experimentos 3, 4 e 7. Apesar de haver sacarose disponível no meio de cultura, observa-se na Figura 4.4 que a partir de 16 horas não há mais crescimento celular.

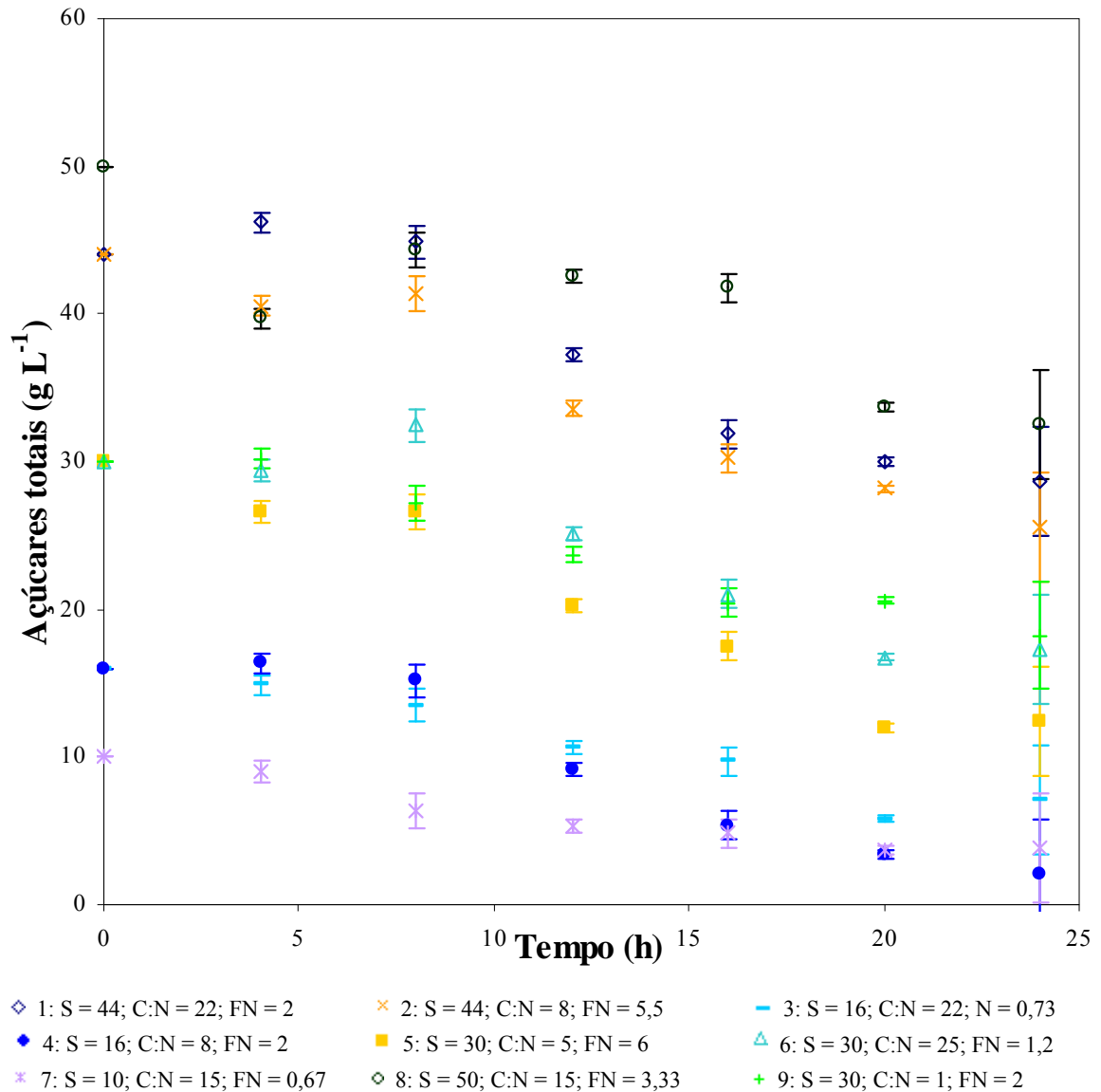


Figura 4.6: Concentração de sacarose *versus* tempo de cultivo.

Na Figura 4.7 é mostrado o consumo de nitrogênio. As quantidades de nitrogênio mostradas nesta Figura foram calculadas diretamente da quantidade medida de sulfato de amônio, através da relação das massas molares destas espécies. Assim como aconteceu com a sacarose, não há consumo total de nitrogênio, com exceção dos pontos dos experimentos 3 e 7, que também obtiveram um acúmulo menor de biopolímero.

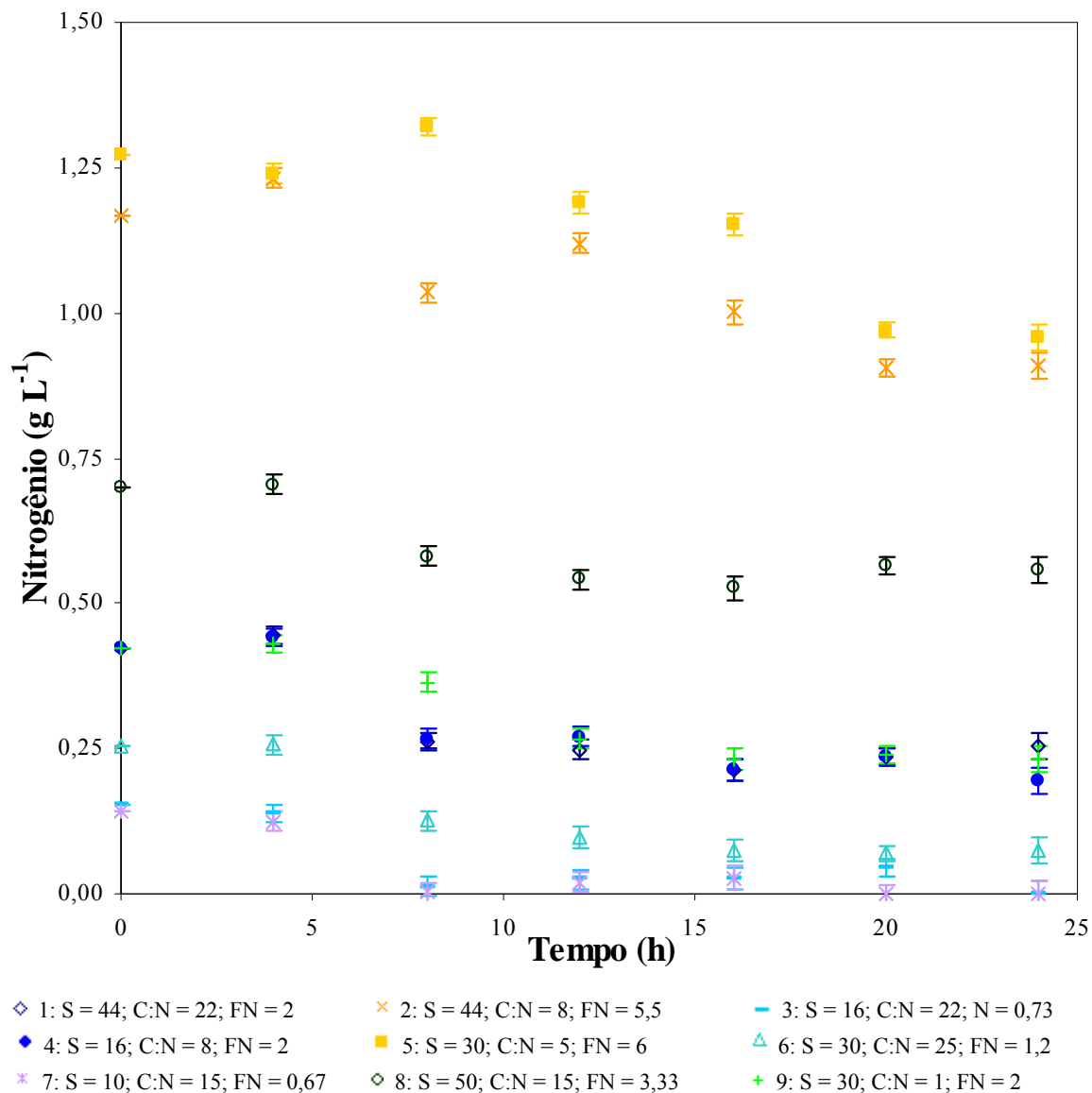


Figura 4.7: Concentração de nitrogênio *versus* tempo de cultivo.

Nos experimentos em estufa incubadora rotatória não foi controlado o pH dos meios ao longo do cultivo. Antes de iniciar os cultivos os meios foram ajustados para o pH 7. A variação de pH ao longo do cultivo é mostrada na Figura 4.8. Pode-se observar que ocorre uma acentuada queda no valor de pH chegando a valores próximos a 4, com exceção dos experimentos 3 e 7 que obtiveram uma menor produção de P(3HB).

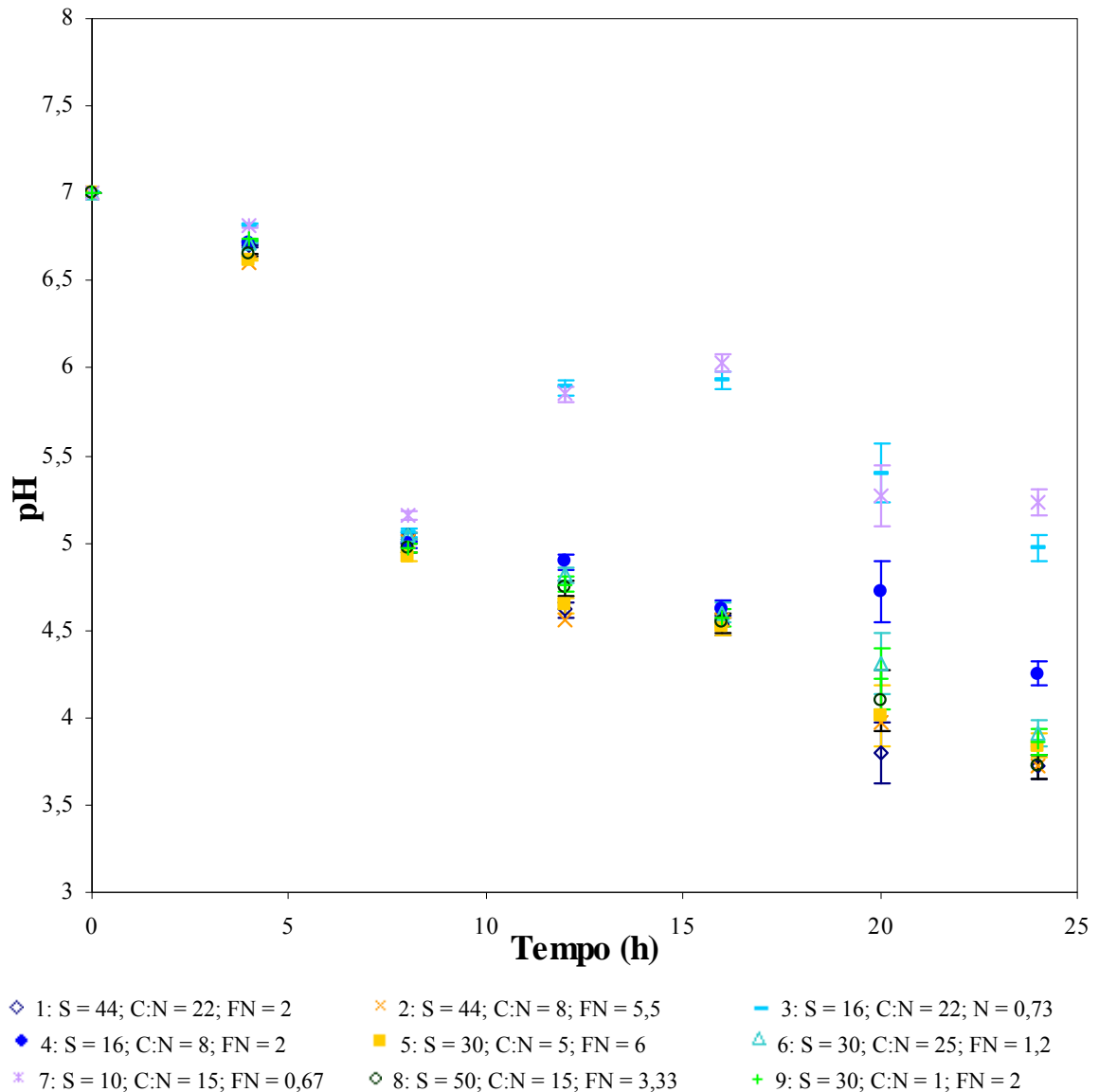


Figura 4.8: Variação do pH durante o cultivo.

A Tabela 4.1 mostra as correlações entre os valores obtidos experimentalmente de acúmulo percentual de P(3HB), concentração do polímero e concentração da biomassa residual e o pH do meio ao longo do cultivo. Pode-se observar que o pH está fortemente correlacionado ao P(3HB) na maioria dos pontos, pois apresentou correlações próximas a 1. Os valores negativos indicam que possui efeito inverso. Mostrando que o pH é uma variável importante para o acúmulo de polímero. Os experimentos referentes aos experimentos 3 e 7, não apresentaram uma boa correlação, porém também não foi possível um grande acúmulo nesses pontos. A biomassa residual não apresenta uma correlação significativa com o pH.

Tabela 4.1: Correlações entre valores de pH e percentual de polímero obtido, pH e concentração de P(3HB) e pH e Biomassa residual.

EXP	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH-P(3HB) (%)	-0,96	-0,93	-0,79	-0,86	-0,94	-0,93	-0,49	-0,95	-0,95
pH-P(3HB) (g/L)	-0,94	-0,94	-0,67	-0,84	-0,91	-0,90	-0,59	-0,92	-0,91
pH-X _R (g/L)	-0,62	0,42	-0,66	-0,80	-0,62	-0,75	-0,68	-0,72	-0,84

Na Figura 4.9 é mostrado os valores de pH versus percentual de P(3HB) acumulado. Pode-se notar uma grande correlação entre essas variáveis para o experimento 1 assim como foi mostrado na Tabela 4.1. Pode-se observar também a fraca correlação entre as variáveis referente ao experimento 7.

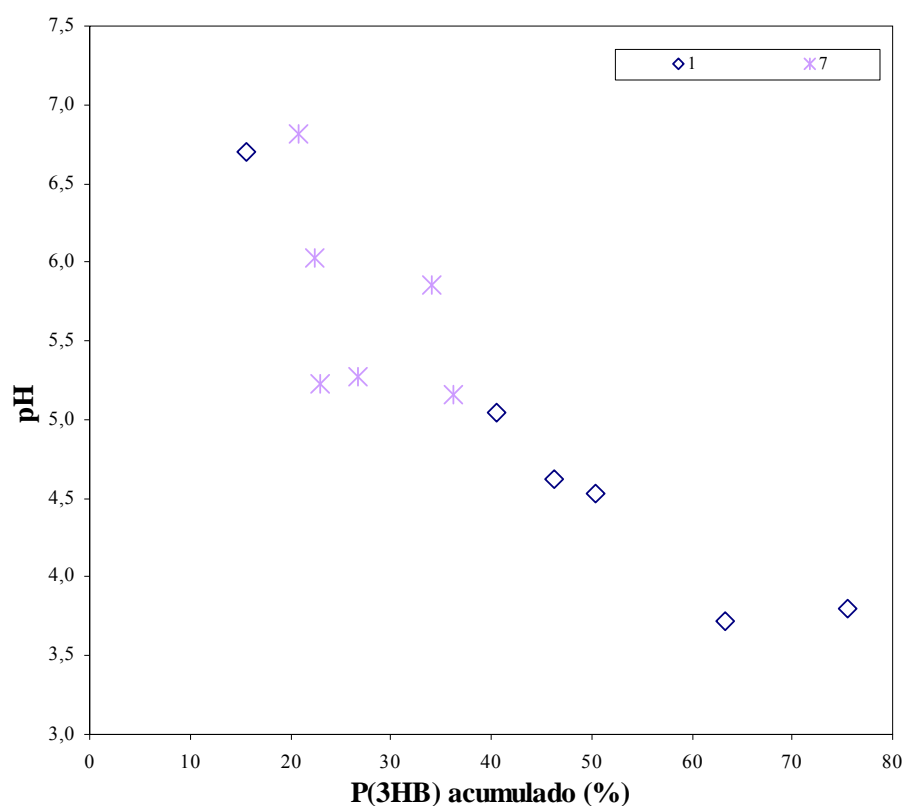


Figura 4.9: pH versus percentual de P(3HB) acumulado.

Outro fato que deve ser considerado é que o meio de cultura é translúcido e à medida que corre o experimento ele se torna rosado, a transição ocorre por volta das 8 horas de cultivo. Este fenômeno também foi observado em GAMBETTA (2006).

Analisando os gráficos dos experimentos realizados em estufa incubadora rotatória, nota-se que mesmo sem limitação de nitrogênio, a bactéria *Bacillus megaterium* foi capaz de acumular grandes quantidades de biopolímero, evidenciando que a produção é associada ao crescimento e que não necessita de limitação de nutriente para iniciar a produção de P(3HB). Observa-se também que houve consumo do biopolímero, como por exemplo, nos

experimentos 3 e 7, que alcançaram menor concentração de açúcar e, portanto, na falta de fonte de carbono e nitrogênio começam a consumir as reservas. Para os demais pontos começou a haver um pequeno consumo depois de 20 horas, mas não se verificou falta de fonte de carbono. MCCOOL et al (1996), trabalhando com outros substratos, também verificaram para esta bactéria um acúmulo de biopolímero durante a fase de crescimento celular e fase estacionária e consumo do P(3HB) no final da fase estacionária.

Os resultados obtidos em frascos cônicos em estufa incubadora rotatória mostraram que é possível obter um grande acúmulo de P(3HB) por células de *Bacillus megaterium*, mesmo sem limitação de nitrogênio.

Apesar de não haver consumo total do açúcar e do nitrogênio, para a maioria dos casos, a biomassa parou de crescer e também não houve formação de polímero, ou pelo menos, ocorreu diminuição na taxa de produção, o que leva a considerar que poderia estar havendo algum tipo de inibição ou ainda limitação de outros fatores de crescimento, pois de outra forma deveria ainda ocorrer crescimento e produção. Um dos fatores levados em consideração foi o pH muito baixo. Sendo recomendado, pela DSMZ, pH 7 para crescimento da *B. megaterium*. Este valor foi utilizado para cultivo em biorreator com pH controlado em OMAR et al. (2001) e WU et al. (2001).

4.2.1 Análise estatística dos resultados

Escolheu-se analisar de forma detalhada os experimentos referentes a 20 horas por ser o tempo onde se atingiu maior acúmulo de P(3HB).

Na Figura 4.10, é mostrada a superfície de resposta da concentração de biomassa total (X), no tempo de 20 horas, em função da concentração de sacarose e da razão carbono/nitrogênio. Observa-se que a biomassa total tende a aumentar para valores altos de sacarose, onde apresenta baixa influência da razão carbono/nitrogênio. A curva foi obtida no software STATISTICA por regressão multivariável. Com 95% de significância nos parâmetros, a produção de biomassa mostrou uma influência quadrática da concentração de sacarose (S), linear para a razão carbono/nitrogênio e também uma influência do termo cruzado S e $C:N$, como pode ser visto na Equação 4.1.

$$X_7(S, C : N) = 7,35 - 0,0018 \cdot S^2 - 0,3919 \cdot (C : N) + 0,0111 \cdot S \cdot (C : N) \quad (4.1)$$

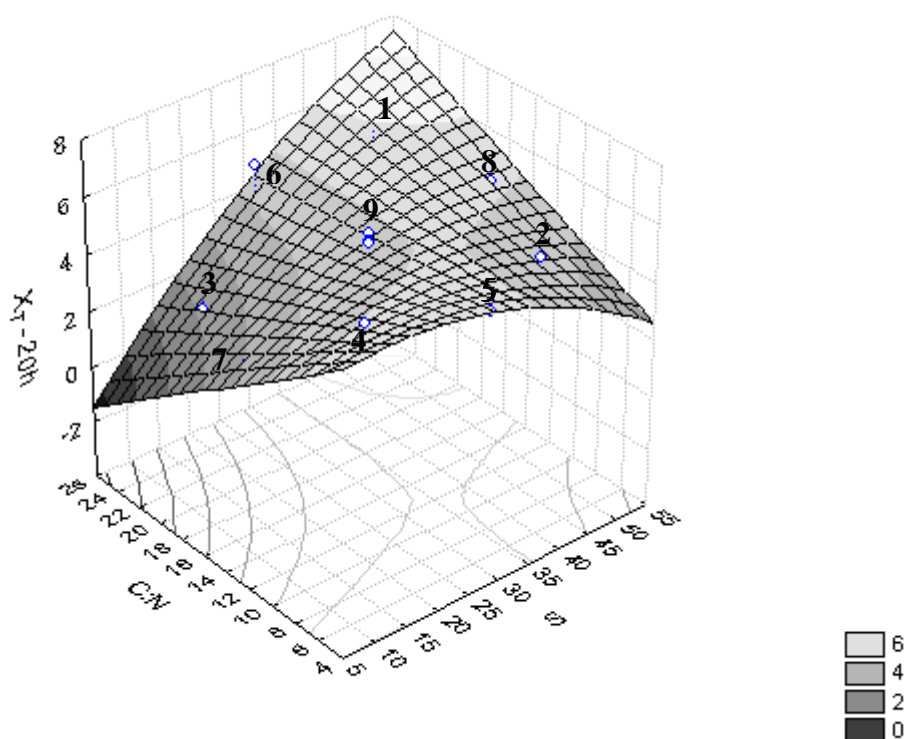
Os parâmetros do modelo não estão correlacionados e os valores dos desvios padrão de cada parâmetro estão mostrados na Tabela 4.2. O valor de R^2 é 0,804.

Tabela 4.2: Parâmetros e testes estatísticos do modelo para biomassa total.

Fator	Coefficientes de regressão	Desvio Padrão	t(7)	p	Intervalo de confiança (-95%)	Intervalo de confiança (+95%)
i	7,350351	0,911446	8,06450	0,000087	5,195124	9,505577
S ²	-0,001858	0,000717	-2,59264	0,035807	-0,003553	-0,000163
C:N	-0,391920	0,089453	-4,38132	0,003229	-0,603442	-0,180399
S*C:N	0,011126	0,002787	3,99979	0,005191	0,004548	0,017703

i termo independente; t(7) teste t com 7 graus de liberdade; p significância estatística.

Pode-se observar na Tabela 4.2 que todos os parâmetros apresentaram uma significância estatística menor que o grau de significância estabelecido, igual a 0,05. O grau de liberdade utilizado para o cálculo da matriz de covariância no teste t foi igual a 7, referente ao número de experimentos menos o número de parâmetros do modelo.

**Figura 4.10:** Superfície de resposta da concentração de biomassa no tempo de 20 horas.

Para o tempo de 24h, obteve-se um comportamento similar ao de 20h, porém o parâmetro quadrático para a sacarose não foi significativo.

A Figura 4.11 mostra a superfície de resposta do acúmulo percentual de biopolímero nas células, para o tempo de 20 horas, em função da concentração de sacarose e da razão carbono/nitrogênio. Observa-se que, a partir de valores intermediários de sacarose, a variação

na concentração de sacarose tem efeito pequeno no acúmulo de P(3HB) e a influência da relação carbono/nitrogênio é pouco significativa.

Do mesmo modo, com 95% de significância nos parâmetros, o acúmulo de P(3HB) mostrou influência quadrática para a concentração de sacarose (S), linear para a razão carbono/nitrogênio ($C:N$) e também influência do termo cruzado, como mostra a Equação 4.2. Os demais parâmetros não foram significativos.

$$PHB(S, C:N) = 54,36 - 0,044 \cdot S^2 + 2,182 \cdot S - 3,548 \cdot (C:N) + 0,092 \cdot S \cdot (C:N) \quad (4.2)$$

Os parâmetros do modelo para o P(3HB) também não apresentaram correlação. Os valores dos desvios padrão de cada parâmetro estão mostrados na Tabela 4.3. O valor de R^2 é 0,918.

Tabela 4.3: Parâmetros e testes estatísticos para o modelo de porcentagem de P(3HB) acumulado.

Fator	Coefficientes de regressão	Desvio Padrão	t(6)	p	Intervalo de confiança (-95%)	Intervalo de confiança (+95%)
i	54,36084	17,89890	3,03711	0,022888	10,56382	98,15787
S	2,18233	0,87616	2,49079	0,047112	0,03845	4,32621
S ²	-0,04369	0,01216	-3,59352	0,011455	-0,07344	-0,01394
C:N	-3,54752	0,97060	-3,65498	0,010643	-5,92249	-1,17255
S*C:N	0,09217	0,03074	2,99858	0,024052	0,01696	0,16739

i termo independente; t(6) teste t com 6 graus de liberdade; p significância estatística.

Do mesmo modo que o modelo para a biomassa total, todos os parâmetros do modelo para o P(3HB) apresentaram uma significância estatística menor que o grau de significância estabelecido.

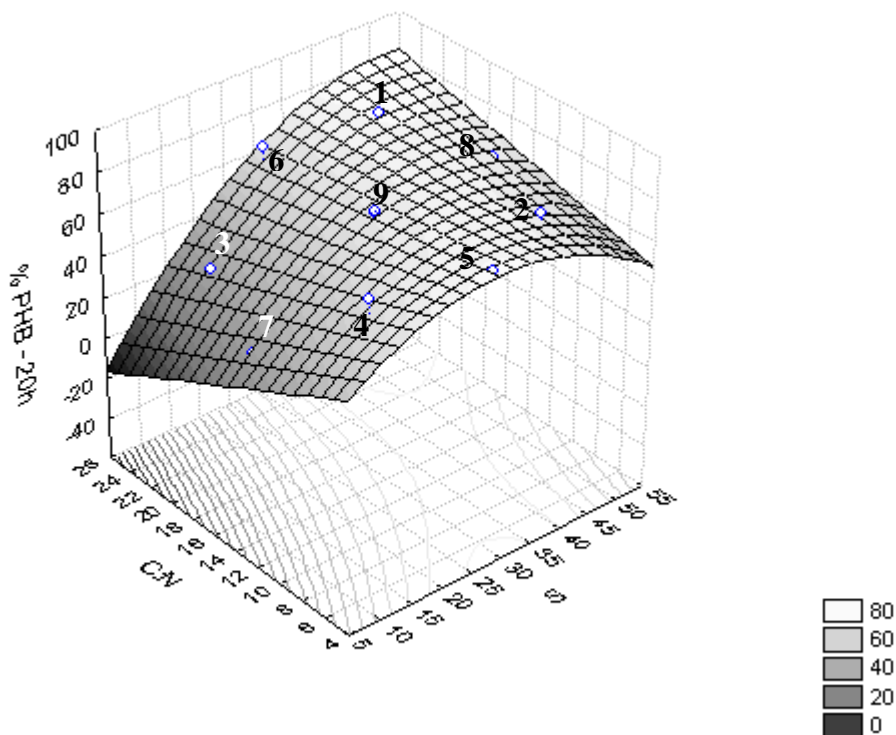


Figura 4.11: Superfície de resposta da porcentagem de acúmulo de P(3HB) nas células no tempo de 20 horas.

No tempo de 24 horas somente o termo linear da razão carbono/nitrogênio e o termo cruzado mostraram significância e para o tempo de 16 horas obteve-se resultados similares ao tempo 20 horas.

A Figura 4.12 traz a superfície de resposta para a concentração remanescente de açúcar no meio de cultivo (S_r) para o tempo de 20 horas, onde se observa que o mínimo de sacarose residual ocorre para as menores concentrações iniciais de sacarose e ainda a razão carbono/nitrogênio apresenta uma pequena influência. Neste caso, deseja-se o minimizar o desperdício de sacarose.

A equação para sacarose residual, com 95% de significância nos parâmetros, mostrou influência linear para a concentração de sacarose (S) e quadrática para a razão carbono/nitrogênio ($C:N$), como mostra a Equação 4.3. Os demais parâmetros não foram significativos.

$$S_r(S, C:N) = -20 + 0,812 \cdot S + 1,859 \cdot (C:N) - 0,055 \cdot (C:N)^2 \quad (4.3)$$

Os parâmetros do modelo para a sacarose residual também não apresentaram correlação e os valores dos desvios padrão de cada parâmetro estão mostrados na Tabela 4.4. O valor de R^2 é 0,989.

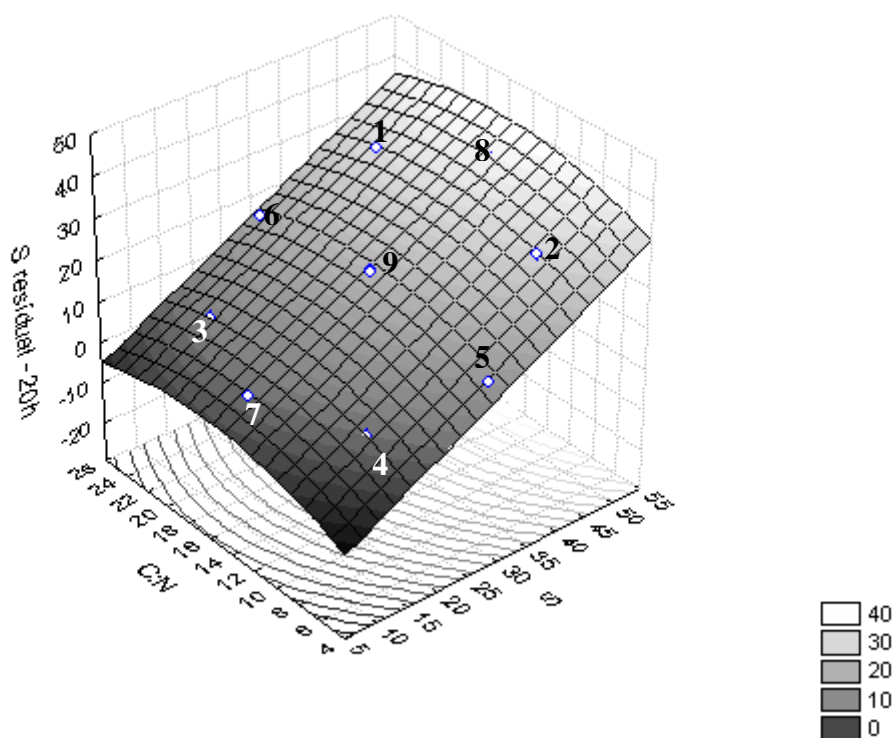


Figura 4.12: Superfície de resposta da concentração de açúcar para o cultivo de 20 horas.

Tabela 4.4: Parâmetros e testes estatísticos do modelo para sacarose residual.

Fator	Coefficientes de regressão	Desvio Padrão	t(7)	p	Intervalo de confiança (-95%)	Intervalo de confiança (+95%)
i	-20,0005	2,424764	-8,24841	0,000075	-25,7341	-14,2668
S	0,8116	0,032314	25,11727	0,000000	0,7352	0,8881
C:N	1,8588	0,318068	5,84411	0,000634	1,1067	2,6109
C:N ²	-0,0555	0,010381	-5,34248	0,001073	-0,0800	-0,0309

i termo independente; t(7) teste t com graus de liberdade 7; p significância estatística.

A significância estatística dos parâmetros foi muito menor que o grau de significância estabelecido.

Analisando-se as superfícies de respostas obtidas e levando-se em consideração que na maioria dos casos houve sobra de sacarose, o que acarretaria em desperdício, foi montada uma função objetivo reunindo as três equações obtidas ponderadas a fim de não haver grande desperdício de sacarose. A Função objetivo é representada pela Equação 4.4 e pode ser melhor visualizada na Figura 4.13, obtida utilizando o software MATLAB[®] com um peso $w = 0,2$.

$$FObj(S, C : N) = (1 - w) \cdot Sr(S, C : N) - w \cdot \left(\frac{PHB(S, C : N) \cdot X_T(S, C : N)}{100} \right) \quad (4.4)$$

Nesta função objetivo deseja-se minimizar a sobra de sacarose e maximizar a produção de biopolímero, dada pelo produto da concentração da biomassa total pelo percentual de biopolímero produzido. O peso w estabelece um compromisso entre estes dois objetivos. As variáveis de decisão deste problema de otimização são: a concentração inicial de sacarose e a relação carbono/nitrogênio.

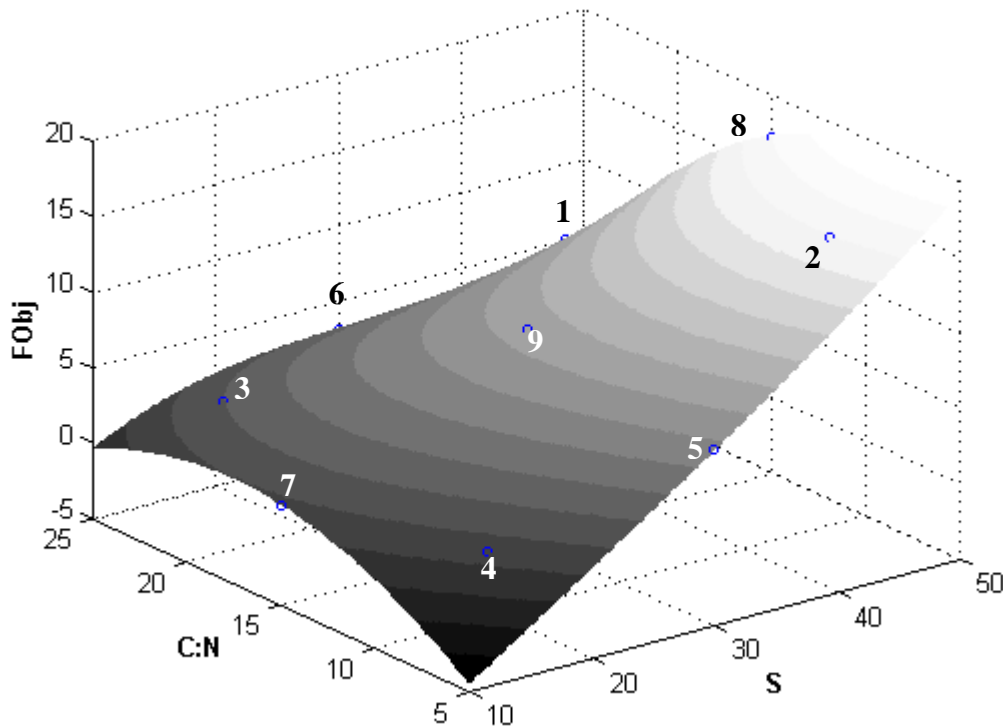


Figura 4.13: Valores da Função Objetivo.

O menor valor da função objetivo, onde se consegue a maior produção de polímero e menor valor de sacarose residual, é obtido próximo ao ponto referente ao experimento 4 ($S = 16$ g/l e $C:N = 8$) que foi escolhido para a realização de experimentos em biorreator.

4.3 Experimentos em Biorreator

4.3.1 Resultados de k_La

Os valores de k_La mostrados em curva de nível na Figura 4.14 foram obtidos segundo planejamento de experimentos para determinação do k_La mostrado na Tabela 3.4 do Capítulo 3, com o objetivo de determinar a faixa de variação da agitação e o valor da aeração para utilização nos experimentos realizados em biorreator. Pode-se observar que a partir de 700 rpm não há aumento do coeficiente de transferência de massa, além disso, nota-se que a

aeração apresenta pouca influência sobre a variação de k_{La} . No Apêndice B é mostrada a tabela referente aos dados experimentais obtidos para os valores de k_{La} .

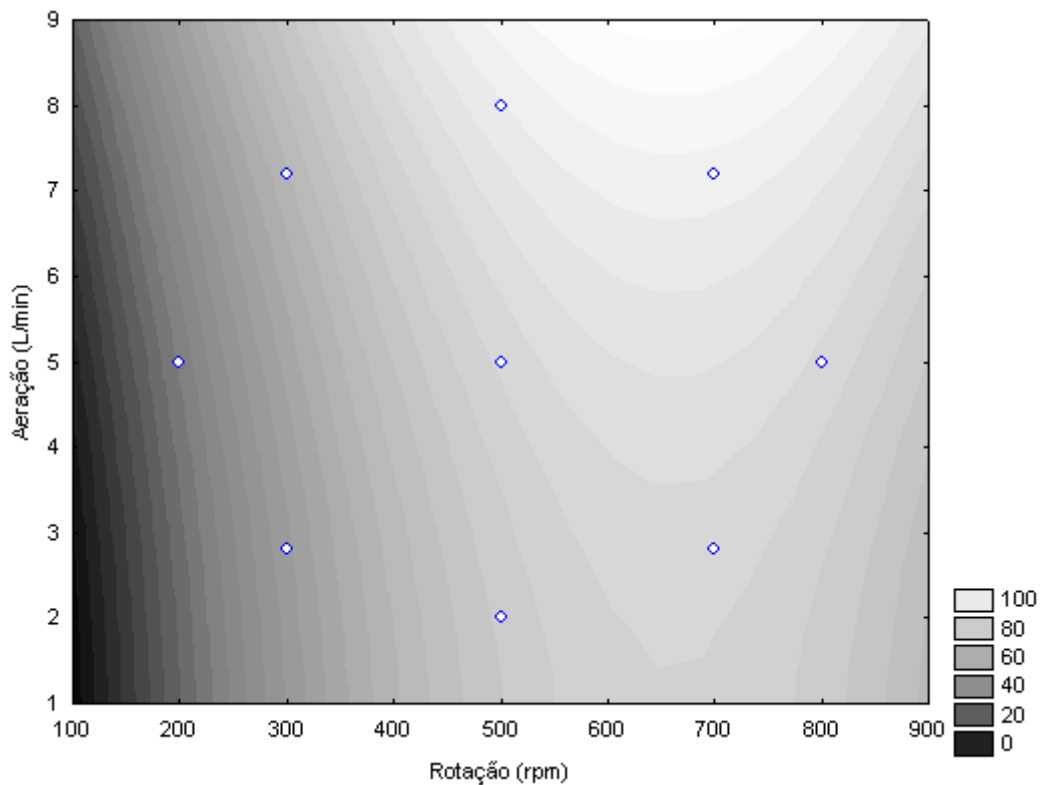


Figura 4.14: Curvas de nível para valores de k_{La} em função da rotação e aeração.

Para os experimentos em biorreator escolheu-se trabalhar com aeração de 4 L/min (1 vvm) e variou-se a agitação de 200 a 700 rpm. Na Figura 4.15 é mostrada a variação do k_{La} em função da agitação, para o valor de aeração utilizado nos cultivos em biorreator, calculados a partir da equação gerada pelo software STATISTICA na análise dos resultados do planejamento de experimentos realizado. Observa-se que o valor de k_{La} aumenta rapidamente em função do aumento da agitação até alcançar um valor máximo. Verifica-se que após 500 rpm o aumento na velocidade de agitação provoca pequeno aumento no valor de k_{La} .

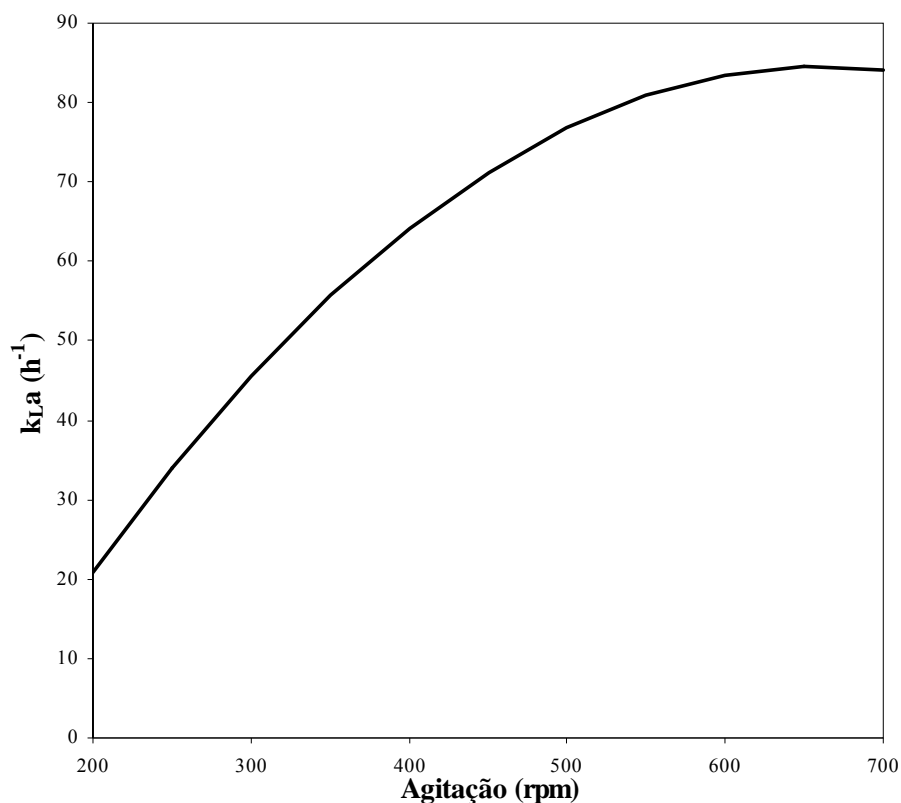


Figura 4.15: Valores de k_{La} em função da rotação para uma aeração de $4 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$.

4.3.2 Resultados de cultivos em biorreator

Foram realizados dois experimentos em biorreator em condições iguais (duplicata). Os resultados para os dois biorreatores são apresentados nos mesmos gráficos. No Apêndice B são mostradas as tabelas contendo os dados experimentais que são apresentados neste capítulo na forma gráfica.

Na Figura 4.16, em escala logarítmica, pode-se observar a biomassa total (X_t), biomassa residual (X_r) e P(3HB) obtidas nos cultivos em biorreator para os dois cultivos. Nota-se que os valores para os dois biorreatores estão muito próximos entre si. Os valores de biomassa total ficaram próximos aos obtidos em estufa incubadora rotatória. Enquanto que os valores de biopolímeros obtidos são muito inferiores. Essa diminuição de produção em biorreator em relação ao obtido em estufa incubadora rotatória também ocorreu em OMAR et al. (2001), também com o pH mantido igual a 7 ao longo do cultivo.

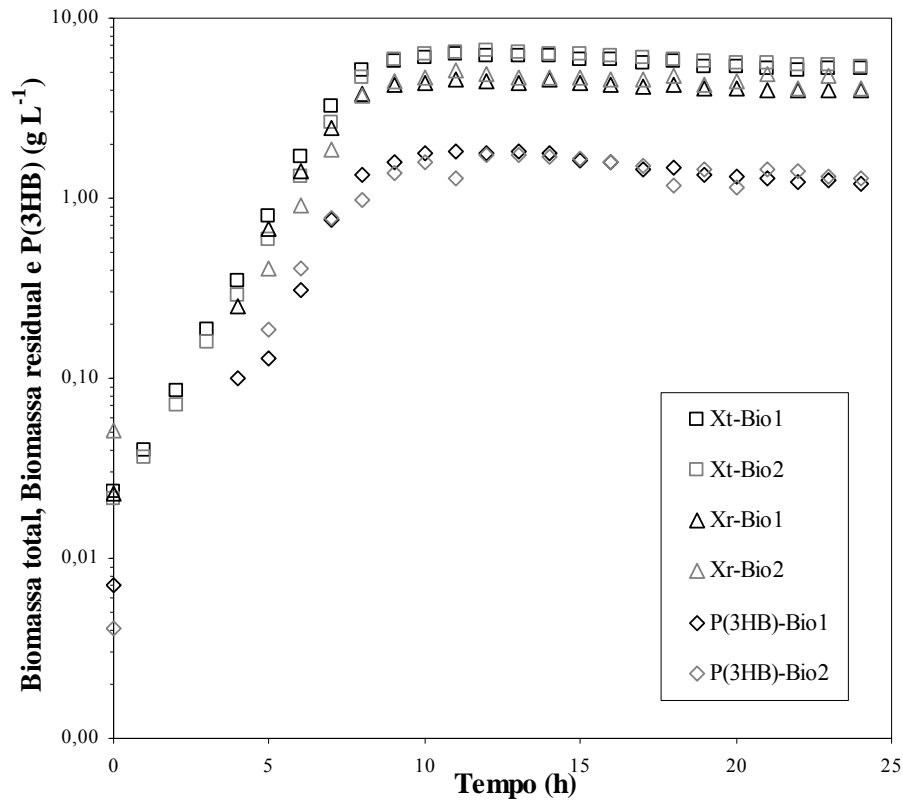


Figura 4.16: Concentrações de Biomassa total, Biomassa residual e P(3HB) obtidas durante o cultivo em biorreator.

Nos cromatogramas obtidos para análise de P(3HB) existiam outros picos, menos significativos, com tempos de retenção entre 8 e 10 minutos que possivelmente são de outros PHAs produzidos pela *Bacillus megaterium* em menor quantidade. Estes não foram identificados, pois há necessidade de polímero padrão para comparar. A Figura 4.17 traz um exemplo do cromatograma obtido na análise de P(3HB). Os picos iniciais, que aparecem entre 4 e 6 minutos são referentes aos solventes contidos na mistura injetada no cromatógrafo. Nesta figura está indicado para cada pico o número do pico / o tempo de retenção / a área referente ao pico. O Pico 11 é referente ao P(3HB) e o pico 16 ao ácido benzóico, utilizado como padrão interno. Os picos 14 e 16 aparecem freqüentemente nos cromatogramas obtidos durante as análises.

Em FINDLAY e WHITE (1983) foi reportado que o polímero purificado, retirado da *B. megaterium* continha 95% de 3-hidroxi butirato (3HB), 3% de 3- hidroxiheptanoato (3HHp), 2% de hidroxialcanoato contendo 8 carbonos e traços de três outros compostos hidroxialcanoatos.

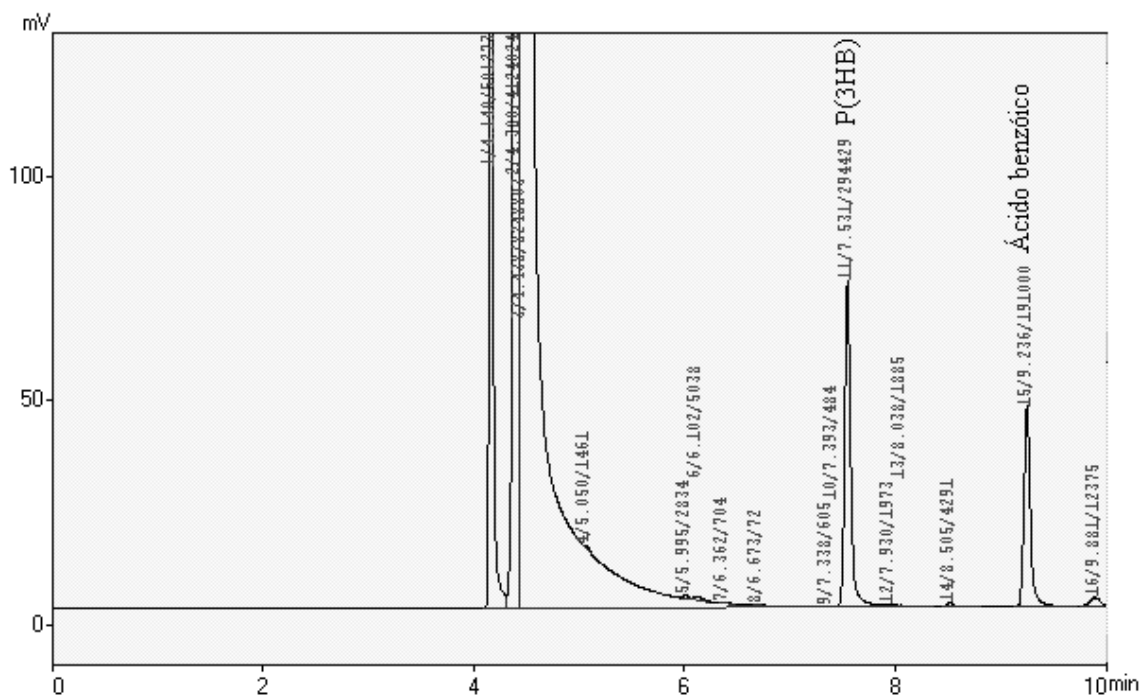


Figura 4.17: Cromatograma obtido para análise de P(3HB) por cromatografia gasosa.

O acúmulo de P(3HB) nas células é mostrado na Figura 4.18, onde se pode observar que há um decréscimo na percentagem de polímero durante a fase inicial de crescimento e próximo a 5 horas começa aumentar o acúmulo. No final da fase estacionária volta a ocorrer um decréscimo na percentagem de biopolímero. MCCOOL et al. (1996) também verificaram esse decréscimo inicial e final de P(3HB) na *Bacillus megaterium*. O decréscimo inicial é atribuído à taxa de crescimento celular inicial, que é maior que a taxa de formação do polímero. Essa fase lag na formação de P(3HB) foi citada em LEE et al. (2004), como sendo um dos indícios da repressão dos genes *phaQ* e *phaP*, onde uma vez iniciado a produção de P(3HB), a PhaQ detecta a formação e libera a transcrição dos genes iniciando a produção da PhaP encontrada em abundância nos grânulos.

O consumo final e o baixo acúmulo de P(3HB) podem ser explicados pela formação de esporos devido à falta de algum nutriente. O mesmo comportamento foi observado em OMAR et al. (2001).

Pode-se observar também que há uma diferença entre os valores de P(3HB) percentual acumulado inicialmente nos dois biorreatores, Figura 4.18, que pode ser explicada pela diferença de P(3HB) acumulada em relação às células totais no pré-inóculo, mas como pode ser visto na Figura 4.16 não há grande diferença na quantidade final de polímero.

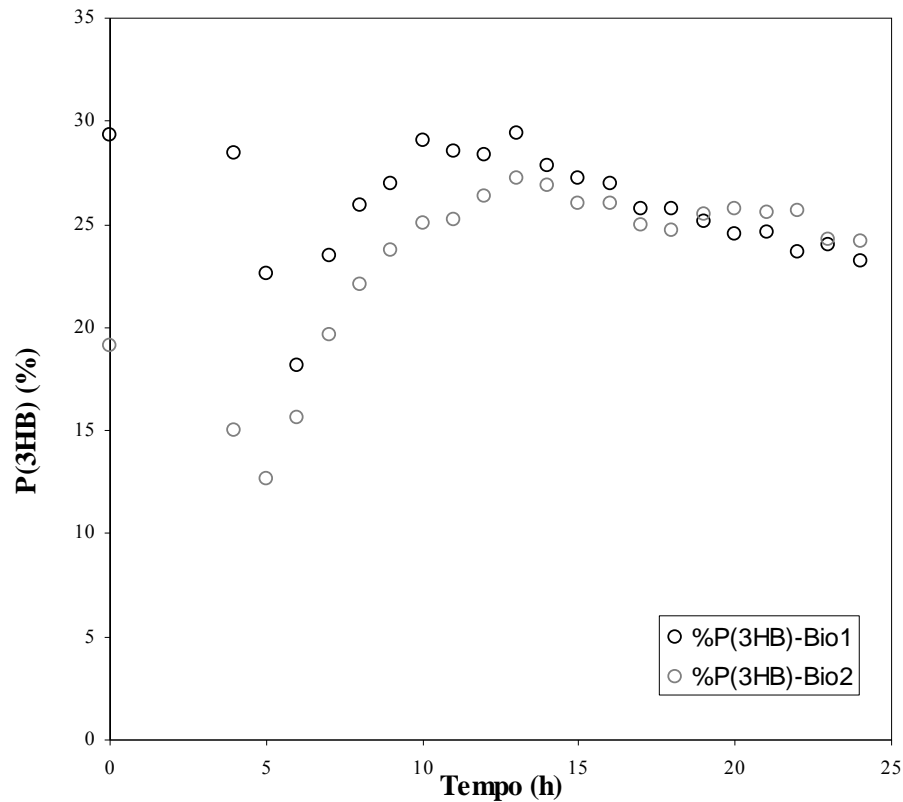


Figura 4.18: Porcentagem de P(3HB) acumulado nas células durante o cultivo em biorreator.

GAMBETTA, (2006) obteve acúmulo semelhante trabalhando em biorreator com a mesma bactéria e mesma fonte de carbono, porém não foi analisada a limitação de nitrogênio.

A Figura 4.19 mostra o consumo de sacarose medida pela soma da glicose e frutose, uma vez que durante a análise em HPLC ocorre a hidrólise da sacarose. Assim como o ocorrido para o experimento 4 em estufa incubadora rotatória, a sacarose foi praticamente consumida, alcançando valores próximos a 2 g/L. Pode-se observar também que o consumo de glicose foi mais rápido que o de frutose, indicando que existe a possibilidade da bactéria hidrolisar a sacarose externamente uma vez que a única fonte de açúcar é a sacarose. GAMBETTA (2006) trabalhando com a mesma bactéria e com sacarose como única fonte de carbono verificou que existem glicose e frutose no meio, mas não verificou um consumo preferencial.

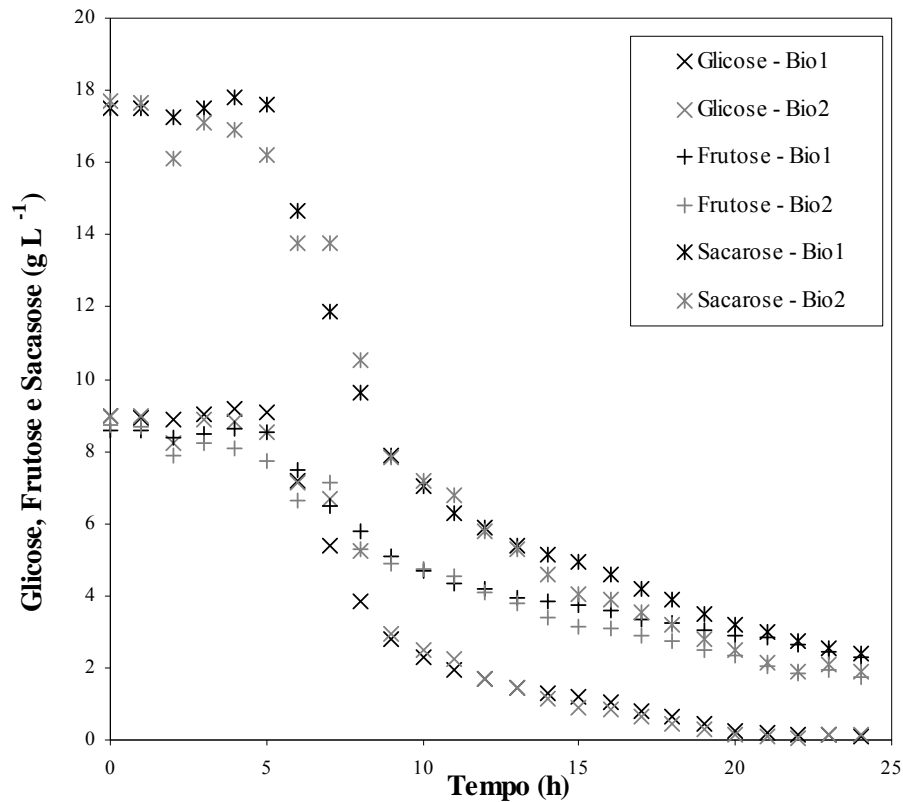


Figura 4.19: Consumo de açúcar durante o cultivo em biorreator.

O consumo de nitrogênio é mostrado na Figura 4.20, onde se pode observar que ocorreu limitação de nitrogênio a partir de 9 horas de cultivo, o que pode ter ocasionado formação de esporos e assim consumo de P(3HB), como mencionado anteriormente.

WU et al. (2001) sugerem que a limitação parece ter efeito inverso na bactéria *Bacillus megaterium*, pois não proporciona aumento no acúmulo como ocorre para outras bactérias produtoras de P(3HB).

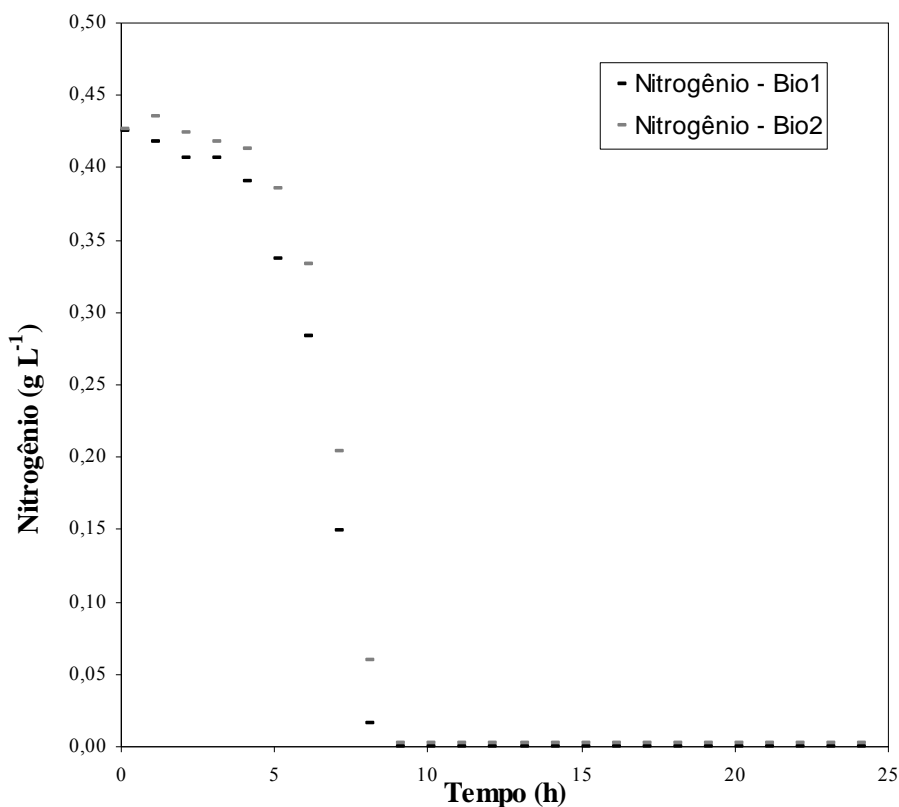


Figura 4.20: Consumo de nitrogênio durante o cultivo em biorreator.

O valor de pH, controlado durante o cultivo é mostrado na Figura 4.21 onde pode-se observar a pequena variação em torno do valor de referência (pH 7).

Na Figura 4.22 pode-se observar o consumo da solução de NaOH, variável manipulada para controle de pH. Nesta figura observa-se uma grande utilização de base até 9 horas onde ocorre um patamar pelas próximas 4 horas voltando a consumir base até o final do experimento. O início do patamar coincide com o término de nitrogênio disponível no meio. O consumo acentuado de base até 9 horas pode estar relacionado com a produção de P(3HB). A diferença entre os biorreatores é explicada pela molaridade da base, sendo a base utilizada no reator 2, mais concentrada que a utilizada no 1, porém não modificou o perfil de consumo. Também foi disponibilizado ácido para controle de pH, mas não foi consumido durante o experimento.

Experimentos com *B. cereus* mostraram que o pH próximo a 5 inibe o consumo de P(3HB) bem como a formação de esporos (VALAPPIL et al., 2007). Mais experimentos deverão ser realizados para testar esta hipótese para a *B. megaterium*.

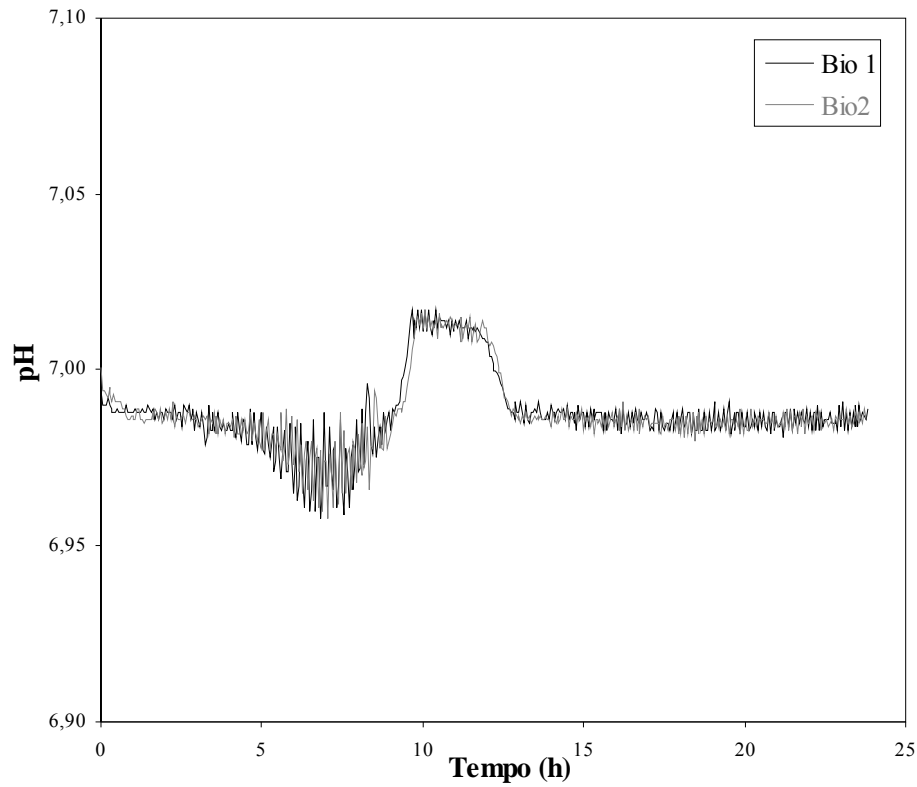


Figura 4.21: Variação de pH durante o cultivo em biorreator.

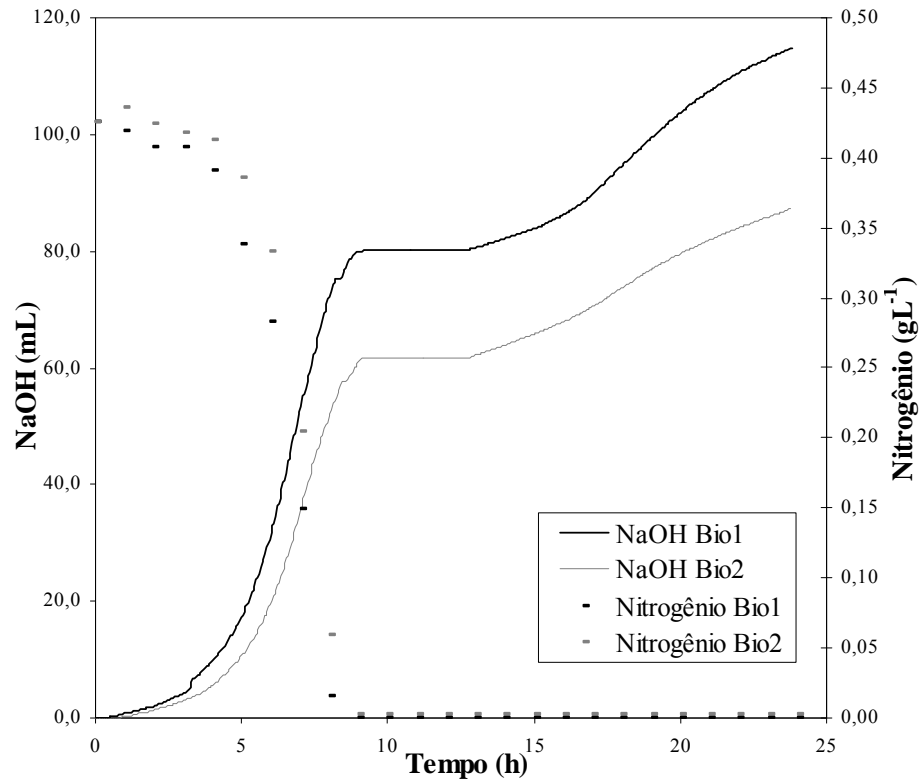


Figura 4.22: Consumo de NaOH para controle de pH ao longo do cultivo.

A Figura 4.23 mostra a variável controlada pO_2 e a variável manipulada rotação, que variou de 200 a 550 rpm durante o cultivo de modo a manter o pO_2 acima de 40%. Nota-se que a cerca de 9 horas de cultivo, ocorreu um pico significativo no pO_2 , o que pode estar associado a uma mudança de metabolismo. No mesmo tempo verificou-se término de nitrogênio e uma modificação na taxa de consumo de açúcar, que podem estar relacionados com o consumo de P(3HB).

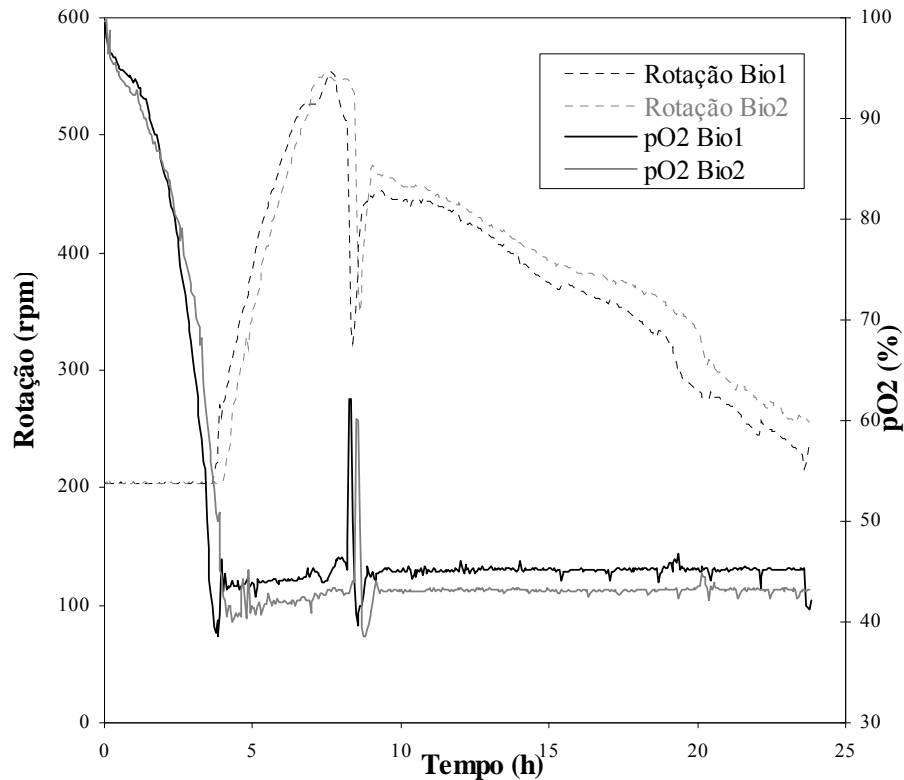


Figura 4.23: Percentual de oxigênio dissolvido e agitação durante o cultivo em biorreator.

Outro fato que deve ser considerado, já observado nos cultivos em estufa incubadora rotatória, é que há mudança de coloração no meio de cultivo, ou seja, a liberação de algum componente para o meio, tornando o meio rosado. Pode ser também rompimento celular ou pigmentação própria da bactéria, necessitando um estudo mais aprofundado para verificação.

Analisando-se os resultados de produção de P(3HB) obtidos em biorreator, observa-se que a produção foi muito inferior àquela obtida em estufa incubadora rotatória. Quando se trocou para o cultivo em biorreator, já se imaginava uma diferença nos resultados, principalmente devido à aceleração do metabolismo que ocorre pela maior aeração do meio. Esperava-se um crescimento celular maior e pelo menos a mesma quantidade percentual de polímero, uma vez que os experimentos em estufa incubadora rotatória mostraram que havia excedente de fonte de carbono e nitrogênio. Para melhorar a produção será necessário investigar a influência do pH, sendo talvez necessário a manutenção inicial do pH no valor 7, para crescimento celular e posterior queda até um valor que não prejudique a integridade da célula, mas que ocorra a inibição da formação de esporos. Além disso, pode-se testar

alimentação de meio de cultura de forma que não haja limitação de nitrogênio e de fonte de carbono.

4.3.3 Estimação de parâmetros e simulações

Os resultados da estimação dos parâmetros dos modelos mostrados no Capítulo 2 e para o modelo proposto no Capítulo 3 e o valor da função objetivo para cada modelo estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Parâmetros estimados para o modelo e valor da função objetiva de cada modelo.

Parâmetro	Unidade	MULCHADANI	RAJE	KHANNA	MODIFICADO
α		4,3335		2,2076	2,0606
γ	1/h	0,0054		0,0845	0,0849
eS				3,3574	
eN				2,4701	
k_0			0,4249		
k_1		0,4226		0,3558	0,4053
k_2	1/h	0,0014		4,64E-06	-0,0079
k_3		0,1385	0,1005		
k_4			0,0013		
k_5			0,0239		
k_6		0,0029	0,0861		
k_7		4,0166	2,1199		
k_8		1,7500	0,2107		
k_d	1/h				0,0073
K_S		0,0067			
K_{S1}	g/L		0,0727		
K_{S2}	g/L		2,4033		
K_{PS}	g/L		0,2771		
K_{SS}	g/L			0,1699	0,1928
K_{SN}	g/L			0,0754	0,0447
m			0,6486		
μ_m	1/h	0,7991		0,7871	0,7979
μ_1	1/h		0,6760		
μ_2	1/h		0,6046		
n		3,0585	1,9030		
nS				2,4953	
nN				1,4182	
m_N	1/h			3,44E-06	
NS_m		0,2977	0,2993		
N_m	g/L			7,1890	
S_m	g/L			80,7846	
X_{Rmin}	g/L		0,1317		
Y_{RN}				9,9446	10,6314
Função objetivo		2,5744	0,1776	0,2600	0,1575

Como se pode observar, a menor função objetivo foi obtida na estimação dos parâmetros com o modelo modificado. Seguido pelos modelos propostos por RAJE e SRIVASTAVA (1998), KHANNA e SRIVASTAVA (2005a) e Mulchadani (apud KHANNA e SRIVASTAVA (2005a)).

Para os modelos propostos por Mulchadani (apud KHANNA e SRIVASTAVA, 2005a) e RAJE e SRIVASTAVA (1998), calculou-se o valor de α e β em função das constantes dos respectivos modelos por substituição nas equações.

Com os parâmetros das equações foram feitas simulações utilizando todos os modelos descritos, que são mostradas juntamente com os pontos experimentais nas Figuras 4.24 a 4.29 para visualizar as predições do modelo. As variáveis utilizadas para estimação de parâmetros foram biomassa residual, concentração de polímero, concentração de açúcares totais e concentração de nitrogênio.

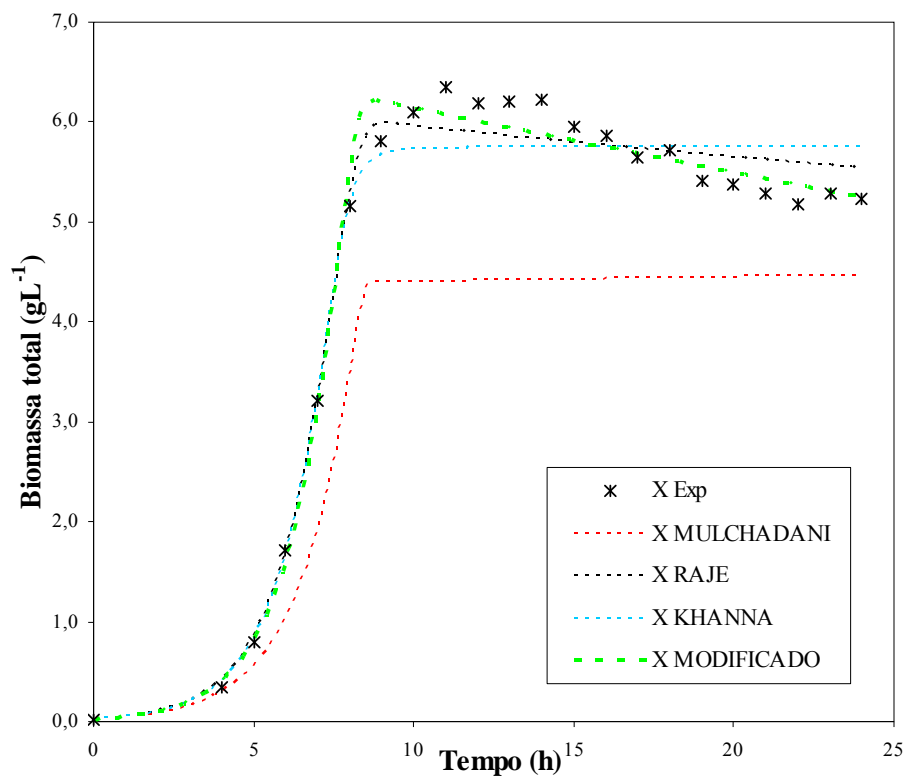


Figura 4.24: Simulação e pontos experimentais para formação de biomassa residual.

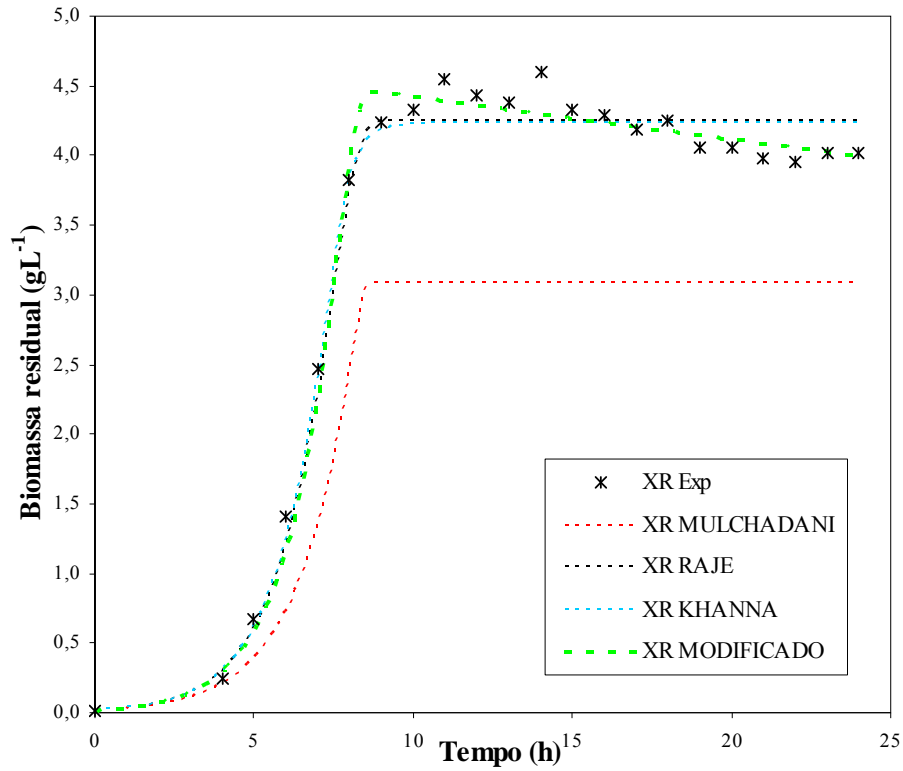


Figura 4.25: Simulação e pontos experimentais para formação de biomassa residual.

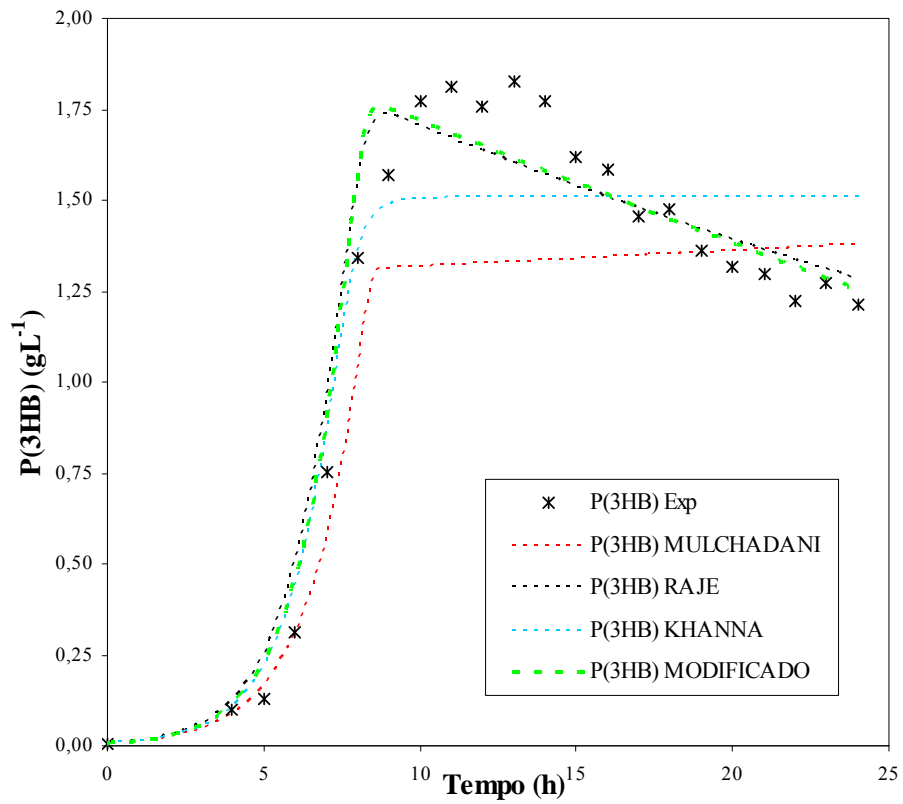


Figura 4.26: Simulação e pontos experimentais para formação de P(3HB).

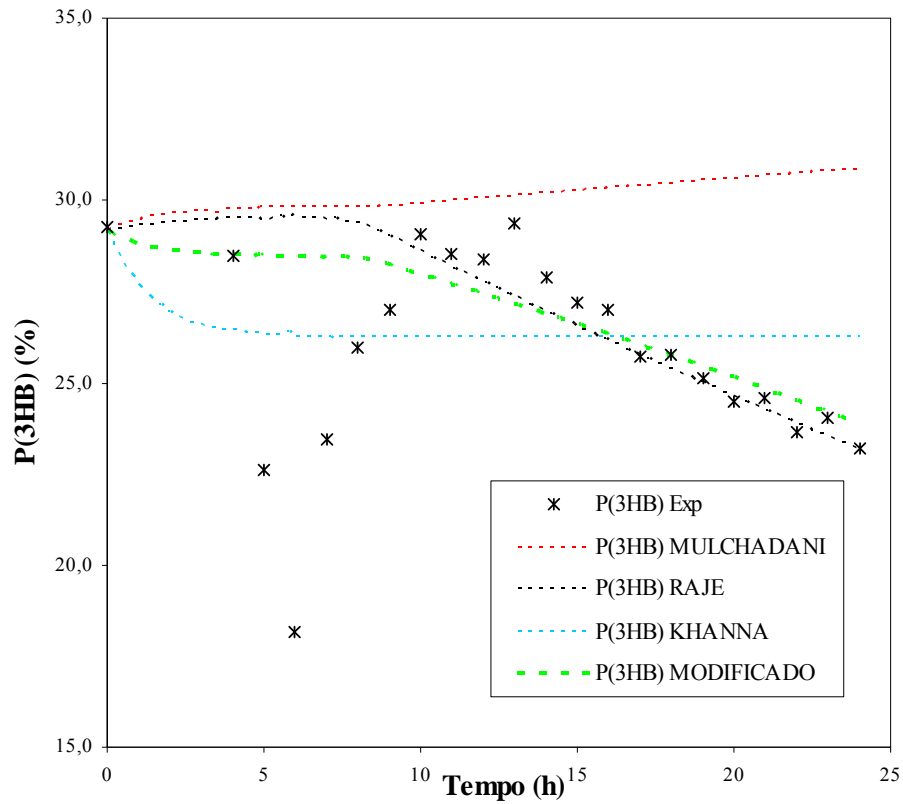


Figura 4.27: Simulação e pontos experimentais para acúmulo percentual de polímero.

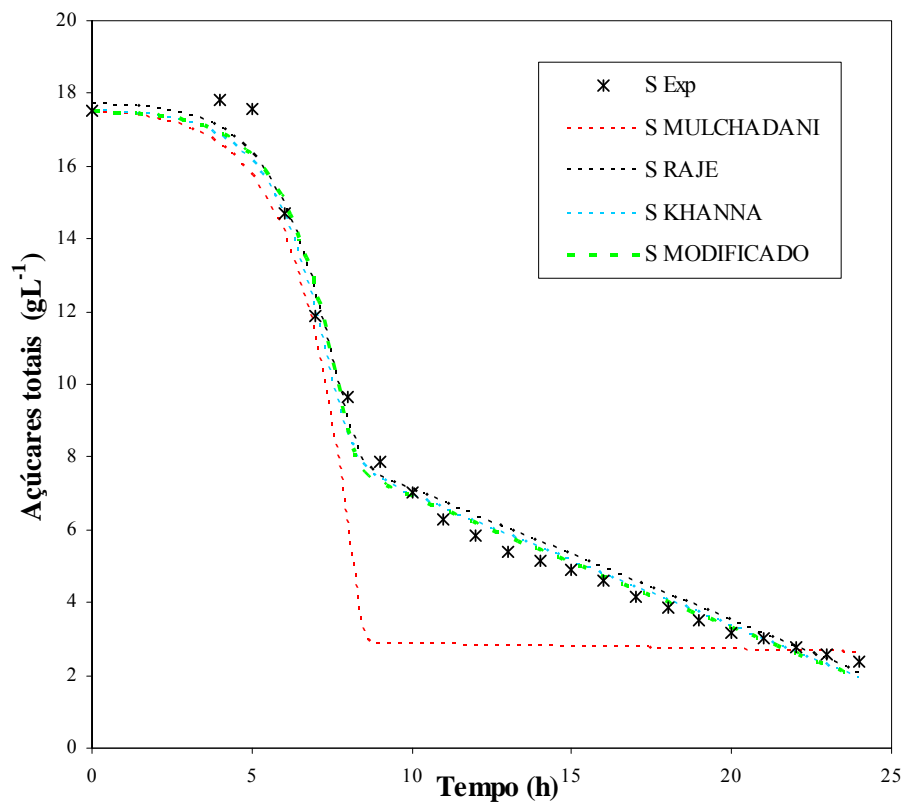


Figura 4.28: Simulação e pontos experimentais para consumo de açúcares totais.

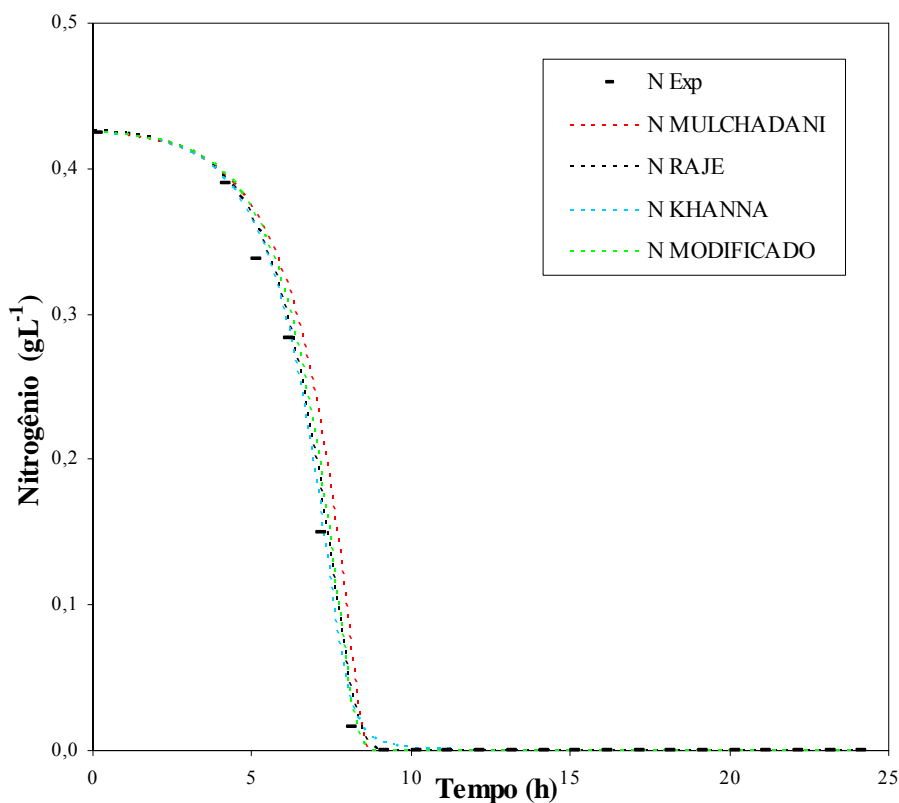


Figura 4.29: Simulação e pontos experimentais para o consumo de nitrogênio.

Analisando-se as Figuras 4.24 e 4.25 nota-se que o modelo proposto conseguiu descrever melhor a queda da biomassa total e residual no final do cultivo. A formação do polímero, Figura 4.26, conseguiu ser bem descrita pelo modelo modificado e pelo o modelo proposto por RAJE e SRIVASTAVA (1998), nota-se, porém, que no início do cultivo ambos os modelos estavam antecipados em relação à curva experimental. A porcentagem de polímero acumulado, calculado pela Equação 3.8, é mostrada na Figura 4.27, onde se observa que o percentual de biopolímero foi relativamente melhor descrito pelos modelos proposto por RAJE e SRIVASTAVA (1998) e o modelo modificado proposto nesta dissertação. Porém, estes modelos não prevêem as diferenças nas taxas de produção de biomassa e biopolímero nas primeiras 10 horas de cultivo, causando o comportamento observado na Figura 4.26 para este período.

No caso do consumo de açúcar (Figura 4.28), com exceção do modelo de MULCHADANI (apud KHANNA e SRIVASTAVA, 2005), os outros modelos tiveram o mesmo desempenho. O consumo de nitrogênio foi bem descrito por todos os modelos testados como e pode observar na Figura 4.29. Cabe salientar que o modelo proposto é o que apresenta menor número de parâmetros estimados.

4.3.4 Simulações das condições do planejamento de experimentos

A fim de testar o modelo proposto, fez-se simulações em que as condições iniciais de sacarose e nitrogênio foram as propostas no planejamento experimental realizado conforme a Tabela 3.3 descrita no Capítulo 3. Também realizou-se simulações com o modelo proposto por RAJE e SRIVASTAVA (1998), obtendo-se resultados similares e por isso não serão apresentadas neste trabalho. As simulações com o modelo proposto são apresentadas nas Figuras 4.30 a 4.35. Cabe ressaltar que os parâmetros do modelo foram estimados para a condição próxima ao ponto 4.

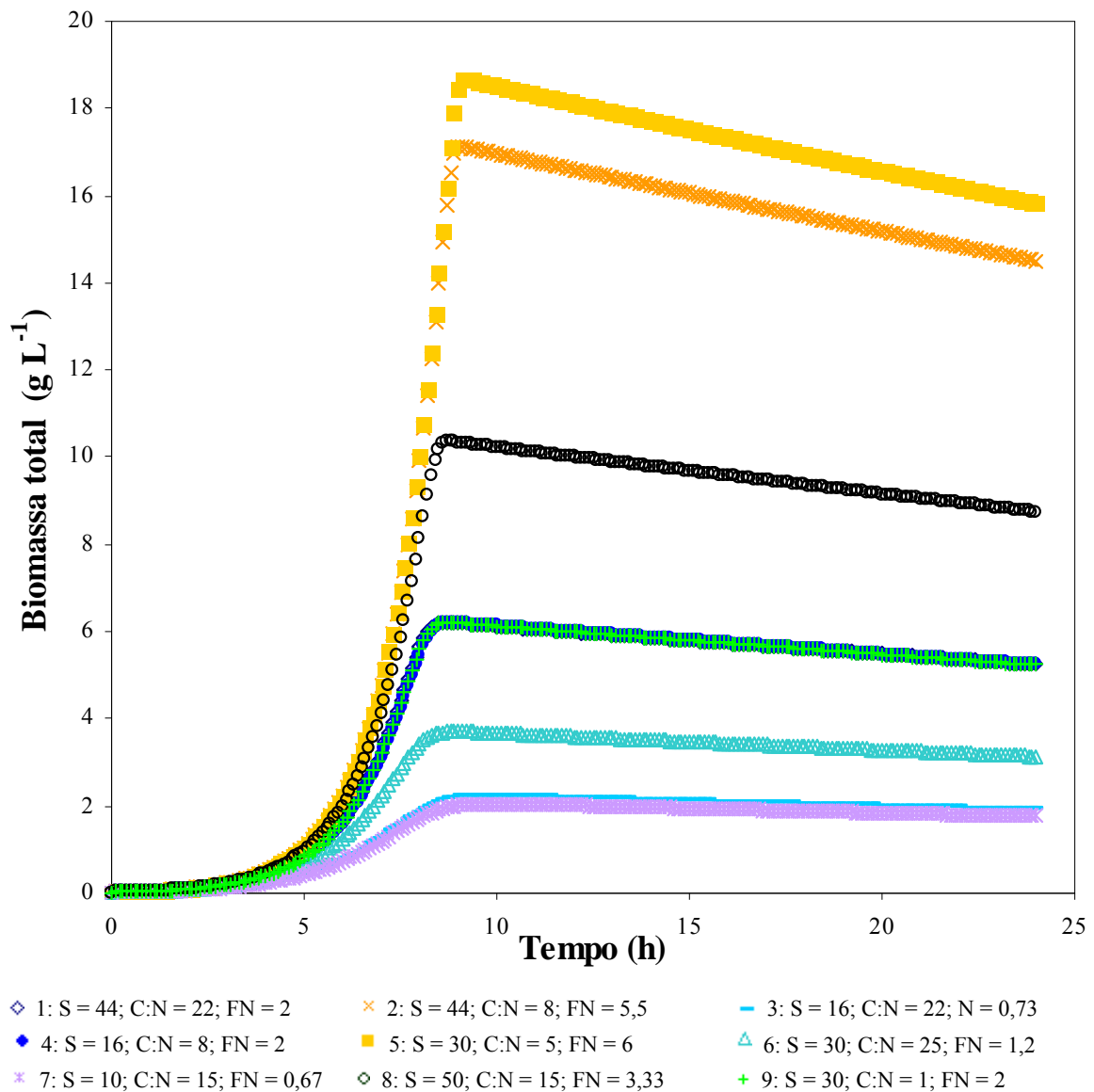


Figura 4.30: Simulações da biomassa total.

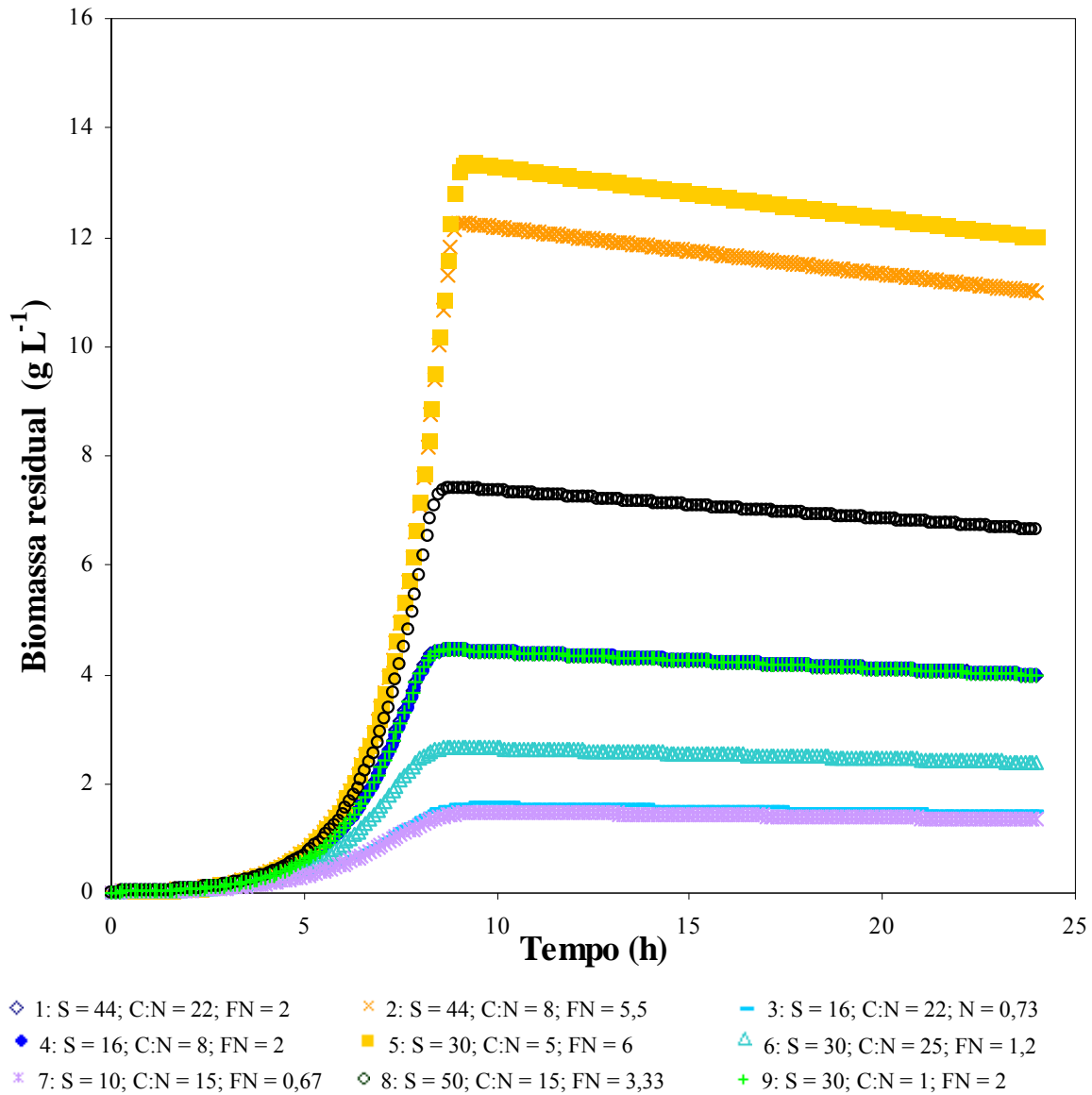


Figura 4.31: Simulações da biomassa residual.

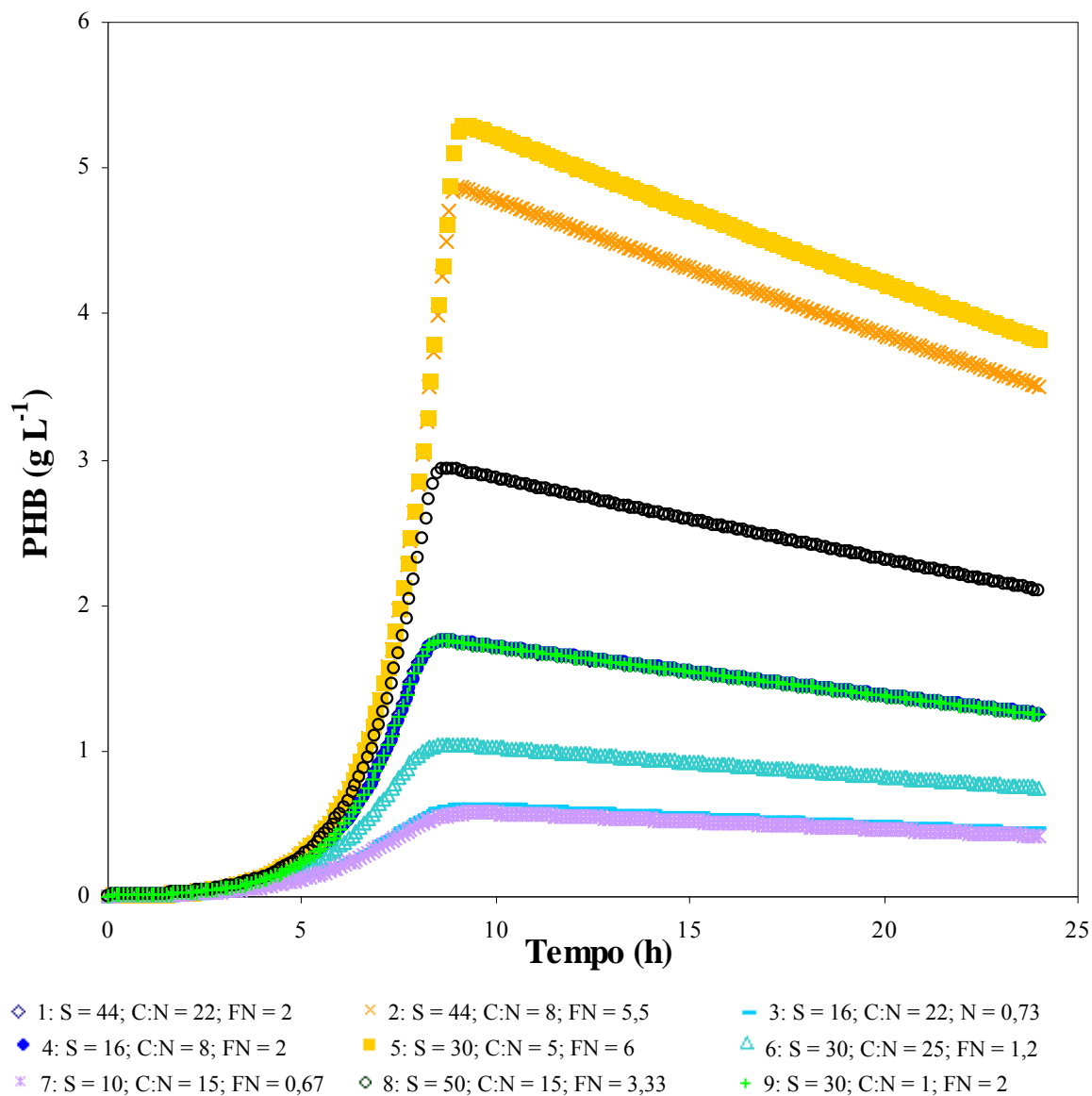


Figura 4.32: Simulações da produção e consumo de P(3HB).

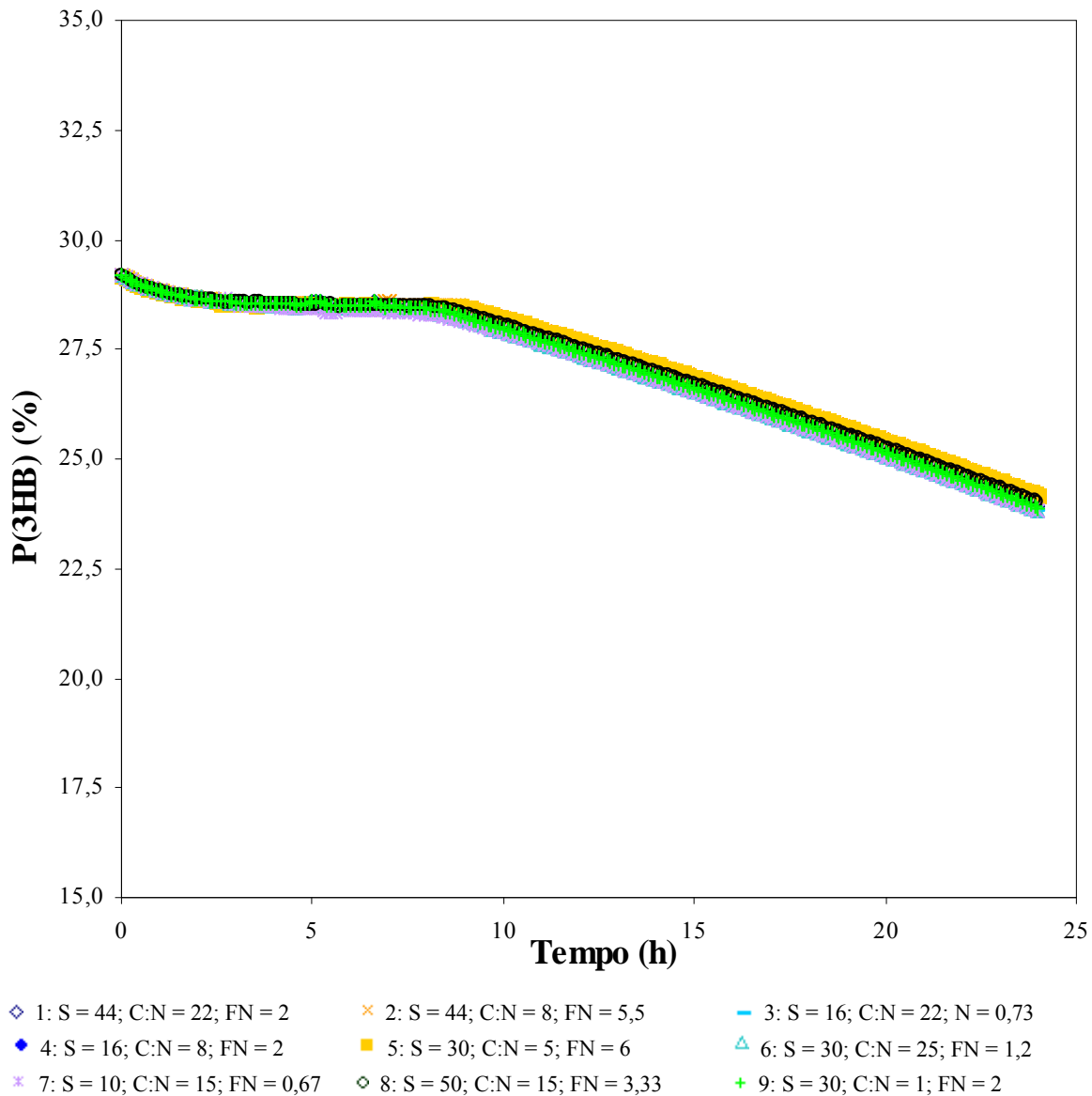


Figura 4.33: Simulações do percentual de acúmulo de P(3HB).

Os resultados das simulações da biomassa total e residual, Figuras 4.30 e 4.31, estão de acordo com o esperado, uma vez que os maiores crescimentos foram obtidos com as maiores concentrações de sacarose e nitrogênio no mesmo experimento. O mesmo ocorreu com a produção de polímero, Figura 4.32. Porém, esperava-se um percentual de acúmulo diferenciado em função das variações das condições de sacarose e nitrogênio, o que não foi verificado como se pode observar na Figura 4.33. Além de não prever, adequadamente, o consumo inicial e retomada de produção de polímero, a produção ficou mantida sempre em torno de 30% não obtendo valores diferenciados. Isto pode ser explicado pelo fato de o modelo não prever uma taxa variável para o consumo de biopolímero, em função das fases do cultivo, e pelo fato dos parâmetros serem estimados com um único ponto do planejamento de experimento, o único realizado em biorreator.

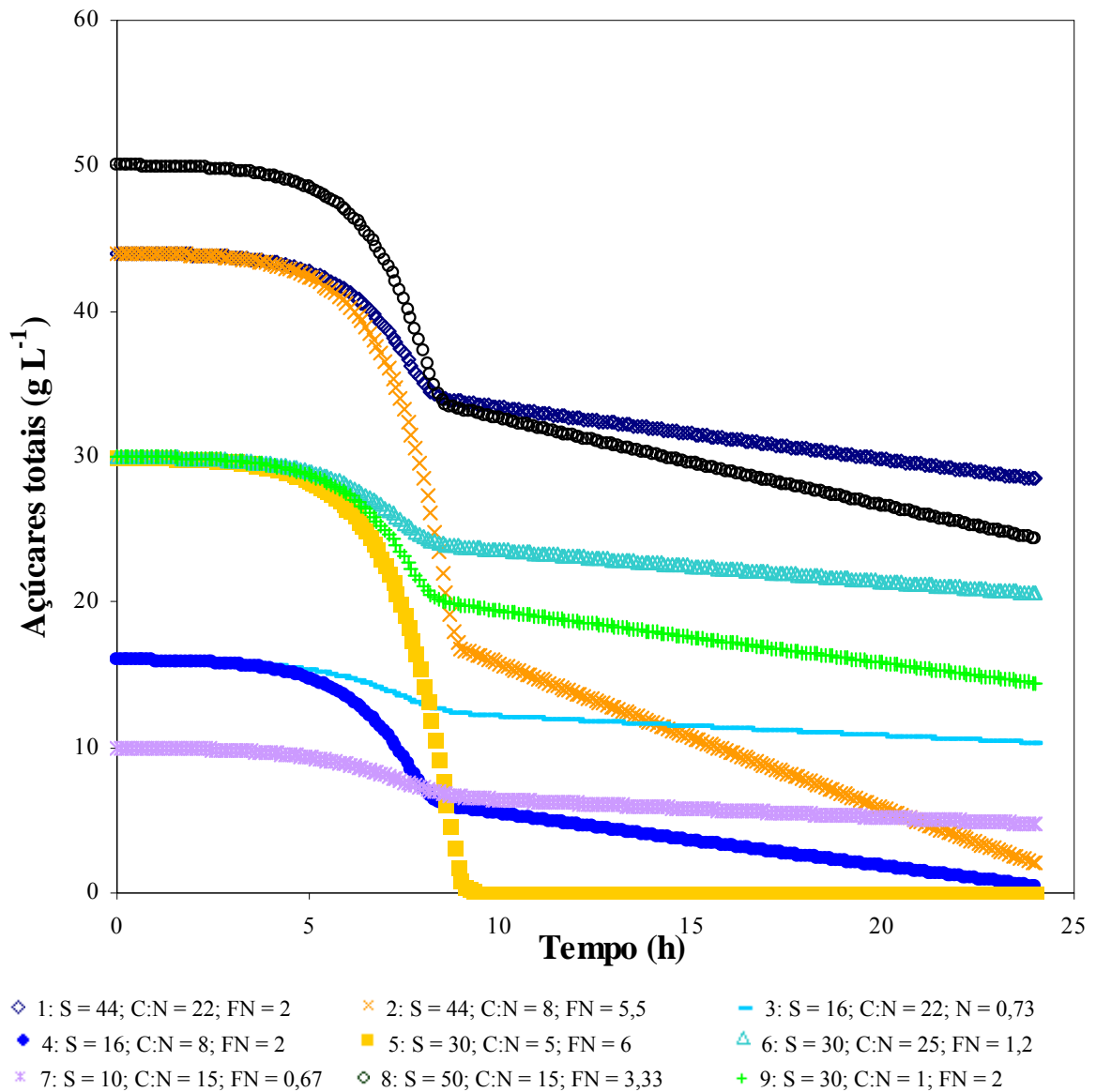


Figura 4.34: Simulações do consumo de açúcares totais.

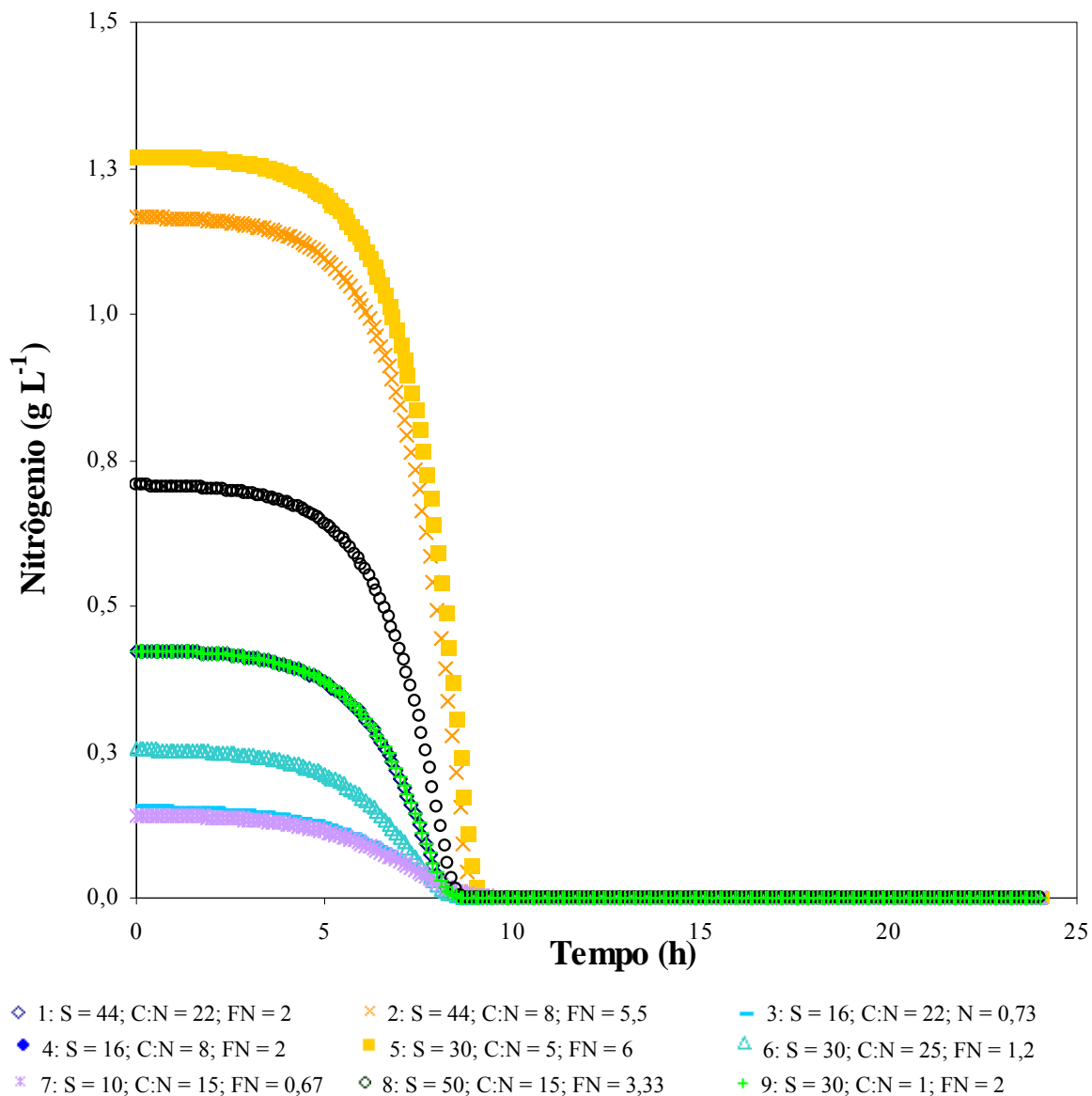


Figura 4.35: Simulações do consumo de nitrogênio.

Os resultados obtidos para o consumo de sacarose e nitrogênio, Figuras 4.34 e 4.35 respectivamente, mostraram valores adequados ao consumo para produção dos níveis de biomassa e polímero obtidos.

É necessário realizar melhorias no modelo proposto, especialmente para a equação de formação de polímero, além de realizar experimentos em outras condições para uma melhor estimativa dos parâmetros do modelo.

Capítulo 5

Conclusão

5.1 Considerações Finais

Neste trabalho foi possível estudar o comportamento da bactéria *Bacillus megaterium* crescendo em meio mineral com sacarose como fonte de carbono e sulfato de amônio como substrato limitante, em relação à formação de célula e à produção de poli(3-hidroxi-butirato) ou P(3HB).

Os experimentos em estufa incubadora rotatória mostraram que esta bactéria é capaz de acumular uma quantidade satisfatória de P(3HB) nas células mesmo sem limitação de nitrogênio, chegando próximo a 75%. Pôde-se observar também que o pH está fortemente correlacionado ao P(3HB), mostrando que o pH é uma variável importante para o acúmulo de polímero. Contudo, o fato das bactérias terem parado de crescer no experimento em estufa incubadora rotatória, mesmo sem limitação na fonte de carbono e nitrogênio, leva a considerar que poderia estar havendo algum tipo de inibição ou limitação de algum fator de crescimento, pois de outra forma deveria ainda ocorrer crescimento e produção. Um dos fatores que podem justificar este fato pode ser o pH, pois atingiu valores muito baixo, próximos a 4.

No experimento em biorreator atingiu-se um acúmulo de biopolímero próximo a 30%, muito inferior ao obtido em estufa incubadora rotatória. O experimento em biorreator mostrou que há consumo de polímero na fase inicial do crescimento, acúmulo durante a fase exponencial e início da estacionária, voltando a ocorrer o consumo no final do experimento. Esse consumo final pode estar relacionado com a limitação no nitrogênio. Quando ocorre limitação, a bactéria utilizada tem tendência a esporular, o que pode levar ao consumo do polímero formado.

Talvez a adição de nitrogênio durante o cultivo ou o aumento da quantidade inicial de nitrogênio venha a diminuir o consumo de polímero. A manutenção do pH em valores mais

baixos, durante todo o cultivo ou próximo à esporulação pode inibir a formação de esporos evitando o consumo de P(3HB).

O modelo proposto por RAJE e SRIVASTAVA (1998) e o modelo modificado nesta dissertação se mostraram adequados e conseguiram descrever bem o comportamento das variáveis. Sendo que o modelo modificado mostrou um desempenho um pouco melhor, obtendo o menor valor para a função objetivo. Pode-se melhorar ainda mais o modelo adicionando o efeito do pH na taxa de produção de biopolímero e a variação da taxa de consumo de biopolímero em função das fases do cultivo das células.

5.2 Sugestões para Trabalhos Futuros

Para complementar o trabalho, poderia se estudar a influência do pH no acúmulo e formação de esporos bem como a não limitação de nitrogênio e realizar experimentos em biorreator com concentrações de sacarose e nitrogênio diferentes para melhorar a estimação de parâmetros. Além disso, é necessário estudar e aprimorar as técnicas de extração de polímero da célula.

Com a realização de experimentos com maior acúmulo de P(3HB) pode-se obter massa suficiente para caracterizar o polímero em reômetro e analisar a distribuição de massas molares do biopolímero obtido.

Revisar e melhorar a modelagem fenomenológica do processo, com consumo de substratos, formação de células, produção de polímero, distribuição de massa molar, além de obter um modelo capaz de prever as propriedades do polímero obtido conforme as condições do cultivo também é uma atividade sugerida para fins de aplicações industriais.

Experimentos visando à obtenção de copolímeros para melhorar algumas propriedades do poli(3-hidroxibutirato) também são de grande valia.

Apêndice A

Estruturas de Polihidroxicanoatos

Na Figura A.1 e Figura A.2 pode-se observar a estrutura de 91 tipos diferentes de monômeros, hidroxicanoatos, que foram identificados até 1995.

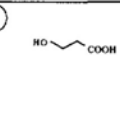
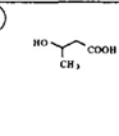
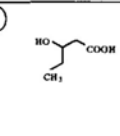
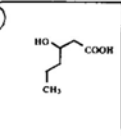
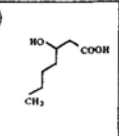
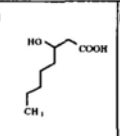
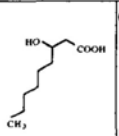
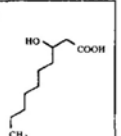
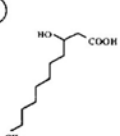
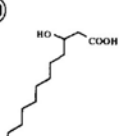
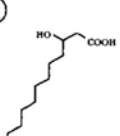
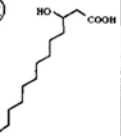
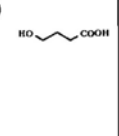
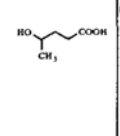
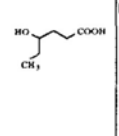
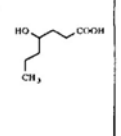
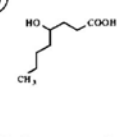
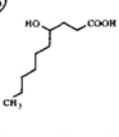
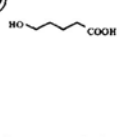
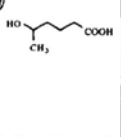
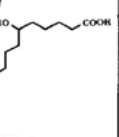
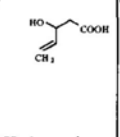
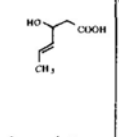
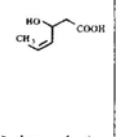
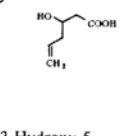
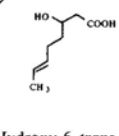
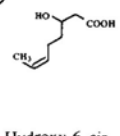
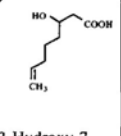
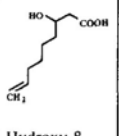
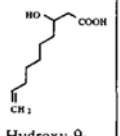
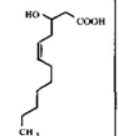
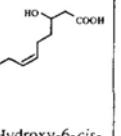
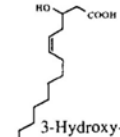
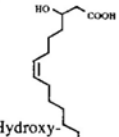
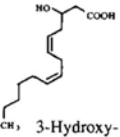
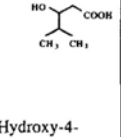
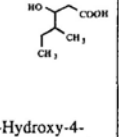
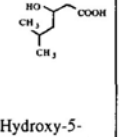
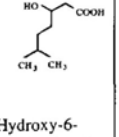
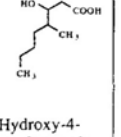
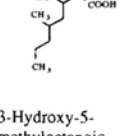
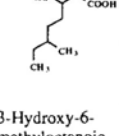
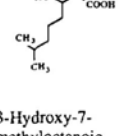
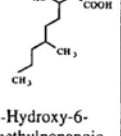
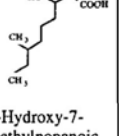
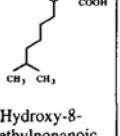
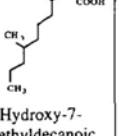
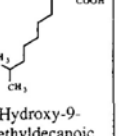
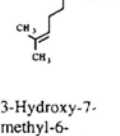
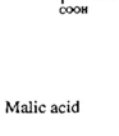
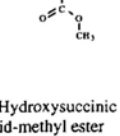
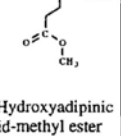
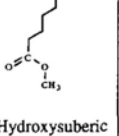
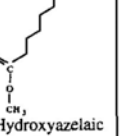
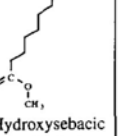
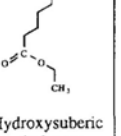
①  3-Hydroxypropionic acid	②  3-Hydroxybutyric acid	③  3-Hydroxyvaleric acid	④  3-Hydroxyhexanoic acid	⑤  3-Hydroxyheptanoic acid	⑥  3-Hydroxyoctanoic acid	⑦  3-Hydroxynonanoic acid	⑧  3-Hydroxydecanoic acid
⑨  3-Hydroxyundecanoic acid	⑩  3-Hydroxydodecanoic acid	⑪  3-Hydroxytetradecanoic acid	⑫  3-Hydroxyhexadecanoic acid	⑬  4-Hydroxybutyric acid	⑭  4-Hydroxyvaleric acid	⑮  4-Hydroxyhexanoic acid	⑯  4-Hydroxyheptanoic acid
⑰  4-Hydroxyoctanoic acid	⑱  4-Hydroxydecanoic acid	⑲  5-Hydroxyvaleric acid	⑳  5-Hydroxyhexanoic acid	㉑  6-Hydroxydodecanoic acid	㉒  3-Hydroxy-4-pentenoic acid	㉓  3-Hydroxy-4-trans-hexenoic acid	㉔  3-Hydroxy-4-cis-hexenoic acid
㉕  3-Hydroxy-5-hexenoic acid	㉖  3-Hydroxy-6-trans-octenoic acid	㉗  3-Hydroxy-6-cis-octenoic acid	㉘  3-Hydroxy-7-octenoic acid	㉙  3-Hydroxy-8-nonenoic acid	㉚  3-Hydroxy-9-decenoic acid	㉛  3-Hydroxy-5-cis-dodecenoic acid	㉜  3-Hydroxy-6-cis-dodecenoic acid
㉝  3-Hydroxy-5-cis-tetradecenoic acid	㉞  3-Hydroxy-7-cis-tetradecenoic acid	㉟  3-Hydroxy-5,8-cis-cis-tetradecenoic acid	㊱  3-Hydroxy-4-methylvaleric acid	㊲  3-Hydroxy-4-methylhexanoic acid	㊳  3-Hydroxy-5-methylhexanoic acid	㊴  3-Hydroxy-6-methylheptanoic acid	㊵  3-Hydroxy-4-methyloctanoic acid
㊶  3-Hydroxy-5-methyloctanoic acid	㊷  3-Hydroxy-6-methyloctanoic acid	㊸  3-Hydroxy-7-methyloctanoic acid	㊹  3-Hydroxy-6-methylnonanoic acid	㊺  3-Hydroxy-7-methylnonanoic acid	㊻  3-Hydroxy-8-methylnonanoic acid	㊼  3-Hydroxy-7-methyldecanoic acid	㊽  3-Hydroxy-9-methyldecanoic acid
㊾  3-Hydroxy-7-methyl-6-octenoic acid	㊿  Malic acid	51  3-Hydroxysuccinic acid-methyl ester	52  3-Hydroxyadipinic acid-methyl ester	53  3-Hydroxysebacic acid-methyl ester	54  3-Hydroxyazelaic acid-methyl ester	55  3-Hydroxysebacic acid-methyl ester	56  3-Hydroxysebacic acid-ethyl ester

Figura A.1: Diversidade de monômeros de PHAs (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).

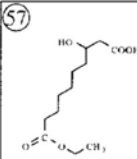
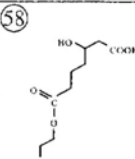
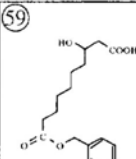
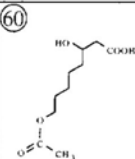
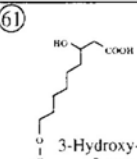
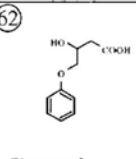
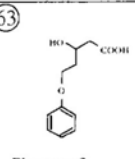
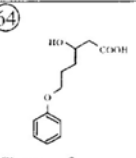
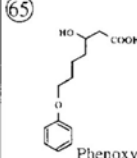
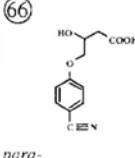
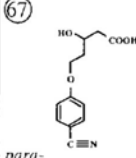
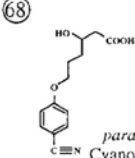
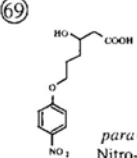
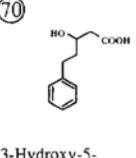
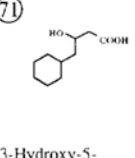
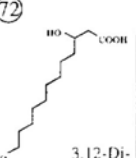
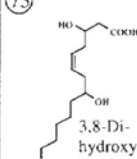
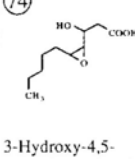
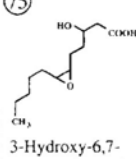
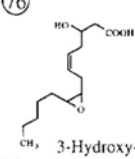
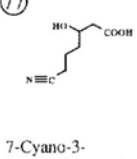
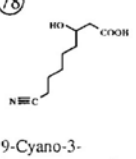
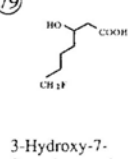
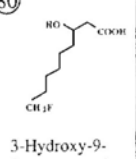
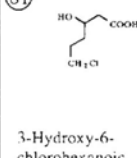
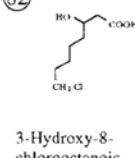
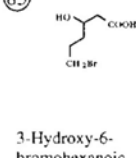
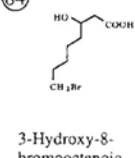
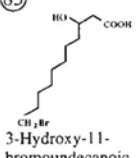
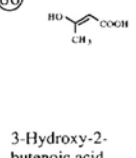
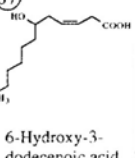
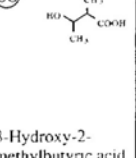
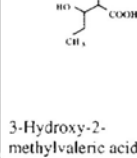
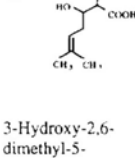
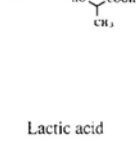
 <p>3-Hydroxysebacic acid-ethyl ester</p>	 <p>3-Hydroxypimelic acid-propyl ester</p>	 <p>3-Hydroxysebacic acid-benzyl ester</p>	 <p>3-Hydroxy-8-acetoxyoctanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-9-acetoxy-nonanoic acid</p>	 <p>Phenoxy-3-hydroxybutyric acid</p>	 <p>Phenoxy-3-hydroxyvaleric acid</p>	 <p>Phenoxy-3-hydroxyheptanoic acid</p>
 <p>3-hydroxyoctanoic acid</p>	 <p><i>para</i>-Cyanophenoxy-3-hydroxybutyric acid</p>	 <p><i>para</i>-Cyanophenoxy-3-hydroxyvaleric acid</p>	 <p><i>para</i>-Cyano-phenoxy-3-hydroxyhexanoic acid</p>	 <p><i>para</i>-Nitro-phenoxy-3-hydroxyhexanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-5-phenylvaleric acid</p>	 <p>3-Hydroxy-5-cyclohexylbutyric acid</p>	 <p>3,12-Dihydroxydodecanoic acid</p>
 <p>3,8-Di-hydroxy-5-<i>cis</i>-tetradecenoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-4,5-epoxydecanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-6,7-epoxydodecanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-8,9-epoxy-5,6-<i>cis</i>-tetradecenoic acid</p>	 <p>7-Cyano-3-hydroxyheptanoic acid</p>	 <p>9-Cyano-3-hydroxynonanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-7-fluoroheptanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-9-fluorononanoic acid</p>
 <p>3-Hydroxy-6-chlorohexanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-8-chlorooctanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-6-bromohexanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-8-bromooctanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-11-bromoundecanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-2-butyric acid</p>	 <p>6-Hydroxy-3-dodecenoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-2-methylbutyric acid</p>
 <p>3-Hydroxy-2-methylvaleric acid</p>	 <p>3-Hydroxy-2,6-dimethyl-5-heptenoic acid</p>	 <p>Lactic acid</p>					

Figura A.2: (continuação) Diversidade de monômeros de PHAs (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).

Apêndice B

Dados Experimentais Tabelados

Experimentos em Estufa Incubadora Rotatória

Nas Tabelas B1 a B7 são mostrados os dados experimentais dos cultivos realizados em estufa incubadora rotatória e os valores do desvio padrão de cada análise, calculados utilizando-se os valores do ponto central que foram realizados em triplicata.

Tabela B.1: Concentração de Biomassa total ao longo do cultivo em estufa incubadora rotatória.

Biomassa Total (g.L ⁻¹)	Tempo (h)							
	0	4	8	12	16	20	24	
Experimentos	1	0,027	0,59	2,93	4,25	5,14	4,93	5,09
	2	0,027	0,73	2,53	3,84	4,61	4,89	4,75
	3	0,027	0,64	2,95	2,93	2,74	2,11	2,14
	4	0,027	0,59	2,97	3,74	5,43	5,32	5,55
	5	0,027	0,54	2,65	4,06	4,83	5,18	4,69
	6	0,027	0,67	2,89	3,73	4,82	5,10	4,78
	7	0,027	0,68	3,09	2,73	2,37	2,10	1,84
	8	0,027	0,66	2,88	3,96	5,10	5,18	5,01
	9	0,027	0,70	2,87	3,80	5,00	5,04	4,99
Desvio Padrão		± 0,09	± 0,18	± 0,29	± 0,36	± 0,18	± 0,30	

Tabela B.2: Concentração de Biopolímero ao longo do cultivo em estufa incubadora rotatória.

Biopolímero (g.L ⁻¹)	Tempo (h)							
	0	4	8	12	16	20	24	
Experimentos	1	0,007	0,09	1,18	1,99	2,59	3,72	3,23
	2	0,007		0,99	1,69	2,28	3,62	3,23
	3	0,007	0,12	1,14	0,91	0,78	0,73	0,59
	4	0,007	0,12	1,18	1,55	2,83	3,69	3,86
	5	0,007	0,09	1,11	1,74	2,44	3,83	3,10
	6	0,007	0,12	1,02	1,57	2,38	3,38	3,05
	7	0,007	0,14	1,12	0,93	0,53	0,56	0,42
	8	0,007	0,09	1,10	1,80	2,46	3,61	3,02
	9	0,007	0,10	1,16	1,63	2,47	3,35	2,83
Desvio Padrão		± 0,01	± 0,09	± 0,08	± 0,21	± 0,23	± 0,13	

Tabela B.3: Concentração de Biomassa residual ao longo do cultivo em estufa incubadora rotatória.

Biomassa Residual (g.L ⁻¹)	Tempo (h)							
	0	4	8	12	16	20	24	
Experimentos	1	0,02	0,50	1,74	2,31	2,55	1,37	1,86
	2	0,02		1,54	2,15	2,33	1,27	1,53
	3	0,02	0,52	1,80	2,01	1,96	1,38	1,85
	4	0,02	0,47	1,79	2,19	2,60	1,63	1,68
	5	0,02	0,45	1,54	2,32	2,37	1,33	1,59
	6	0,02	0,55	1,87	2,16	2,44	1,71	1,74
	7	0,02	0,54	1,97	1,80	1,84	1,54	1,42
	8	0,02	0,56	1,78	2,25	2,60	1,57	1,99
	9	0,02	0,60	1,71	2,14	2,52	1,73	2,16
Desvio Padrão		± 0,09	± 0,10	± 0,17	± 0,15	± 0,17	± 0,17	

Tabela B.4: Percentual de Biopolímero acumulado nas células ao longo do cultivo em estufa incubadora rotatória.

Biopolímero (% em massa)	Tempo (h)							
	0	4	8	12	16	20	24	
Experimentos	1	25	15,6	40,5	46,3	50,4	75,5	63,4
	2	25		39,1	44,1	49,4	73,9	67,9
	3	25	18,9	38,9	31,2	28,4	34,7	28,3
	4	25	20,3	39,8	41,6	52,1	69,3	69,7
	5	25	16,7	42,0	42,9	50,7	74,3	66,2
	6	25	18,1	35,3	42,0	49,4	66,4	63,7
	7	25	20,8	36,3	34,0	22,4	26,7	22,9
	8	25	14,2	38,3	43,1	48,6	69,7	60,3
	9	25	14,8	40,4	43,6	49,5	66,4	56,7
Desvio Padrão		± 2,1	± 0,7	± 1,0	± 0,6	± 2,8	± 0,6	

Tabela B.5: Concentração de Açúcares totais ao longo do cultivo em estufa incubadora rotatória.

Açúcares Totais (g.L ⁻¹)	Tempo (h)							
	0	4	8	12	16	20	24	
Experimentos	1	44	46,2	44,9	37,2	31,9	30,0	28,6
	2	44	40,5	41,4	33,6	30,2	28,2	25,6
	3	16	14,9	13,5	10,6	9,7	5,8	7,1
	4	16	16,3	15,2	9,2	5,4	3,4	2,1
	5	30	26,6	26,6	20,2	17,5	12,0	12,4
	6	30	29,4	32,5	25,2	21,0	16,8	17,3
	7	10	9,0	6,3	5,4	4,8	3,7	3,8
	8	50	39,7	44,3	42,6	41,8	33,7	32,5
	9	30	30,2	27,2	23,7	20,4	20,6	18,2
Desvio Padrão		± 0,7	± 1,2	± 0,5	± 1,0	± 0,3	± 3,7	

Tabela B.6: Concentração de Nitrogênio ao longo do cultivo em estufa incubadora rotatória.

Nitrogênio (g.L ⁻¹)	Tempo (h)							
	0	4	8	12	16	20	24	
Experimentos	1	0,42	0,45	0,26	0,25	0,21	0,24	0,26
	2	1,17	1,23	1,03	1,12	1,00	0,90	0,91
	3	0,15	0,14	0,01	0,02	0,03	0,05	0,00
	4	0,42	0,44	0,27	0,27	0,21	0,24	0,19
	5	1,27	1,24	1,32	1,19	1,15	0,97	0,96
	6	0,25	0,26	0,13	0,10	0,08	0,07	0,08
	7	0,14	0,12	0,00	0,02	0,03	0,00	0,00
	8	0,70	0,70	0,58	0,54	0,53	0,57	0,56
	9	0,42	0,43	0,36	0,27	0,23	0,24	0,23
Desvio Padrão		± 0,02	± 0,02	± 0,02	± 0,02	± 0,01	± 0,02	

Tabela B.7: Variação de pH ao longo do cultivo em estufa incubadora rotatória.

pH	Tempo (h)							
	0	4	8	12	16	20	24	
Experimentos	1	7	6,7	5,0	4,6	4,5	3,8	3,7
	2	7	6,6	5,0	4,6	4,6	4,0	3,7
	3	7	6,8	5,1	5,9	5,9	5,4	5,0
	4	7	6,7	5,0	4,9	4,6	4,7	4,3
	5	7	6,6	4,9	4,6	4,5	4,0	3,8
	6	7	6,7	5,0	4,8	4,6	4,3	3,9
	7	7	6,8	5,2	5,9	6,0	5,3	5,2
	8	7	6,7	5,0	4,7	4,5	4,1	3,7
	9	7	6,7	5,0	4,8	4,6	4,2	3,9
Desvio Padrão		± 0,01	± 0,02	± 0,04	± 0,05	± 0,17	± 0,07	

Experimentos em Biorreator

A Tabela B.8 mostra os dados do cultivo em biorreator e a Tabela B.9 apresenta os dados adquiridos pelo MATLAB durante o cultivo.

Tabela B.8: Dados experimentais do cultivo em Biorreator.

Tempo (h)	Biomassa Total (gL⁻¹)	Biomassa Residual (gL⁻¹)	PHB (gL⁻¹)	PHB (%)	Nitrogênio (gL⁻¹)	Glicose (gL⁻¹)	Frutose (gL⁻¹)	Sacarose (gL⁻¹)
0	0,02	0,02	0,01	29,3	0,425	9,0	8,6	17,5
1	0,04	-	-	-	0,418	8,9	8,6	17,5
2	0,09	-	-	-	0,407	8,9	8,4	17,2
3	0,19	-	-	-	0,407	9,0	8,5	17,5
4	0,35	0,25	0,10	28,5	0,390	9,2	8,6	17,8
5	0,80	0,67	0,13	22,6	0,338	9,1	8,5	17,6
6	1,72	1,40	0,31	18,2	0,283	7,2	7,5	14,7
7	3,22	2,46	0,75	23,5	0,149	5,4	6,5	11,9
8	5,16	3,82	1,34	25,9	0,016	3,9	5,8	9,6
9	5,82	4,24	1,57	27,0	0	2,8	5,1	7,9
10	6,09	4,32	1,77	29,1	0	2,3	4,7	7,0
11	6,36	4,55	1,81	28,5	0	1,9	4,4	6,3
12	6,19	4,43	1,76	28,4	0	1,7	4,2	5,9
13	6,21	4,38	1,83	29,4	0	1,5	3,9	5,4
14	6,22	4,60	1,77	27,9	0	1,3	3,8	5,1
15	5,95	4,33	1,62	27,2	0	1,2	3,7	4,9
16	5,87	4,29	1,58	27,0	0	1,0	3,6	4,6
17	5,64	4,19	1,45	25,7	0	0,8	3,4	4,2
18	5,72	4,25	1,47	25,7	0	0,6	3,3	3,9
19	5,42	4,06	1,36	25,1	0	0,4	3,1	3,5
20	5,38	4,06	1,32	24,5	0	0,3	2,9	3,2
21	5,28	3,98	1,30	24,6	0	0,2	2,8	3,0
22	5,17	3,95	1,22	23,6	0	0,1	2,6	2,8
23	5,29	4,02	1,27	24,0	0	0,1	2,4	2,6
24	5,23	4,02	1,21	23,2	0	0,1	2,3	2,4

Tabela B.9: Dados experimentais do cultivo em biorreator adquiridos pelo MATLAB.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	pH	pO ₂ (%)	H ₃ PO ₄ (mL)	NaOH (mL)
0,0	29,9	203,8	6,99	99,86	0	0,00
0,5	30,0	204,6	6,99	95,22	0	0,15
1,0	30,0	204,6	6,99	93,62	0	0,80
1,5	30,0	203,6	6,99	90,41	0	1,30
2,0	30,0	204,2	6,99	85,36	0	2,00
2,5	30,0	204,1	6,99	77,99	0	3,00
3,0	30,0	204,6	6,99	66,20	0	4,15
3,5	30,0	204,5	6,99	47,32	0	7,40
3,7	30,0	221,0	6,98	38,89	0	8,50
4,0	30,0	259,6	6,99	46,22	0	9,70
4,5	30,0	328,2	6,99	43,57	0	12,85
5,0	30,0	384,7	6,99	43,91	0	17,35
5,5	30,0	439,9	6,98	44,04	0	23,75
6,0	30,0	477,0	6,97	44,15	0	30,55
6,5	30,0	515,4	6,96	44,14	0	40,80
7,0	30,0	525,8	6,97	45,31	0	53,45
7,1	30,0	526,1	6,98	44,94	0	55,10
7,2	30,0	526,4	6,97	44,89	0	56,30
7,3	30,0	532,1	6,98	44,38	0	58,75
7,4	30,0	539,9	6,97	44,01	0	60,45
7,5	30,0	550,0	6,97	44,10	0	62,65
7,6	30,0	553,8	6,98	44,58	0	65,20
7,7	30,0	554,6	6,97	45,01	0	66,15
7,8	30,0	550,7	6,98	45,45	0	68,30
7,9	30,0	538,9	6,97	46,11	0	69,80
8,0	29,9	527,2	6,99	46,18	0	71,95
8,1	29,9	515,8	6,97	46,14	0	73,05
8,2	30,0	512,3	6,97	45,10	0	74,50
8,3	29,9	427,2	7,00	62,08	0	75,20
8,4	29,8	323,2	6,98	50,00	0	75,30
8,5	29,9	358,6	6,98	40,66	0	76,45
8,6	30,0	403,4	6,98	40,87	0	77,20
8,7	30,1	433,4	6,98	41,57	0	78,65
8,8	30,1	442,0	6,99	44,26	0	79,25
8,9	30,0	441,7	6,99	45,61	0	79,60
9,0	30,0	448,2	6,98	44,38	0	79,85
9,1	30,0	450,4	6,99	44,35	0	79,95
9,2	30,0	451,8	6,99	44,80	0	80,10
9,3	30,0	451,9	6,99	45,07	0	80,15
9,4	30,0	452,3	7,00	45,11	0	80,15
9,5	30,0	448,9	7,00	45,19	0	80,15
10,0	30,0	447,2	7,02	44,94	0	80,15
10,5	30,0	443,5	7,01	45,14	0	80,15
11,0	30,0	443,5	7,01	45,01	0	80,15
11,5	30,0	437,3	7,01	45,11	0	80,15
12,0	30,0	431,6	7,01	45,03	0	80,15
12,5	30,0	424,1	7,00	44,88	0	80,15
13,0	30,0	415,0	6,99	45,27	0	80,65
13,5	30,0	406,7	6,99	45,22	0	81,35
14,0	30,0	396,7	6,99	45,22	0	82,20
14,5	30,0	383,4	6,99	45,25	0	82,95
15,0	30,0	373,0	6,98	45,34	0	83,95
15,5	30,0	373,4	6,99	44,98	0	85,00
16,0	30,0	368,6	6,99	45,16	0	86,15
16,5	30,0	362,9	6,99	45,15	0	87,80
17,0	30,0	356,4	6,99	45,12	0	89,75
17,5	30,0	353,2	6,98	45,19	0	92,00
18,0	30,0	344,9	6,98	45,14	0	94,45
18,5	30,0	332,2	6,98	45,28	0	96,90
19,0	30,0	326,8	6,99	45,36	0	99,30
19,5	30,0	295,7	6,99	45,46	0	101,30
20,0	30,0	284,0	6,98	45,11	0	103,50
20,5	30,0	280,4	6,99	44,98	0	105,65
21,0	30,0	270,4	6,99	45,31	0	107,50
21,5	30,0	261,6	6,98	45,32	0	108,90
22,0	30,0	246,4	6,98	45,37	0	110,40
22,5	30,0	249,0	6,99	45,15	0	111,85
23,0	30,0	240,5	6,98	45,20	0	113,00
23,5	30,0	230,9	6,99	45,24	0	114,15
24,0	30,0	234,4	6,99	42,22	0	115,25

A Tabela B.10 mostra os dados do cultivo em biorreator da duplicata, com as mesmas condições iniciais da anterior, e a Tabela B.11 apresenta os dados adquiridos pelo MATLAB durante o cultivo da duplicata.

Tabela B.10: Dados experimentais do cultivo em Biorreator (Duplicata).

Tempo (h)	Biomassa Total (gL⁻¹)	Biomassa Residual (gL⁻¹)	PHB (gL⁻¹)	PHB (%)	Nitrogênio (gL⁻¹)	Glicose (gL⁻¹)	Frutose (gL⁻¹)	Sacarose (gL⁻¹)
0	0,02	0,05	0,00	19,1	0,426	9,0	8,7	17,7
1	0,04	-	-	-	0,436	9,0	8,7	17,6
2	0,07	-	-	-	0,424	8,2	7,9	16,1
3	0,16	-	-	-	0,418	8,9	8,2	17,1
4	0,29	-	-	-	0,413	8,8	8,1	16,9
5	0,59	0,41	0,19	12,7	0,386	8,5	7,7	16,2
6	1,32	0,90	0,41	15,6	0,333	7,1	6,6	13,8
7	2,64	1,86	0,78	19,7	0,204	6,7	7,1	13,8
8	4,67	3,69	0,98	22,1	0,059	5,3	5,3	10,5
9	5,84	4,45	1,39	23,7	0	2,9	4,9	7,8
10	6,26	4,69	1,57	25,1	0	2,5	4,7	7,2
11	6,44	5,14	1,30	25,3	0	2,2	4,5	6,8
12	6,58	4,85	1,73	26,4	0	1,7	4,1	5,8
13	6,42	4,67	1,75	27,3	0	1,5	3,8	5,3
14	6,33	4,64	1,70	26,8	0	1,2	3,4	4,6
15	6,33	4,69	1,65	26,0	0	0,9	3,1	4,0
16	6,15	4,55	1,60	26,0	0	0,8	3,1	3,9
17	6,06	4,54	1,52	25,0	0	0,6	2,9	3,5
18	5,88	4,75	1,17	24,7	0	0,5	2,8	3,2
19	5,72	4,26	1,46	25,5	0	0,3	2,5	2,8
20	5,62	4,46	1,16	25,7	0	0,2	2,3	2,5
21	5,60	4,88	1,45	25,6	0	0,1	2,1	2,2
22	5,47	4,07	1,40	25,6	0	0,1	1,8	1,9
23	5,45	4,78	1,32	24,3	0	0,1	2,0	2,1
24	5,39	4,08	1,30	24,2	0	0,1	1,7	1,9

Tabela B.11: Dados do cultivo em biorreator adquiridos pelo MATLAB (Duplicata).

Tempo (h)	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	pH	pO ₂ (%)	H ₃ PO ₄ (mL)	NaOH (mL)
0,0	29,9	204,2	7,00	99,70	0	0,00
0,5	30,0	203,9	6,99	94,56	0	0,00
1,0	30,0	204,5	6,99	92,26	0	0,25
1,5	30,0	204,1	6,99	88,70	0	0,80
2,0	30,0	204,0	6,99	85,67	0	1,30
2,5	30,0	204,0	6,99	79,81	0	2,05
3,0	30,0	204,1	6,99	72,58	0	2,95
3,5	30,0	203,6	6,99	58,50	0	4,05
3,8	30,0	204,1	6,98	50,92	0	4,75
4,0	30,0	203,6	6,99	44,62	0	5,55
4,5	30,0	289,4	6,99	40,51	0	7,85
5,0	30,0	350,0	6,98	41,46	0	10,65
5,5	30,0	404,9	6,98	42,86	0	14,55
6,0	30,0	450,7	6,97	42,00	0	19,35
6,5	30,0	494,8	6,98	42,11	0	26,60
7,0	30,0	538,7	6,97	42,05	0	35,65
7,1	30,0	541,8	6,96	42,30	0	36,20
7,2	30,0	546,0	6,97	42,60	0	38,40
7,3	30,0	550,2	6,98	42,83	0	40,55
7,4	30,0	549,0	6,96	42,81	0	42,00
7,5	30,0	551,5	6,97	42,75	0	43,80
7,6	30,0	549,5	6,97	43,08	0	46,25
7,7	30,0	547,9	6,98	43,32	0	48,05
7,8	30,0	546,8	6,98	43,04	0	49,55
7,9	30,0	546,2	6,97	43,16	0	50,65
8,0	30,0	545,8	6,97	43,18	0	52,15
8,1	30,0	547,2	6,99	42,94	0	53,85
8,2	30,0	546,4	6,97	42,79	0	54,85
8,3	30,0	542,0	6,97	43,49	0	56,10
8,4	30,0	535,1	6,98	43,95	0	57,55
8,5	29,8	370,2	6,99	60,02	0	57,80
8,6	29,7	362,9	6,98	42,16	0	58,05
8,7	29,9	403,1	6,98	38,60	0	58,90
8,9	30,0	438,2	6,99	39,27	0	60,05
9,0	30,1	461,4	6,98	40,64	0	60,70
9,1	30,1	474,6	6,99	41,96	0	61,35
9,2	30,0	467,8	6,99	44,03	0	61,60
9,3	30,0	467,3	6,99	42,88	0	61,65
9,4	30,0	466,0	6,99	43,27	0	61,65
9,5	30,0	466,0	6,99	43,11	0	61,65
9,5	30,0	465,4	7,00	43,07	0	61,65
10,0	30,0	457,2	7,01	43,10	0	61,65
10,5	30,0	457,2	7,02	43,03	0	61,65
11,0	30,0	452,0	7,01	43,21	0	61,65
11,5	30,0	446,4	7,01	43,18	0	61,65
12,0	30,0	441,8	7,01	43,21	0	61,65
12,5	30,0	432,4	7,00	43,12	0	61,65
13,0	30,0	422,5	6,99	43,31	0	62,20
13,5	30,0	418,8	6,99	42,91	0	63,00
14,0	30,0	408,2	6,98	43,40	0	63,90
14,5	30,0	402,7	6,99	42,99	0	64,90
15,1	30,0	392,9	6,99	43,11	0	65,95
15,5	30,0	388,8	6,99	43,06	0	66,90
16,0	30,0	383,2	6,99	43,30	0	67,85
16,5	30,0	381,6	6,99	43,18	0	69,15
17,0	30,0	377,2	6,99	43,16	0	70,55
17,5	30,0	376,7	6,99	43,09	0	71,95
18,0	30,0	369,1	6,99	43,24	0	73,65
18,5	30,0	364,1	6,99	43,27	0	75,30
19,0	30,0	354,5	6,99	43,17	0	76,90
19,5	30,0	348,5	6,99	43,20	0	78,20
20,0	30,0	335,0	6,98	43,33	0	79,50
20,5	30,0	307,0	6,99	43,21	0	80,75
21,0	30,0	292,0	6,98	43,21	0	81,95
21,5	30,0	287,9	6,98	43,09	0	82,90
22,0	30,0	277,2	6,99	43,21	0	84,00
22,5	30,0	273,0	6,99	42,84	0	84,95
23,0	30,0	260,5	6,99	43,43	0	85,90
23,5	30,0	260,2	6,99	43,12	0	86,70
24,0	30,0	252,2	6,99	43,34	0	87,45

Na Tabela B.12, são apresentados os dados dos experimentos realizados para obtenção dos valores do coeficiente de transferência de massa ($k_L a$).

Tabela B.12: Dados experimentais de obtenção do $k_L a$.

Agitação rpm	Aeração L min⁻¹	Aeração vvm	$k_L a$ s⁻¹	$k_L a$ s⁻¹	$k_L a_{\text{médio}}$ s⁻¹	$k_L a_{\text{médio}}$ h⁻¹
300	2,8	0,7	0,013	0,014	0,014	48,8
300	7,2	1,8	0,016	0,016	0,016	57,6
700	2,8	0,7	0,024	0,023	0,024	84,6
700	7,2	1,8	0,028	0,028	0,028	101,9
500	2	0,5	0,021	0,024	0,022	80,8
500	8	2	0,030	0,030	0,030	106,4
200	5	1,25	0,009	0,009	0,009	31,1
800	5	1,25	0,024	0,025	0,024	87,5
500	5	1,25	0,021	0,022	0,022	77,8
500	5	1,25	0,024	0,022	0,023	83,7
500	5	1,25	0,024	0,024	0,024	86,0

Referências Bibliográficas

- AMASS, W.; AMASS, A.; TIGHE, B. A Review of Biodegradable Polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. *Polymer International*, v. 47, n. 2, p. 89-144 (1998).
- ANDERSON, A. J. e DAWES, E. A. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, v. 54, n. 4, p. 450-472 (1990).
- ASLIM, B.; YÜKSEKDAG, Z. N.; BEYATLI, Y. Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*, Special Issue, p. 24-30 (2002).
- BRAUNEGG, G.; BONA, R.; KOLLER, M. Sustainable Polymer Production. *Polymer-Plastic technology and Engineering*, v. 43, n. 6, p. 1779-1793 (2004).
- DAWES, E. A. e SENIOR, P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol*, n. 10, p. 135-266 (1973).
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356 (1956).
- FINDLAY, R. H. e WHITE, D. C. Polymeric Beta-hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 45, n. 1, p. 71-78 (1983).
- FULL, T. D.; JUNG, D. O.; MADIGAN, M. T. Production of poly- β -hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. *Letters in Applied Microbiology*, n. 43, p. 377-384 (2006).
- GAMBETTA, R. Análise teórica e experimental da curva de distribuição de massas molares do poli((R)-3-hidróxi-butirato) produzido pela bactéria *Alcaligenes latus*. Programa de Engenharia Química da COPPE / UFRJ (2006).
- GOUDA, M. K.; SWELLAM, A. E.; Omar, S. H. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, v. 156, n. 3, p. 201-207 (2001)

- HOLMES, P.A., LIM, G. B. Separation process. U.S. Patent 4.910.145 (1990).
- HOLMES, P.A. Applications of PHB biodegradable thermoplastic- a microbially produced. *Phys. Technol.* v. 16, p. 32-36 (1985)
- HUANG, R. e REUSCH, N. Poly(3-hydroxybutyrate) Is Associated with Specific Proteins in the Cytoplasm and Membranes of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 36, supl. 6, pp. 22196–22202 (1996).
- JENDROSSEK, d.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H. G. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, n. 46, p. 451-463 (1996).
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. A Simple Structured Mathematical Model for Biopolymer (PHB) Production. *Biotechnol. Prog.*, n. 21, p. 830-838 (2005a).
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Computer simulated fed-batch cultivation for over production of PHB: A comparison of simultaneous and alternate feeding of carbon and nitrogen. *Biochemical Engineering Journal*, n. 27, p. 197-203 (2005b).
- KOLYBABA, M. A.; TABIL, L. G.; PANIGRAHI, S. A. Recent developments in the Biopolymer Industry. *Anais da North Central ASAE/CSAE Conference*, Manitoba, Canada (2004).
- LEE, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, p. 1-14 (1996a).
- LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Tibtech*, v. 14, p. 431-438 (1996b).
- LEE, T. R.; LIN, J. S.; WANG, S. S.; SHAW, G. C. PhaQ, a new class of Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) - responsive repressor, regulates *phaQ* and *phaP* (phasin) expression in *Bacillus megaterium* through interaction with PHB. *Journal of Bacteriology*, v. 186, n. 10, p. 3015-3021 (2004).
- LENZ, R. W. e MARCHESSAULT, R. H. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules*, v. 6, n. 1, p. 1-8 (2005).
- LÓPEZ, N. I.; PETTINARI M. J.; MÉNDEZ B. S. Detection of reserve polymer synthesis genes in natural bacterial populations. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 22, p. 129-136 (1997).
- LUENGO, J. M.; GARCÍA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARROY, G.; OLIVEIRA, E. R. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, n. 6, p. 251–260 (2003).

- MADISON, L. I.; HUISMAN, G. W. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): from DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 63, n. 1, p. 21-53 (1999).
- MARTIN, D. P.; WILLIAMS, S. F. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochemical Engineering Journal*, v. 16, p. 97-105 (2003).
- MCCOOL, G. J.; FERNANDEZ, T.; LI, N.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiology Letters*, n. 138, p. 41-48 (1996).
- MCCOOL, G. J. e CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*, v. 181, n. 2, p. 585-592 (1999).
- MCCOOL, G. J. e CANNON, M. C. PhaC and PhaR are required for Polyhydroxyalkanoic Acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 14, p. 4235-4243 (2001).
- MERRICK, J. M.; STEGER, R.; DOMBROSKI, D. Hydrolysis of native poly(hydroxybutyrate) granules (PHB), crystalline PHB, and artificial amorphous PHB granules by intracellular and extracellular depolymerases. *International Journal of Biological Macromolecules*, n. 25, p. 129-134 (1999).
- MORAWETZ, H. *Polymers: the Origins and Growth of a Science*; John Wiley, New York (1985).
- OMAR, S.; RAYES, A.; EQAAB, A.; VOß, I.; STEINBÜCHEL, A. Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. *Biotechnology Letters*, n. 23, p. 1119-1123 (2001).
- PATWARDHAN, P R; SRIVASTAVA, A K. Model-based fed-batch cultivation of *R. eutropha* for enhanced biopolymer production. *Biochemical Engineering Journal*, v. 20, p. 21-28 (2004).
- RAJE, P.; SRIVASTAVA, A. K. Updated mathematical model and fed-batch strategies for poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by *Alcaligenes eutrophus*. *Bioresource Technology*, n. 64, p. 185-192 (1998).
- RAMSAY, J. A.; BERGER, E.; VOYER, R.; CHAVARIE, C.; RAMSAY, B.A. Extraction of Poly-3-hidroxitubirato using chlorinated solvents. *Biotechnology Techniques*, v. 8, n. 8, p. 589-594 (1994).

- REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, v. 87, p. 137-146 (2003).
- REHM, B. H. A. e STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, n. 25, p. 3-19 (1999).
- REHM, B. H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics, *Biochem. J.*, n. 376, p. 15-33 (2003).
- RIIS, V. e MAI, W. Gas chromatographic determination of poly-P-hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography*, n. 445, p. 285-289 (1988).
- SLEPECKY, R. A. e LAW, J. H. Synthesis and degradation of Poly-3-hydroxybutyric Acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*, v. 82, p. 37-42 (1961)
- STEINBÜCHEL, A; VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, v. 128, p. 219-228 (1995).
- STEINBÜCHEL, A. Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. *Macromolecular Bioscience*, v. 1, n. 1, p. 1-23 (2001).
- STUBBE, J.; TIAN, J.; HE, A.; SINSKEY, A.J.; LAWRENCE, A.G.; LIU, P. Nontemplate-Dependent Polymerization Processes: Polyhydroxyalkanoate Synthases as a Paradigm. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 74, p. 433-480 (2005).
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, v. 25, p. 1503-1555 (2000).
- TERADA, M. e MARCHESSAULT, R.H. Determination of solubility parameters for poly(3-hydroxyalkanoates). *International Journal of Biological Macromolecules*, n. 25, p. 207-215 (1999).
- VALAPPIL, S. P.; BOCCACCINI, A. R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*. N. 91, p. 1-17 (2007).
- VAZQUEZ, G. J.; PETTINARI, M. J.; MÉNDEZ B. S. Evidence of an association between poly(3-hydroxybutyrate) accumulation and phosphotransbutyrylase expression in *Bacillus megaterium*. *Int. Microbiol.*, n. 6, p. 127-129(2003).

-
- WANG, F. e 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. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, p. 3703-3706 (1997).
- WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, v. 39, n. 8, p. 971-974 (1967).
- WU, Q.; HUANG, H.; HU, G.; CHEN, J. HO, K.P.; CHEN, G.Q. Production of Poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus sp.* JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek*, n. 80, p. 111–118 (2001).
- ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 53, p. 5-21(2001).