



MODELAGEM DA PRODUÇÃO DE P(3HB) POR *BACILLUS MEGATERIUM*

Débora Jung Luvizetto Faccin¹, Nilo Sérgio Medeiros Cardozo¹, Rosane Rech², Marco Antônio Záchia Ayub², Argimiro Resende Secchi³.

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Departamento de Engenharia Química,
R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - Brasil,
E-mail: {debora, nilo}@enq.ufrgs.br; marianapc84@gmail.com.

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA); Porto Alegre - RS - Brasil, E-mail: {rrech, mazyub}@ufrgs.br.

³ Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE/ UFRJ) - Programa de Engenharia Química,
Rio de Janeiro - RJ - Brasil, E-mail: arge@peq.coppe.ufrj.br.

Resumo: O Poli(3-hidroxitirato) – P(3HB) - é um poliéster sintetizado por inúmeras bactérias e armazenado como corpos de inclusão nas células como reserva de energia. O P(3HB) é produzido a partir de fontes renováveis e sua principal característica é a biodegradabilidade. Modelou-se o bioprocessamento da produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* em cultivo submerso sem controle do pH do meio. Modelos de cinética microbiana, produção de polímero e consumo de substratos foram estudados, propondo-se modificações a fim de inserir a influência do pH do meio de cultivo no modelo. Os modelos foram implementados no software EMSO. Os parâmetros dos modelos foram estimados com os dados obtidos em biorreator de bancada. O modelo H inibidor foi o que melhor representou o bioprocessamento.

Palavras-chave: Poli(3-hidroxitirato), biopolímeros, modelagem, *Bacillus megaterium*.

1 Introdução

Os plásticos são materiais ideais para a produção de diversos bens de consumo devido à sua durabilidade e resistência à degradação. No entanto, estas mesmas qualidades são causas de problemas ambientais e de gestão de resíduos. Com isso, o interesse no desenvolvimento de polímeros biodegradáveis tem aumentado consideravelmente (FULL et al., 2006).

O Poli(3-hidroxitirato) ou P(3HB) está entre os biopolímeros de maior interesse por ser um poliéster biodegradável com propriedades semelhantes ao polipropileno (LEE, 1996). O P(3HB) é produzido intracelularmente por diversas bactérias com objetivo de armazenamento de energia. A obtenção envolve complexas rotas metabólicas que são influenciadas pelas condições do meio de cultivo (LUENGO et al., 2003; REDDY et al., 2003). Assim, a modelagem do sistema apresenta-se como uma ferramenta para o estudo deste bioprocessamento.

Em razão da complexidade dos bioprocessos (que envolvem leis físico-químicas, bioquímicas e genéticas) a sua modelagem matemática é, geralmente, baseada em hipóteses simplificadoras. Assim, os modelos podem representar corretamente somente um número limitado de propriedades do processo (RAJE e SRIVASTAVA, 1998; SCHMIDELL et al., 2001).

O objetivo principal deste trabalho é estudar modelos matemáticos capazes de descrever adequadamente

o comportamento da bactéria *Bacillus megaterium* na produção do biopolímero Poli(3-hidroxitirato). Os modelos foram implementados no software EMSO (Environment for Modeling, Simulation and Optimization) onde foram realizadas tanto a etapa de estimação dos parâmetros dos modelos como as simulações.

2. Materiais e Métodos

Os dados experimentais utilizados foram obtidos com a bactéria *B. megaterium*, DSM 32^T, em cultivo submerso sem controle do pH do meio de cultura. Foi utilizado meio mineral com adição de açúcar e nitrogênio como principais nutrientes (FACCIN, 2007; FACCIN et al., 2009).

O modelo utilizado para descrição da produção de biopolímero é baseado nas equações de balanço apresentadas na Tabela 1, onde X , R , P , S e N representam, respectivamente, as concentrações de biomassa total, biomassa residual, polímero acumulado, sacarose e nitrogênio, e μ_x é a taxa de crescimento específica.

Tabela 1. Modelo do bioprocesso de obtenção de P(3HB).

Biomassa total	$X = R + P$
Biomassa residual	$\frac{dR}{dt} = (\mu_x - k_d) \cdot R$
P(3HB)	$\frac{dP}{dt} = (k_1 \cdot \mu_x + k_2) \cdot$
Sacarose	$\frac{dS}{dt} = -(\alpha \cdot \mu_x + \gamma) \cdot$
Nitrogênio	$\frac{dN}{dt} = -\frac{\mu_x}{Y_{X/N}} \cdot R$
*pH	$pH = 7 - (k_{pH} \cdot P)$
*Hidrogênio	$H = 10^{-pH}$

* somente para os modelos que utilizam o pH

Os demais parâmetros e variáveis que aparecem nas equações das Tabelas 1 e 2, por questões de espaço, são descritos na lista de variáveis no final deste artigo.

A partir das equações básicas apresentadas na Tabela 1 foram testados 4 modelos, os quais se diferenciam na expressão utilizada para μ_x (Tabela 2). As expressões propostas para μ_x foram desenvolvidas a partir de outras expressões existentes na literatura para a influência de processos inibitórios (SCHMIDELL et al., 2001) e para ação do pH do meio na produção de ácido láctico (AKERBERG et al., 1998).

Estimação dos Parâmetros e Simulação: A estimação dos parâmetros do modelo foi feita no EMSO (Soares e Secchi, 2003), utilizando o método dos poliedros flexíveis (Nelder e Mead, 1964).

A seguinte função objetivo foi utilizada:

$$FObj = \sum_j \sum_i \left((C_{i,j} - \tilde{C}_{i,j})^2 / \sigma_j^2 \right)$$

onde $C_{i,j}$ e $\tilde{C}_{i,j}$ representam, respectivamente, os valores experimental e predito pelo modelo da concentração da espécie j (com j = X, P, S ou N para o modelo sem pH e j = X, P, S, N e H (ou pH) para os demais modelos) no i-ésimo ponto experimental e σ_j é o desvio padrão do instrumento de medida.

A simulação também foi realizada no EMSO, utilizando o integrador DASSLC para a resolução das equações algébrico-diferenciais (SECCHI, 2008).

3. Resultados e Discussões

Os resultados da estimação dos parâmetros dos modelos analisados e o valor da função objetivo para cada modelo estão apresentados na Tabela 3

Pode ser observado que o menor valor da função objetivo foi obtida para o modelo H inibidor com pequena diferença comparando-se ao AKEBERG. Cabe salientar que o modelo H_inibidor possui um número de parâmetros menor que o AKERBERG.

Analisando-se o resultado para o modelo Sem pH, observa-se que o valor da função objetivo não foi muito diferente podendo ser considerada satisfatória e além disso, possui o menor número de parâmetros dentre os modelos testados. Porém, este modelo não pode ser considerado numa comparação direta deste índice, pois não utiliza a variável pH (ou H) em suas equações e, desta forma, sua função objetivo não leva em consideração a diferença na predição do valor de pH em relação aos dados experimentais, assim apresenta um termo a menos na função objetivo.

Tabela2. Equações para taxa de crescimento específica μ_x .

Sem pH	$\mu_x = \mu_m \left(\frac{S}{K_{SS} + S} \right) \cdot \left(\frac{N}{K_{NS} + N} \right)$
H inibidor	$\mu_x = \mu_m \left(\frac{S}{K_{SS} + S} \right) \cdot \left(\frac{N}{K_{NS} + N} \right) \cdot \left(1 - \frac{H}{H_m} \right)$
pH inibidor	$\mu_x = \mu_m \left(\frac{S}{K_{SS} + S} \right) \cdot \left(\frac{N}{K_{NS} + N} \right) \cdot \left(\frac{pH}{pH_{\min}} - 1 \right)$
AKERBERG	$\mu_x = \mu_m \left(\frac{S}{K_{SS} + S} \right) \cdot \left(\frac{N}{K_{NS} + N} \right) \cdot \left(\frac{1}{1 + (k_{1H} / H) + k_{2H} \cdot H} \right)$

Tabela 3. Parâmetros estimados e valor da função objetivo para cada modelo

Parâmetro	Unidade	Sem pH	AKERBERG	H inibidor	pH inibidor
K_{SS}	$g L^{-1}$	0,1043	0,6900	0,2567	1,1987
K_{SN}	$g L^{-1}$	0,1804	0,4588	0,0099	0,0009
μ_m	s^{-1}	1,0613	3,0002	0,7638	1,3759
α		1,8999	1,6297	1,6756	1,7662
γ	s^{-1}	0,0102	0,0009	0,0837	0,0052
K_1	$g g^{-1}$	0,3657	0,3034	0,3005	0,2614
K_2	s^{-1}	-0,0071	-0,0041	0,0154	0,0211
$Y_{X/N}$	$g g^{-1}$	8,8120	12,1613	10,8677	11,3548
k_d	s^{-1}	0,0780	0,1417	0,0766	0,1004
H_m	$g L^{-1}$	-		3,60E-05	
k_{pH}	$L g^{-1}$	-	1,9377	1,9227	1,8357
pH_{min}		-		-	4,1417
k_{1H}	$g L^{-1}$	-	1,173E-07	-	-
k_{2H}	$L g^{-1}$	-	7,691E+04	-	-
Função Objetivo		1,6200	1,3608	1,3291	4,0641

Na Tabela 4 é mostrado o valor do coeficiente de determinação (R^2) para cada modelo. O coeficiente de determinação é uma medida relativa de adequação do ajuste de um modelo e indica a relação entre a variação explicada pelo modelo e a variação total da variável dependente. Observando a Tabela 4 novamente é possível verificar que os modelos de AKERBERG e H_inibidor apresentaram os melhores resultados, ambos modelos explicam pelo menos 98% da variância dos dados experimentais para a maioria das variáveis, com exceção da variável pH que possui um R^2 menor, em torno de 0,93.

Tabela 4. Valores de coeficiente de determinação(R^2) para cada modelo.

	Sem pH	AKERBERG	H inibidor	pH inibidor
X	0,9816	0,9889	0,9896	0,9612
P	0,9837	0,9869	0,9851	0,9422
S	0,9899	0,9878	0,9901	0,9744
N	0,8577	0,9863	0,9854	0,9818
pH	-	0,9327	0,9327	0,9302

Para melhor comparar os resultados, também foi calculado o erro médio quadrático (MSE) para cada variável dos modelos (Tabela 5). Como para o cálculo deste erro são considerados o número de parâmetros do modelo frente ao número de pontos experimentais (graus de liberdade). Na Tabela 5 podemos observar que o modelo H_inibidor possui melhores resultados que o modelo AKERBERG, isso deve-se ao fato que o primeiro modelo possui menor número de parâmetros.

Tabela 5. Valores de erro médio quadrático (MSE) para cada modelo.

	Sem pH	AKERBERG	H inibidor	pH inibidor
X	9,39E-03	1,13E-02	7,96E-03	2,98E-02
P	9,22E-04	1,49E-03	1,26E-03	4,91E-03
S	1,78E-02	4,30E-02	2,61E-02	6,78E-02
N	5,41E-04	1,04E-04	8,31E-05	1,04E-04
pH	-	6,96E-01	5,23E-01	5,42E-01

Com o valor dos parâmetros estimados foram feitas simulações utilizando os modelos descritos, que são apresentados juntamente com os dados experimentais nas Figuras 1 a 5.

Analisando a variação da concentração de biomassa total com o tempo (Figura 1), percebe-se que, para a os pontos até 7 horas de cultivo, os modelos sem pH e H_inibidor são os que apresentam o menor desvio dos dados experimentais. A partir deste horário, nenhum modelo consegue reproduzir o comportamento experimental.

Com relação à concentração de P(3HB) (Figura 2), percebe-se que o modelo AKERBERG é o que melhor segue a tendência dos dados experimentais até 7 horas de cultivo. Após esse tempo, o modelo sem pH apresenta, aparentemente o melhor resultado.

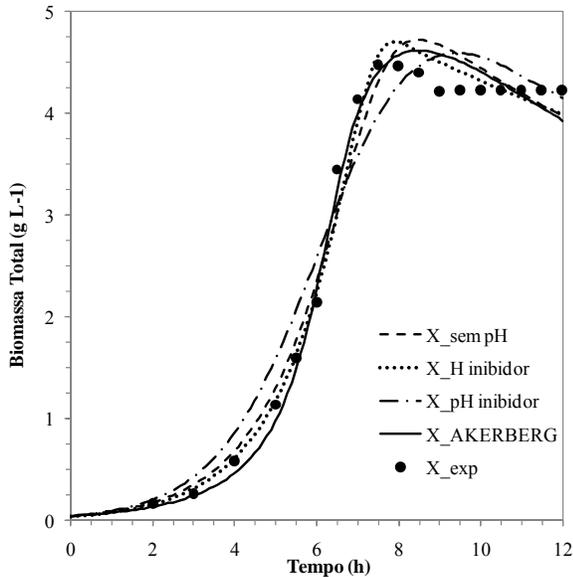


Figura 1. Formação de biomassa total em função do tempo de cultivo.

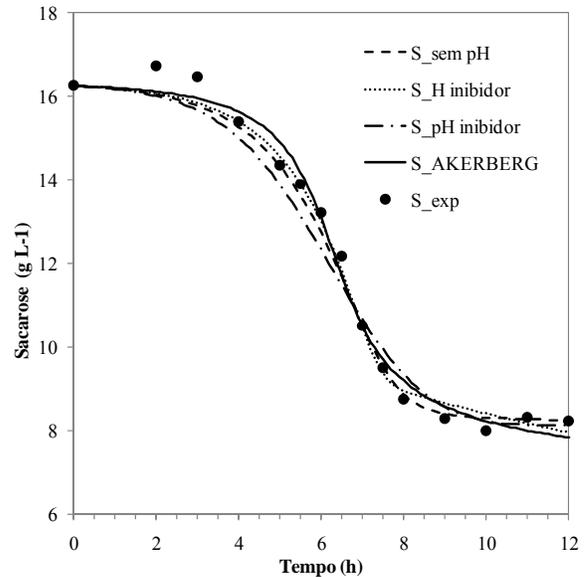


Figura 3. Consumo de sacarose em função do tempo de cultivo.

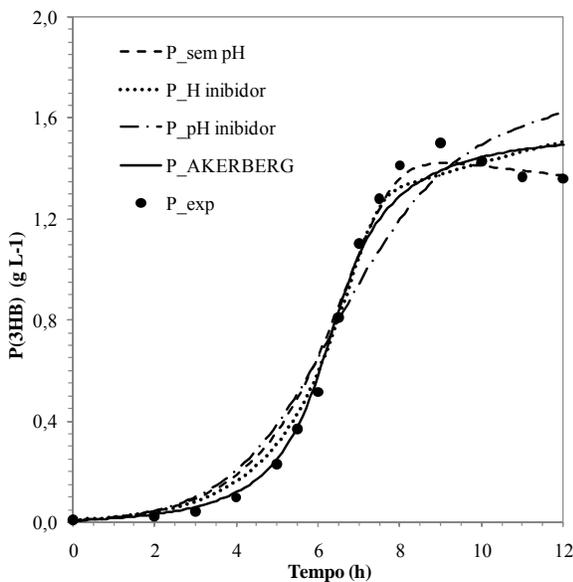


Figura 2. Formação de P(3HB) em função do tempo de cultivo.

Nota-se que nenhum modelo conseguiu se ajustar adequadamente ao pico máximo de produção de biopolímero em torno das 9 horas de cultivo ou a ocorrência de consumo de P(3HB) observado experimentalmente, a partir de 9 horas de cultivo (Figura 2).

Também para a variação da concentração de sacarose com o tempo (Figura 3) os modelos mais representativos são o sem pH e o H inibidor. Observa-se que no início do cultivo e a partir de 10 horas de cultivo, os valores experimentais de sacarose apresentam valores maiores que os pontos imediatamente anteriores, o que é fisicamente inconsistente, e que pode ser atribuído exclusivamente ao erro de medição desta variável, já que não há geração de sacarose no meio. Isso aumenta o erro na estimação de parâmetros.

A Figura 4 mostra os dados experimentais e as previsões dos modelos para a variação da concentração de nitrogênio com o tempo.

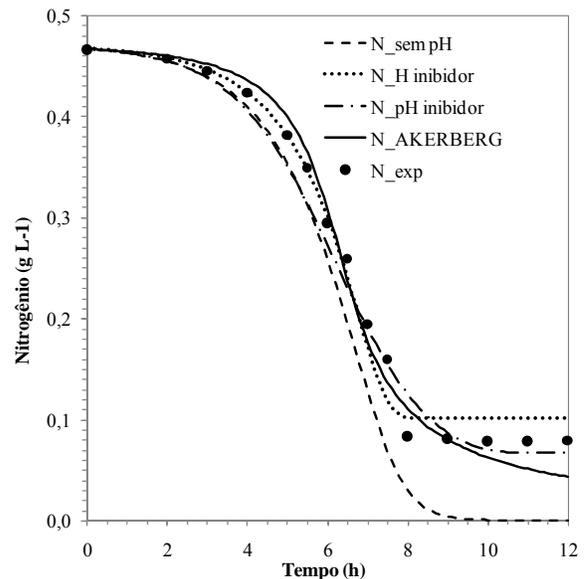


Figura 4. Consumo de nitrogênio em função do tempo de cultivo.

O modelo sem pH prediz uma concentração nula de nitrogênio no cultivo a partir das 8 horas de processo, o que não é verificado experimentalmente. Isto pode ser explicado pelo fato que o modelo sem pH não contempla a concentração de íons de hidrogênio em suas equações, fazendo que a ausência de crescimento celular e de produção de biopolímero seja artificialmente justificada pela ausência de nutrientes, no caso, de nitrogênio por apresentar menor concentração no meio.

O modelo que melhor se ajustou aos valores de nitrogênio foi o H_inibidor, apresentando um desvio a partir de 8 horas.

Na análise da variação do pH com o tempo (Figura 5), percebe-se que o meio vai se acidificando ao longo do cultivo.

Nota-se que, em cerca de 8 horas de cultivo, o pH caiu acentuadamente, atingindo o valor próximo de 4,5 no experimento. Isto indica que o meio com este valor de pH seja prejudicial à bactéria *B. megaterium*, podendo ser observado na Figura 1 a inibição do crescimento verificada pela estagnação da biomassa embora não tenha ocorrido limitação de substrato. Também pode-se verificar queda na produção de P(3HB) a partir do mesmo período (Figura 2). O valor atingido experimentalmente foi 4,44 que é o mesmo valor do parâmetro H_{inibidor} do modelo H_{inibidor} quando convertido a valor do pH.

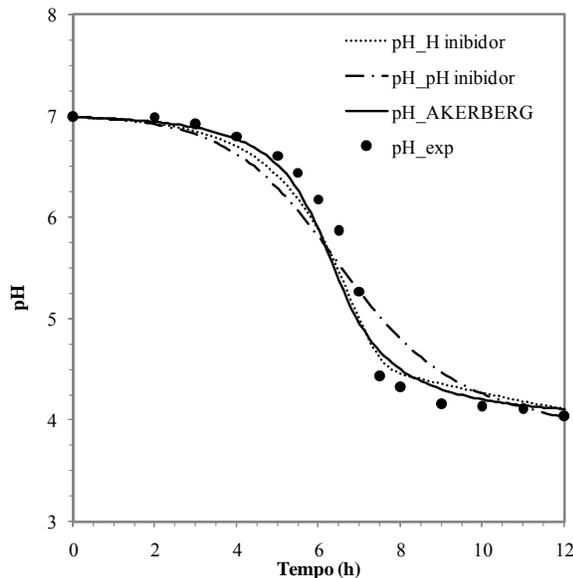


Figura 5. Variação de pH do meio em função do tempo cultivo.

A análise conjunta dos resultados apresentados nas Figuras 1 a 5 indica que, no geral, o modelo H_{inibidor} foi o que representou mais adequadamente o comportamento das diferentes variáveis analisadas. Isto só não ocorreu para variação do pH com o tempo, onde o modelo Akерberg apresentou melhor capacidade de ajuste.

Para a escolha do modelo mais adequado devemos levar em consideração, além do valor da função objetivo, o número de parâmetros necessários para a obtenção do ajuste, e neste caso o modelo H_{inibidor} tem vantagem frente o AKERBERG.

4. Conclusão

A implementação dos modelos no EMSO foi realizada com sucesso, assim como a estratégia de estimação de parâmetros dos modelos mostrou-se adequada.

Foi observada a importância de considerar o efeito da concentração de íons de hidrogênio no modelo, uma vez que um pH em torno de 4,5 inibe o crescimento celular e a produção de P(3HB). O modelo H_{inibidor} foi o que, em linhas gerais, melhor se adequou aos dados experimentais, representando, de modo satisfatório, o comportamento da bactéria frente à acidificação do meio.

5. Referências

AKERBERG, C.; HOFVENDAHL K.; ZACCHI G.; HAHN-HABERDAL B. Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis ssp. lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.49, p.682-690, 1998.

FACCIN, D. J. L. *Cultivo da bactéria Bacillus megaterium para a produção do biopolímero poli(3-hidroxi-butarato) e modelagem matemática do bioprocesso*. Dissertação de Mestrado, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2007.

FACCIN, D.J.L.; MARTINS, I; CARDOZO, N.S.M.; RECH, R.; AYUB, M.A.Z.; ALVES, T.L.M.; GAMBETTA, R.; SECCHI A.R. Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, In Press (DOI :10.1002/JCTB.2240), 2009.

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.

LEE, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, n. 49, p. 1-14, 1996.

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.

NELDER, J.A. and MEAD, R. A simplex method for function minimization, *Comp. J.* 7, pp. 308–313, 1964.

RAJE, P. and SRIVASTAVA, A.K. Update mathematical model and fed-batch strategies for poly-b-hydroxybutyrate (PHB) production by *Alcaligenes eutrophus*. *Bioresource Technology*, V. 54, p. 185-192, 1998.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, v. 87, p. 137-146, 2003.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica*, Volume 2. Editora Edgard Blucher, Brasil, 2001.

SECCHI, A.R. DASSLC: User's Manual - Version 3.5. Pacote computacional para a solução de sistemas de equações algébrico-diferenciais, <http://www.enq.ufrgs.br/enqlib/numeric/numeric.html>. 2008.

SOARES, R.P.; SECCHI, A.R. EMSO: A New Environment for Modeling, Simulation and Optimization, *Proceedings 13th European Symposium on Computer Aided Process Engineering*, p. 947–952, Lappeenranta, 2003.

6. Agradecimento

Os autores agradecem ao MCT/CNPq pelo suporte financeiro.

7. Lista de variáveis

R	concentração célula residual (biomassa residual)	g.L^{-1}
S	concentração de substrato carbono	g.L^{-1}
N	concentração de substrato nitrogênio	g.L^{-1}
P	concentração de produto	g.L^{-1}
H	concentração de íons de hidrogênio medidos em termos de pH	g.L^{-1}
pH	pH do meio de cultivo	
μ_x	velocidade específica de crescimento	h^{-1}
$Y_{X/N}$	fator de conversão de substrato em células	g.g^{-1}
t	tempo	h
μ_m	taxa de crescimento máxima específica	h^{-1}
α	termo associado ao crescimento celular	h^{-1}
γ	termo não associado ao crescimento celular	h^{-1}
K_{SS}	constante para o substrato limitante – fonte de carbono	g.L^{-1}
K_{NS}	constante para o substrato limitante – fonte de nitrogênio	g.L^{-1}
k_d	constante cinética associada a morte celular	h^{-1}
k_1	termo associado ao crescimento celular	-
k_2	termo não associado ao crescimento celular	h^{-1}
H_m	concentração de íons de hidrogênio máxima	g.L^{-1}
pH_{min}	menor valor de pH tolerado pela bactéria	-
K_1H	parâmetros cinéticos associados à concentração de íons de	g.L^{-1}
K_2H	parâmetros cinéticos associados à concentração de íons de	L.g^{-1}