



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



Produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* a partir de hidrolisado de casca de soja

Autora: Ana Cláudia Cristofoli Glanert

Orientadora: Débora Jung Luvizetto Faccin

Coorientadora: Lílian Raquel Hickert

Porto Alegre, julho de 15

Sumário

1	Introdução	1
2	Revisão Bibliográfica	2
2.1	Polihidroxicanoatos	2
2.2	Microrganismos produtores	4
2.3	Resíduos agroindustriais	5
2.4	Cultivo submerso	6
2.5	Conversão de fontes alternativas de carbono a P(3HB)	7
3	Materiais e Métodos	9
3.1	Microrganismo e inóculo	9
3.2	Meios de cultivo	10
3.2.1	Hidrolisado de casca de soja	10
3.2.2	Meio sintético	10
3.3	Cultivo	11
3.4	Métodos Analíticos	11
3.4.1	Determinação de biomassa	11
3.4.2	Determinação de P(3HB)	11
3.4.3	Determinação de açúcares	12
3.4.4	Determinação da pressão osmótica	12
3.5	Análise estatística	12
4	Resultados e Discussão	13
4.1	Hidrólise	13
4.2	Cultivo	14
5	Conclusões e Trabalhos Futuros	23
6	Referências	24

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Departamento de Engenharia Química.

Às minhas orientadoras, Débora e Lílian, muito obrigada pelos ensinamentos, apoio e disponibilidade.

Ao Prof. Marco Antônio Záchia Ayub e à Prof.^a Rosane Rech, por disponibilizarem os laboratórios necessários à realização desse trabalho, e ao Guilherme Hassemer, pelo auxílio nas análises de P(3HB).

Aos meus colegas de estágio, pela paciência, e aos meus gestores, sempre dispostos a negociar o horário de trabalho para que eu pudesse realizar os experimentos.

Ao 803, Leti, Paraguaya, Camila e Yuri, por tornarem muito melhores os anos de graduação.

À minha família, principalmente aos meus pais, Cláudio e Serjane, por nunca deixarem faltar amor, educação e incentivo.

Resumo

O poli(3-hidroxi-butirato) é um poliéster biodegradável sintetizado por uma variedade de microrganismos a partir de fontes renováveis e que apresenta propriedades semelhantes às dos polímeros petroquímicos. A maior desvantagem do P(3HB) está, no entanto, no alto custo de produção; assim, a utilização de resíduos agroindustriais como substrato para produção microbiana torna-se interessante alternativa para melhorar a economia do processo. Neste contexto, o Brasil destaca-se como segundo maior produtor de soja, cuja casca pode ser convertida a produtos de alto valor agregado, como o P(3HB).

O crescimento celular da bactéria *B. megaterium* e seu acúmulo de P(3HB) a partir de hidrolisados ácido e enzimático de casca de soja foram estudados e comparados aos resultados obtidos em meio sintético, o qual simula somente a composição dos açúcares dos hidrolisados, sem levar em consideração os demais nutrientes, nem a osmolalidade. Para isso, foram realizados cultivos em estufa rotatória, a 30 °C e 180 rpm, nos quais determinou-se biomassa, pH, concentração de polímero e concentração de açúcares das amostras retiradas após 24, 48 e 72 horas de cultivo. A influência da fonte de nitrogênio no crescimento celular e no acúmulo de P(3HB) também foi estudada.

O maior crescimento celular obtido foi 8,7 g.L⁻¹, observado no meio hidrolisado enzimático após 72 horas de cultivo, com acúmulo de 2,3 g.L⁻¹ (26,7 %) de polímero, enquanto a maior quantidade de P(3HB) foi 3,1 g.L⁻¹ (60,0 %), obtida em meio composto por glicose, suplementado de sulfato de amônio, no qual verificou-se 5,10 g.L⁻¹ de biomassa total, após 24 horas. A partir da análise de açúcares remanescentes, constatou-se que a bactéria é capaz de metabolizar tanto glicose, quanto xilose e arabinose. Constatou-se também que a suplementação com fonte de nitrogênio é importante no meio sintético e não tem influência significativa no meio hidrolisado, por se tratar de um meio rico em outros nutrientes, possivelmente compostos nitrogenados.

Dessa forma, o hidrolisado enzimático de casca de soja apresentou-se como alternativa de substrato viável à produção de P(3HB), uma vez que nele foi possível obter elevado crescimento celular e produção satisfatória de biopolímero, mesmo em elevada pressão osmótica e sem nenhum tipo de otimização desse meio.

Lista de Figuras

Figura 2.1: Estrutura geral de PHAs (Lee, 1996b).	2
Figura 3.1: Curva de calibração de P(3HB) padrão.	12

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Propriedades mecânicas (adaptada de Lee, 1996a).	3
Tabela 2.2: Temperaturas de fusão e de transição vítrea (adaptada de Sudesh <i>et al.</i> , 2000).	3
Tabela 3.1: Composição do meio mineral.....	9
Tabela 3.2: Composição da solução de micronutrientes.....	9
Tabela 4.1: Comparação entre as composições dos meios de cultivo.	13
Tabela 4.2: Pressão osmótica dos meios hidrolisados.....	13
Tabela 4.3: Concentração de glicose residual ao longo do cultivo.	14
Tabela 4.4: Concentração de xilose residual ao longo do cultivo.....	15
Tabela 4.5: Concentração de arabinose residual ao longo do cultivo.	15
Tabela 4.6: Concentração de biomassa total em meio sintético.....	16
Tabela 4.7: Concentração de biomassa total em meio hidrolisado.....	17
Tabela 4.8: Concentração de P(3HB) em meio sintético.	18
Tabela 4.9: Concentração de P(3HB) em meio hidrolisado.	18
Tabela 4.10: Rendimento de P(3HB) em meio sintético.....	19
Tabela 4.11: Rendimento de P(3HB) em meio hidrolisado.....	19
Tabela 4.12: Concentração de biomassa residual em meio sintético.	20
Tabela 4.13: Concentração de biomassa residual em meio hidrolisado.	20
Tabela 4.14: pH em meio sintético.	21
Tabela 4.15: pH em meio hidrolisado.	21

Lista de Símbolos

X Biomassa total (g)

R Biomassa residual (g)

T_f Temperatura de fusão (°C)

T_{tv} Temperatura de transição vítrea (°C)

Lista de Abreviaturas e de Siglas

PHA Polihidroxialcanoato

P(3HB) Poli-(3-hidroxi-butirato)

PHA_{sc} Polihidroxialcanoato de cadeia curta

PHA_{mc} Polihidroxialcanoato de cadeia longa

3HV 3-hidroxi-valerato

3HHx 3-hidroxi-hexanoato

1 Introdução

O plástico é um material indispensável à vida moderna, seja pela versatilidade, pela durabilidade ou pelo custo-benefício. À medida que os processos avançam tecnologicamente, mais aplicações a ele são atribuídas, resultando em vantajosa substituição de materiais tradicionais.

Devido à elevada taxa de consumo, evidenciada pela produção mundial de plásticos que alcançou expressivos 299 milhões de toneladas em 2013 (PLASTICS EUROPE, 2015), associada ao falho gerenciamento de resíduos, sérios impactos ambientais estão relacionados à disposição inadequada desses materiais. O acúmulo nos ecossistemas torna-os agentes poluidores por longos períodos de tempo em função da não biodegradabilidade dos plásticos petroquímicos.

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres biodegradáveis que surgem como potencial alternativa aos polímeros petroquímicos, uma vez que apresentam vasta gama de composições monoméricas e de propriedades. O poli(3-hidroxibutirato), P(3HB), descoberto em 1920 pelo microbiologista francês Maurice Lemoigne, é o primeiro e o mais comum biopolímero pertencente à classe dos PHAs (KESHAVARTZ e ROY, 2010) e, segundo Lee (1996a), possui características semelhantes às do polipropileno.

O P(3HB) é sintetizado por uma variedade de microrganismos a partir de fontes renováveis e é acumulado como armazenamento de energia na forma de grânulos intracelulares. A bactéria *Bacillus megaterium*, conforme Faccin *et al.* (2009), é capaz de produzir P(3HB) e copolímeros a partir de diversas fontes de carbono, além de suportar temperaturas e pressões osmóticas relativamente altas, atributos de grande interesse para aplicação industrial.

A maior desvantagem do biopolímero está, no entanto, no alto custo de produção. Segundo Solaiman *et al.* (2006), um dos principais custos consiste no substrato, que pode chegar a 50 % do total. Assim, a utilização de resíduos agroindustriais como substrato para produção microbiana, além de melhorar a economia do processo, contribui também para o melhor aproveitamento desses subprodutos. Neste contexto, o Brasil aparece como importante produtor agrícola, gerando grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos, de particular interesse para a produção microbiana, como cascas de soja.

A soja é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas, totalizando 86,7 milhões de toneladas na safra 2013/2014 (USDA, 2015), inferior apenas à produção dos Estados Unidos. A casca, subproduto de menor valor agregado do processamento industrial da soja, constitui cerca de 8 % de toda a semente (GNANASAMBANDAM e PROCTOR, 1999), tornando-se expressivo resíduo agrícola e interessante alternativa para bioconversão a produtos de alto valor agregado.

O objetivo deste trabalho é avaliar a viabilidade de utilização do resíduo de soja na produção de P(3HB) por *B. megaterium*. Os objetivos específicos são estudar o cultivo da bactéria em pressão osmótica elevada e a produção de P(3HB) utilizando como fonte de carbono os hidrolisados ácido e enzimático de casca de soja, além de comparar à produção em meio sintético, o qual simula somente a composição dos açúcares dos hidrolisados, sem levar em consideração os demais nutrientes, nem a osmolalidade.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Polihidroxicanoatos

Dentre os plásticos biodegradáveis, os polihidroxicanoatos (PHAs) são os mais conhecidos, uma vez que são sintetizados a partir de matérias-primas renováveis e apresentam propriedades semelhantes às dos plásticos convencionais. PHAs são homo ou heteropoliésteres com mais de 150 tipos diferentes de composições monoméricas, que resultam em diferentes propriedades, implicando em ampla possibilidade de aplicação (CHANPRATEEP, 2010).

PHAs são poliésteres insolúveis em água, não tóxicos, piezelétricos e enantiômeros puros (VALAPPIL *et al.*, 2007). Segundo Solaiman *et al.* (2006), são comumente classificados de acordo com o número de átomos de carbono da molécula de monômero: cadeia curta (PHA_{sc}), com unidades que se repetem compostas por hidroxiácidos de 3 ou 4 carbonos, e cadeia média (PHA_{mc}), com 6 ou mais carbonos. De uma forma geral, PHA_{sc} são mais cristalinos, com propriedades termoplásticas, enquanto PHA_{mc} são elastômeros ou adesivos. A fórmula estrutural dos PHAs é mostrada na Figura 2.1.

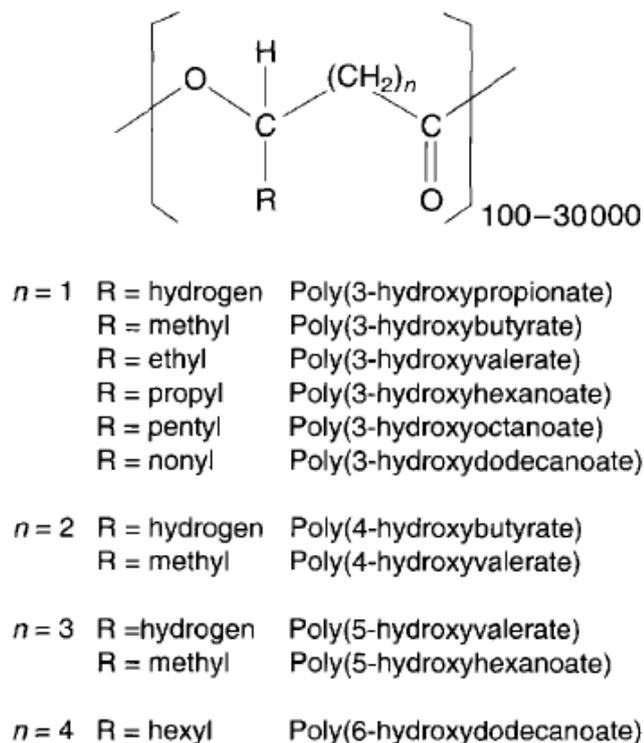


Figura 2.1: Estrutura geral de PHAs (Lee, 1996b).

Uma variedade de microrganismos é capaz de sintetizar e armazenar PHAs na forma de grânulos intracelulares de 0,2 a 0,5 μm de diâmetro que correspondem em até 80 % do peso seco da célula. Na maioria dos casos, o polímero é acumulado em resposta a condições de estresse a que o microrganismo é submetido, como limitação de nutrientes essenciais, como nitrogênio ou oxigênio, e em excesso de carbono. O polímero acumulado serve como fonte ideal de energia para períodos de falta de nutrientes e para o processo de esporulação, pois possui baixa solubilidade e alta massa molar, exercendo

uma pressão osmótica negligenciável à célula (SUDESH *et al.*, 2000; KESHAVARZ e ROY, 2010).

O poli(3-hidroxiбутирато), P(3HB), descoberto em 1920 pelo microbiologista francês Maurice Lemoigne, é o primeiro e o mais comum biopolímero pertencente à classe dos PHAs. O P(3HB) é um PHA de cadeia curta e seus monômeros, unidades de (R)-3HB, são polimerizados em moléculas de alta massa molar, de 200000 a 3000000 Da (SUDESH *et al.*, 2000).

As propriedades mecânicas do P(3HB), como mostra a Tabela 2.1, são semelhantes às do polipropileno.

Tabela 2.1: Propriedades mecânicas (adaptada de Lee, 1996a).

Polímero	Módulo de Young (GPa)	Tensão de cisalhamento (MPa)	Resistência à ruptura (%)	Resistência ao impacto (J/m)
P(3HB)	3,5	40	5	50
Polipropileno	1,7	34,5	400	45

A resistência à ruptura do P(3HB), no entanto, é muito menor; assim, o biopolímero é um material mais rígido e mais quebradiço quando comparado ao polipropileno. Suas propriedades e, por consequência, suas aplicações variam de acordo com a composição monomérica, que, por sua vez, depende do tipo de microrganismo, da fonte de carbono e das condições de cultivo.

O P(3HB) pode ser processado por extrusão convencional e em equipamentos de moldagem, apesar das aplicações industriais serem dificultadas pela baixa temperatura de degradação. A introdução de diferentes monômeros como 3-hidroxi valerato (3HV) ou 3-hidroxi hexanoato (3HHx) na cadeia melhora consideravelmente essa propriedade, como pode-se observar na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Temperaturas de fusão e de transição vítrea (adaptada de Sudesh *et al.*, 2000).

Polímero	T _m (°C)	T _g (°C)
P(3HB)	180	4
P(3HB-co 71% 3HV)	83	-13
Polipropileno	176	-10

Controlando-se a composição monomérica é possível regular as propriedades bem como a taxa de biodegradação do polímero. PHAs são eficientemente degradados no meio ambiente porque muitos microrganismos, como bactérias e fungos presentes no solo, em lodos e na água do mar, são capazes de metabolizá-los. Esses microrganismos excretam PHA-depolimerase, enzima que hidrolisa o PHA em oligômeros ou monômeros solúveis em água e, em seguida, utilizam esses produtos como nutrientes (SUDESH *et al.*, 2000). Uma das grandes vantagens do PHA em relação aos demais polímeros biodegradáveis é a capacidade de degradação tanto sob condições aeróbicas, resultando em água e dióxido de carbono, quanto anaeróbicas, em água e metano.

A taxa de biodegradação depende de vários fatores: os relacionados ao ambiente, como temperatura, umidade, pH e densidade de microrganismos, além dos fatores relacionados aos próprios bioplásticos, como composição, cristalinidade, massa molar e área superficial. A taxa de degradação enzimática do P(3HB) pela PHB-depolimerase é fortemente dependente da concentração dessa enzima no meio (SUDESH *et al.*, 2000).

Devido à biodegradabilidade o P(3HB) encontra grande aplicação no setor de embalagens; entretanto, é no setor médico que se encontra sua principal aplicação. O fator custo é menos importante quando se refere a tratamentos médicos e a biocompatibilidade, ou seja, a capacidade de ser absorvido pelos tecidos humanos permite que o biopolímero seja utilizado em suturas, na cicatrização de feridas, como vasos sanguíneos artificiais, em implantes e na entrega controlada de medicamentos.

Desde a tentativa inicial da W. R. Grace & Co, em 1959, houve muito interesse de várias outras companhias em comercializar biopolímeros. Atualmente, empresas de diversas partes do mundo produzem P(3HB) e copolímeros em diferentes escalas, destacando-se Telles, *joint venture* formada em 2010 por Archer Daniels Midland Company e Metabolix, com capacidade instalada de 50 mil toneladas ao ano de P(3HB) (Mirel™) produzido a partir de xarope de milho; Kaneka, no Japão, que produz 1000 toneladas ao ano de P(3HB-co-3HHx) a partir de óleos vegetais; na China, Tianan, que também utiliza milho como substrato, e Green Bio, com capacidade de 10 mil toneladas ao ano de P(3HB-co-4HB). No Brasil, com a criação da PHB Industrial S.A. em 2000, 60 toneladas por ano de PHB (Biocycle™) eram produzidas a partir do melado de cana-de-açúcar em planta piloto. Em 2004, com a conclusão da planta comercial, a capacidade foi aumentada para 2000 toneladas ao ano (CHANPRATEEP, 2010; PESSOA-JR *et al.*, 2005).

2.2 Microrganismos produtores

Sabe-se que mais de 300 espécies de microrganismos são capazes de biosintetizar PHA, entre eles, destacam-se as bactérias do gênero *Bacillus*. Segundo Valappil *et al.* (2007), pelo menos 11 espécies diferentes de *Bacillus* produzem P(3HB), acumulando copolímeros quando em diferentes substratos.

Bacillus megaterium é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia estrita, capaz de produzir P(3HB) a partir de diversas fontes de carbono. Além disso, é capaz de sintetizar copolímeros a partir de uma única fonte de carbono. Conforme Faccin *et al.* (2009), a *B. megaterium* ainda não é utilizada na produção comercial de P(3HB); entretanto, em virtude de suportar pressões osmóticas e temperaturas relativamente altas e de apresentar rápido crescimento celular, torna-se importante objeto de estudo, uma vez que esses são atributos de grande interesse para aplicação industrial.

Segundo Valappil *et al.* (2007), bactérias Gram-negativas como *Wautersia eutropha*, *Methylobacterium organophilum*, *Pseudomonas oleovorans*, atualmente as únicas utilizadas na produção comercial de PHAs, apresentam endotoxinas na membrana que copurificam com o PHA e podem causar reações imunológicas, o que é indesejável para as aplicações médicas desse polímero.

2.3 Resíduos agroindustriais

Grandes quantidades de resíduos são geradas em decorrência das atividades agrícolas e de suas indústrias associadas. Esses resíduos, ricos em celulose e hemicelulose, são de particular interesse para a produção microbiana, pois os substratos comumente utilizados, como glicose e outros sacarídeos, são insumos de alto valor.

Estimativas da contribuição do custo com substrato em relação ao custo total de produção do biopolímero apontam entre 28 e 50 % (SOLAIMAN *et al.*, 2006). O custo total de produção do P(3HB) depende do microrganismo e das fontes de carbono e de nitrogênio utilizados, das condições de cultivo, como temperatura e aeração, e também do processo de recuperação, tornando-o caro e pouco competitivo com os plásticos petroquímicos.

Melhorias nos rendimentos de processos por engenharia metabólica dos microrganismos e desenvolvimento de pré-tratamentos eficientes são fundamentais para mudança de matérias-primas de baixo valor, como resíduos agrícolas. A utilização desses produtos de baixo custo e ampla disponibilidade como substratos para a produção microbiana pode melhorar a economia do processo e, por se tratarem de resíduos, não competem com a produção de alimentos nem com a produção de etanol, que no Brasil é oriunda da cana-de-açúcar.

A soja é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas, correspondendo a 49 % da área plantada em grãos do país (MAPA, 2015). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja: na safra 2013/2014 a cultura ocupou a área de 30,1 milhões de hectares, totalizando em uma produção de 86,7 milhões de toneladas. O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) aponta que, no mesmo período, a produção mundial chegou a 283 milhões de toneladas, em uma área plantada de aproximadamente 113 milhões de hectares.

A casca, subproduto de menor valor agregado do processamento industrial da soja, constitui cerca de 8 % de toda a semente (GNANASAMBANDAM e PROCTOR, 1999) e, de acordo com essa informação, mais de 20 milhões de toneladas de casca de soja foram geradas. Sua utilização hoje está limitada ao uso como ração animal, devido ao elevado conteúdo de fibras e baixo teor de sílica.

A composição da casca de soja varia de acordo com a planta, o solo, o estágio de crescimento, entre outros fatores. Conforme Cassales *et al.* (2011), glicose é o principal componente da casca (39,7 %), além de xilose (19,6 %) e arabinose (5,9 %). Outros componentes são ácidos glucurônico e acético (2,6 %), celobiose (1,6 %), lignina (9,1 %), proteínas (13,1 %), cinzas (0,6 %) e extraíveis (3,2 %). O baixo teor de lignina, quando comparado a outros resíduos agroindustriais, favorece seu uso na produção microbiana.

Para que haja bioconversão da casca de soja é necessário submetê-la a um pré-tratamento para liberar os açúcares fermentescíveis que compõem a biomassa lignocelulósica, constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (HICKERT, 2014).

Segundo Hendriks e Zeeman (2009), a celulose é um polissacarídeo composto de subunidades de β -glicose que apresenta regiões cristalinas e amorfas. A hemicelulose, por sua vez, é uma complexa estrutura formada por pentoses, como xilose e arabinose, e

hexoses, como manose, glicose e galactose, que liga as fibras de celulose à lignina, heteropolímero amorfo que dá sustentação à planta, além de impermeabilizá-la e protegê-la contra ação microbiana.

Uma variedade de pré-tratamentos físicos (trituração), químicos (ácidos, álcalis, solventes e ozônio), físico-químicos (explosão a vapor e explosão de fibra com amônia) e biológicos (deslignificação e enzimas) foram desenvolvidos para melhorar a acessibilidade à celulose, reduzir sua cristalização e promover a solubilização da lignina e da hemicelulose, já que a presença desses torna o acesso à celulose difícil, reduzindo a eficiência da hidrólise enzimática (MOSIER *et al.*, 2005); nesse caso, a menos que um grande excesso de enzima seja utilizado, o rendimento da hidrólise enzimática da celulose é inferior a 20 % (SUN e CHENG, 2001).

A hidrólise ácida diluída em temperaturas intermediárias é o pré-tratamento de melhor custo-benefício e se apresenta bastante eficiente para resíduos agroindustriais. A metodologia emprega geralmente ácido sulfúrico ou ácido clorídrico em concentrações de 1 a 10 % em temperaturas de 100 a 150 °C, evitando que, quando em altas pressões e temperaturas, xilose e glicose sejam degradadas em substâncias tóxicas aos microrganismos, inibindo seu crescimento e reduzindo o rendimento do bioprocessamento (LENIHAN *et al.*, 2010).

Na hidrólise enzimática, a fração celulósica é convertida em glicose através da celulase, uma mistura de enzimas endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, que atacam regiões específicas da fibra de celulose. Para que a hidrólise enzimática possa corresponder à eficiência esperada, é necessário que ocorra após a hidrólise ácida, responsável pela desconstrução das fibras de celulose.

2.4 Cultivo submerso

No desenvolvimento da produção microbiana em escala industrial destacam-se duas técnicas de cultivo amplamente utilizadas: cultivo em estado sólido e cultivo submerso. No cultivo submerso, o microrganismo e o substrato estão no meio líquido agitado, que apresenta grande quantidade de solvente. Os substratos são utilizados rapidamente e devem ser constantemente suplementados, sendo essa técnica de cultivo mais apropriada para microrganismos que necessitam de umidade elevada, como as bactérias (SUBRAMANIYAM e VIMALA, 2012).

A transferência de calor e de massa é mais eficiente neste tipo de cultivo, o que favorece a modelagem e o controle do sistema. A ampliação de escala também é facilitada quando se trabalha em cultivo submerso. Como desvantagens, pode-se citar alto requerimento de energia, alta chance de contaminação, elevada quantidade de resíduos a serem descartados e alto custo de purificação dos produtos (JAIN *et al.*, 2013; HÖLKER e LENZ, 2005).

O desenvolvimento de um processo de fermentação submersa economicamente viável utilizando equipamento de fermentação convencional é um grande obstáculo para a produção de grandes quantidades em aplicações industriais. Entretanto, como o cultivo submerso é favorável na padronização do processo, foi utilizada essa técnica na realização dos experimentos do presente trabalho.

2.5 Conversão de fontes alternativas de carbono a P(3HB)

Omar *et al.* (2001) estudaram o crescimento de *B. megaterium* isolada de lodo e o acúmulo de P(3HB) a partir de xarope de tâmara e de melado de beterraba, além de outras fontes convencionais de carbono, como glicose, lactose, frutose e xilose. Avaliaram também como fontes de nitrogênio (NH_4Cl , NH_4NO_3 , NaNO_3 , $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$) e suplementação com nutrientes complexos e ácidos orgânicos afetam a produção do polímero. Em cultivo em estufa rotatória durante 48 horas a 30°C e 150 rpm, obtiveram $3,3 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa e 52 % de P(3HB) para xarope de tâmara e $3,7 \text{ g.L}^{-1}$ e 50 %, para melado de beterraba, valores superiores aos obtidos com os demais sacarídeos. Além disso, concluiu-se que a adição de fonte de nitrogênio incrementa o crescimento celular e também o acúmulo do polímero. Em ensaio utilizando NH_4Cl , a quantidade de P(3HB) praticamente dobrou, sendo essa fonte de nitrogênio a mais apropriada dentre as testadas.

Gouda *et al.* (2001) estudaram a produção de P(3HB) por *B. megaterium* a partir de melado de cana-de-açúcar e de outras fontes de carbono, como glicose, frutose, maltose, xilose e sacarose. A produção máxima de P(3HB) foi obtida em glicose e em melado de cana. Diferentes concentrações de melado de cana foram testadas e o melhor rendimento (46,3 %) foi obtido em meio 2 %, no qual foi estudada a influência do nitrogênio. Diversas fontes de nitrogênio foram testadas em cultivo de 48 horas, a 30°C e 130 rpm. Resultados satisfatórios foram observados com a utilização de cloreto de amônio e rejeito de licor de milho. Outros ensaios foram realizados, variando a concentração de licor de milho, até que o máximo rendimento (49,12 %) foi obtido, com adição de 3 % de licor de milho.

Em estudo realizado por Kulpreecha *et al.* (2009), avaliou-se o crescimento celular e a produção de P(3HB) por *B. megaterium* utilizando como fontes de carbono e de nitrogênio melado de cana e uréia. No cultivo em batelada, usando 20 g.L^{-1} de melado e variando a concentração de uréia, encontrou proporção molar de C/N ótima igual a 25. Já em batelada alimentada, com pH controlado em 7,0, oxigênio dissolvido em 60 %, concentração de 400 g.L^{-1} de açúcar total e taxa molar C/N de 10, resultou em $72,6 \text{ g/L}$ de biomassa e 42 % de PHB, em cultivo de 24 h.

Obruca *et al.* (2011) estudaram a conversão de soro de leite, resíduo da produção de queijo, a P(3HB) por *B. megaterium*. Em cultivo em estufa rotatória a 150 rpm e 30°C , foram avaliadas as concentrações de soro, de fonte de nitrogênio e também de sais minerais a fim de otimizar o meio de cultivo. Além disso, estudaram a influência da adição de etanol como um fator de estresse para a bactéria e o incremento na produção de polímero. O soro de leite, composto por lactose e glicose e proteínas, é um meio de elevada pressão osmótica, devido à alta concentração de sais; apesar disso, os resultados mostraram que sem a suplementação de meio mineral o crescimento e o acúmulo de P(3HB) foram significativamente menores.

A produção de P(3HB) por *Pseudomonas hydrogenova* foi estudada por Koller *et al.* (2008) utilizando como fonte de carbono permeado de soro de leite e comparando-a à mistura de glicose e de galactose, sob condições limitantes de suplementação de nitrogênio. Constatou-se que, quando o nitrogênio do meio esgota, o crescimento celular diminui e a síntese do polímero inicia; além disso, no cultivo em meio sintético, houve degradação do P(3HB) após esgotamento dos açúcares, enquanto no permeado não houve consumo de polímero, devido à complexidade desse meio.

Outras fontes de carbono alternativas, além das já citadas, foram estudadas, entre elas farelo de arroz e de trigo, amido e efluentes diversos (KESHAVARZ, 2010). É importante destacar que nenhum estudo sobre a utilização de casca de soja na produção de PHAs foi encontrado, seja por *B. megaterium* ou por outro microrganismo, o que se torna mais uma motivação para realização desse trabalho.

3 Materiais e Métodos

Os experimentos descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e no Bioteclab, no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Avaliou-se a produção de P(3HB) pela bactéria *B. megaterium* em hidrolisado de casca de soja e em meio sintético, simulando a concentração de açúcares do hidrolisado; para isso, realizaram-se cultivos em batelada em estufa incubadora rotatória. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.1 Microrganismo e inóculo

Utilizou-se nesse trabalho a bactéria *B. megaterium* DSMZ 32^T, armazenada congelada em tubos eppendorf a -18 °C em solução crioprotetora 20 % em glicerol.

A reativação se deu em cultivo em erlenmeyer em estufa rotatória a 180 rpm e 30 °C utilizando meio de cultivo composto por glicose (30 g.L⁻¹), sulfato de amônio (2 g.L⁻¹) e meio mineral, proposto por Wang e Lee (1997) e detalhado nas Tabelas 3.1 e 3.2 abaixo.

Tabela 3.1: Composição do meio mineral.

Componente	Concentração
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,008 g.L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄	3,6 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g.L ⁻¹
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g.L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01 g.L ⁻¹
Ácido cítrico	0,1 g.L ⁻¹
Solução de micronutrientes	1 mL.L ⁻¹

Tabela 3.2: Composição da solução de micronutrientes.

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

Embora outros autores tenham encontrado melhores resultados utilizando cloreto de amônio como fonte de nitrogênio, nesse trabalho utilizou-se sulfato de amônio e sua concentração nos meios de cultivo foi baseada no trabalho de Faccin *et al.* (2009), no qual foi estudada a razão entre fonte de carbono e de nitrogênio para otimizar a produção de

P(3HB) por *B. megaterium*. Nesse estudo verificou-se que a melhor condição, acúmulo de polímero de cerca de 70 % em relação à biomassa seca, foi obtida na proporção 8:1, utilizando sacarose e sulfato de amônio. Dessa forma, foi mantida a proporção 8:1 para glicose e sulfato de amônio, pois a rota metabólica das pentoses, xilose e arabinose, diferencia-se da rota metabólica da sacarose, não sendo possível inferir sobre essa razão.

O pH inicial do meio foi ajustado a 7,0 com hidróxido de sódio e o cultivo do pré-inóculo foi realizado durante 18 horas, que é o tempo necessário para que a concentração celular atingisse densidade ótica igual à unidade, quando medida em 600 nm. Após esse período, alíquotas de 2 mL do pré-inóculo foram transferidas para os frascos contendo os meios de cultivo a serem estudados, em um total de 50 mL.

3.2 Meios de cultivo

3.2.1 Hidrolisado de casca de soja

A casca de soja moída utilizada é da marca Samil, disponível em sacos de 25 kg. A metodologia de hidrólise desse trabalho é baseada no estudo realizado por Hickert (2014), cujo tratamento visa à liberação da maior concentração de açúcares, minimizando a concentração de inibidores tóxicos no meio de cultivo.

O hidrolisado de casca de soja foi preparado em erlenmeyer de 2 L, ao qual foram adicionados 100 g de cascas de soja e 1 L de solução 1 % (volume) de ácido sulfúrico. Após ser submetido a tratamento durante 40 minutos a 1 atm e 121 °C em autoclave, o hidrolisado foi resfriado em banho de gelo e filtrado.

A parte líquida, que é o hidrolisado ácido propriamente dito, foi concentrada duas vezes em rotaevaporador a 70 °C e o pH foi ajustado a 7,0 com hidróxido de sódio. Em seguida, foi centrifugado e suplementado de meio mineral (Tabelas 3.1 e 3.2). Para ser utilizado no cultivo, foi autoclavado durante 30 minutos a 0,5 atm e 111 °C, condições brandas de tratamento a fim de evitar a formação de substâncias tóxicas.

O sólido remanescente do tratamento ácido foi lavado e misturado a uma quantidade de água tal que a proporção entre sólido e líquido fosse 1:20 para dar origem ao hidrolisado enzimático. A essa solução foram adicionadas 15 FPU.g⁻¹ de enzima celulase, extraída de culturas de *Penicillium echinulatum* S1M29 (DSM 18942), em meio tamponado. Em estufa rotatória a 120 rpm e 50 °C, permaneceu por 96 horas e, da mesma forma que o hidrolisado ácido, o hidrolisado enzimático foi concentrado, teve o pH ajustado, foi centrifugado, suplementado e autoclavado para então ser utilizado no cultivo.

A fim de avaliar a influência da fonte de nitrogênio no acúmulo de P(3HB), os meios hidrolisados foram testados com e sem adição de sulfato de amônio, na concentração de 2 g.L⁻¹.

3.2.2 Meio sintético

O meio sintético simula a composição dos açúcares dos meios hidrolisados de casca de soja, sem levar em consideração os demais nutrientes e inibidores, nem a osmolalidade desse meio. Com base no trabalho de Hickert (2014), no qual a mistura dos

hidrolisados resultou em uma solução de concentração 38 g.L⁻¹ de glicose, 21 g.L⁻¹ de xilose e 4 g.L⁻¹ de arabinose, o meio sintético foi preparado contendo 30 g.L⁻¹ de glicose, 20 g.L⁻¹ de xilose e 5 g.L⁻¹ de arabinose.

Para avaliar a capacidade de conversão dos diferentes açúcares pela bactéria *B. megaterium*, foram testados separadamente cada um dos açúcares: glicose (30 g.L⁻¹), xilose (20 g.L⁻¹) e arabinose (5 g.L⁻¹). A influência da fonte de nitrogênio no acúmulo de P(3HB) também foi estudada, por isso cada um dos meios foi testado com e sem adição de sulfato de amônio, na concentração de 2 g.L⁻¹. Todos os meios foram suplementados com meio mineral (Tabelas 3.1 e 3.2).

3.3 Cultivo

Os ensaios foram conduzidos em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo, em estufa incubadora rotatória a 180 rpm e 30 °C. Amostras foram retiradas em 24 e 48 horas, para os meios sintéticos, e em 24, 48 e 72 horas, para os meios hidrolisados.

3.4 Métodos Analíticos

3.4.1 Determinação de biomassa

A determinação da biomassa total (X) foi realizada por medida gravimétrica. As amostras coletadas dos cultivos foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos, lavadas e colocadas em estufa a vácuo a 75 °C até atingirem massa constante. O valor da biomassa total corresponde à massa medida menos a massa do frasco vazio, considerando o volume coletado.

Uma vez que o biopolímero é acumulado internamente à célula, a biomassa residual (R) é calculada diminuindo da biomassa total a massa de biopolímero obtida.

3.4.2 Determinação de P(3HB)

A quantidade de P(3HB) foi determinada pelo método de propanólise proposto por Riis e Mai (1998), que consiste na adição de aproximadamente 40 mg de células secas em um frasco, além de 2 mL de 1,2-dicloroetano, 2 mL de n-propanol acidificado (4 partes de n-propanol para 1 parte de ácido clorídrico) e 200 µL de solução de padrão interno, composto por 2 g de ácido benzóico em 50 mL de n-propanol. O frasco é fechado, deixado em banho a 100 °C por duas horas e 30 minutos, sob agitação intermitente e, em seguida, é resfriado a temperatura ambiente, quando se adiciona 4 mL de água destilada. A fase orgânica resultante é analisada por cromatografia gasosa.

A Figura 3.1 mostra a curva de calibração construída a fim de correlacionar as áreas de massas conhecidas de P(3HB), padrão Sigma-Aldrich, com a área do padrão interno. Utilizou-se cromatógrafo Perkin Elmer com detector de ionização de chama e coluna capilar PE-WAX 30 m x 0,25 mm.

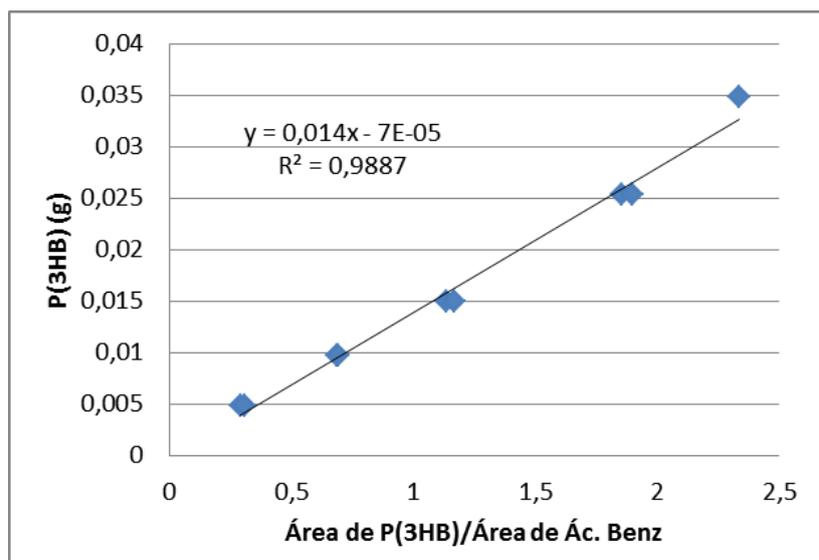


Figura 3.1: Curva de calibração de P(3HB) padrão.

Além da quantidade de polímero, foi avaliado o rendimento de produção com base no consumo de açúcares totais, em cada meio.

3.4.3 Determinação de açúcares

A caracterização dos hidrolisados ácido e enzimático foi feita determinando-se as concentrações de glicose, de xilose e de arabinose por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). As análises foram realizadas em equipamento Shimadzu, com coluna Bio-Rad HPX-87H (300 x 7,8 mm), utilizando como eluente ácido sulfúrico (0,005 M) a 45 °C, com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e detector de índice refrativo, com volume de amostra injetada igual a 20 µL.

A avaliação do consumo de açúcares fermentescíveis nos meios após o cultivo se deu também por HPLC, nas mesmas condições citadas acima, determinando-se o açúcar residual dos meios.

3.4.4 Determinação da pressão osmótica

Determinou-se a pressão osmótica dos hidrolisados utilizando o osmômetro VAPRO 5520.

3.5 Análise estatística

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente utilizando-se análise da variância (ANOVA) e Teste de Tukey, ambos com 95 % de significância do suplemento Ferramentas de análise – VBA do software Excel.

4 Resultados e Discussão

4.1 Hidrólise

Os hidrolisados resultantes dos tratamentos ácido e enzimático da casca de soja foram analisados quanto à composição de açúcares e à pressão osmótica. A composição dos hidrolisados é apresentada na Tabela 4.1, comparada à composição do meio sintético misto preparado.

Tabela 4.1: Comparação entre as composições dos meios de cultivo.

Meio	Glicose (g.L ⁻¹)	Xilose (g.L ⁻¹)	Arabinose (g.L ⁻¹)
Misto	30	20	5
H. Ácido	7,9	20,3	12,8
H. Enzimático	23,9	10,4	4,8

A composição dos hidrolisados obtidos é diferente daquela proposta para o meio sintético misto, que foi baseada em trabalhos anteriores. O hidrolisado enzimático, o que mais se assemelha a esse meio, apresenta melhores rendimentos de glicose que o hidrolisado ácido, pois no tratamento ácido, a principal reação que ocorre é a hidrólise da hemicelulose (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). Além disso, conforme Lenihan *et al.* (2010), o tratamento ácido se mostra pouco eficaz na produção de hexoses devido à decomposição desses monossacarídeos em compostos indesejáveis, como furfural e hidroximetilfurfural.

A baixa concentração de xilose e de arabinose no meio hidrolisado enzimático é esperada porque o complexo enzimático utilizado é composto principalmente de celulases, que quebram a celulose em glicose e em celobiose. Uma vez que o complexo enzimático não é purificado, é possível que haja xiluloses, que fazem a quebra da hemicelulose em xilose e arabinose, justificando a presença desses açúcares no meio.

Na Tabela 4.2 são apresentadas as pressões osmóticas medidas nos hidrolisados.

Tabela 4.2: Pressão osmótica dos meios hidrolisados.

Meio	Pressão osmótica (mOsm.kg ⁻¹)
H. Ácido	1363
H. Ácido + N	1372
H. Enzimático	1053
H. Enzimático + N	1062

A alta pressão osmótica é característica dos hidrolisados de resíduos lignocelulósicos devido aos íons inorgânicos próprios da casca de soja e também aos produtos químicos adicionados no tratamento e no ajuste do pH. A concentração de solutos no meio de

cultivo afeta diretamente o crescimento celular, podendo até inibir o crescimento da bactéria.

4.2 Cultivo

A partir da análise dos meios de cultivo remanescentes é possível avaliar o consumo de açúcares fermentescíveis pela *B. megaterium*. Nas Tabelas 4.3, 4.4 e 4.5 são mostradas as concentrações médias dos açúcares residuais, glicose, xilose e arabinose, respectivamente, durante o cultivo, juntamente com o desvio padrão. As concentrações no tempo inicial são as apresentadas na Tabela 4.1. É importante lembrar que os cultivos em meio sintético tiveram duração de 48 horas, enquanto que os em meio hidrolisado foram realizados durante 72 horas.

Conforme análise estatística, letras foram adicionadas para diferenciar os resultados. Para uma mesma linha, letras iguais significam que os valores médios não apresentam diferença significativa entre si e letras iguais entre linhas não apresentam qualquer relação. Essa forma foi adotada devido à grande quantidade de resultados, que tornaria inconveniente utilizar letras distintas. Para o tempo zero, como as análises não foram feitas em duplicata, não foi possível incluí-las na análise.

Tabela 4.3: Concentração de glicose residual ao longo do cultivo.

Meio	C ₀ (g.L ⁻¹)	C ₂₄ (g.L ⁻¹)	C ₄₈ (g.L ⁻¹)	C ₇₂ (g.L ⁻¹)
Misto	30	27,0 ^b ± 0,9	27,1 ^b ± 0,5	-
Misto + N	30	19,1 ^b ± 0,6	18,5 ^b ± 0,3	-
Glicose	30	24,7 ^b ± 1,4	24,9 ^b ± 0,1	-
Glicose + N	30	16,0 ^b ± 0,2	14,0 ^b ± 0,7	-
H. Ácido	7,9	4,7 ^b ± 0,4	4,2 ^b ± 0,2	2,3 ^c ± 0,1
H. Ácido + N	7,9	4,4 ^b ± 0,2	4,3 ^b ± 0,0	1,8 ^c ± 0,3
H. Enzimático	23,9	21,7 ^b ± 0,7	19,6 ^b ± 0,6	11,9 ^c ± 0,6
H. Enzimático + N	23,9	19,9 ^a ± 0,8	15,4 ^b ± 0,3	12,1 ^c ± 0,2

Grande consumo de glicose é observado nos meios sintéticos suplementados com nitrogênio e nos meios hidrolisados. Além disso, observa-se que, para os quatro primeiros cultivos apresentados na Tabela 4.4, referentes aos meios sintéticos, o consumo de glicose se deu somente nas primeiras 24 horas, enquanto para o hidrolisado ácido, observa-se consumo nas primeiras 24 horas e depois entre 48 e 72 horas.

Para o hidrolisado enzimático, observa-se pequeno consumo de glicose nas primeiras 24 horas, mas a maior taxa de consumo é observada no período entre 48 e 72 horas; já o hidrolisado enzimático com suplementação de nitrogênio apresenta um consumo mais regular ao longo do tempo. Com exceção desse último, os cultivos aparentemente não apresentam consumo de glicose entre 24 e 48 horas.

Tabela 4.4: Concentração de xilose residual ao longo do cultivo.

Meio	C ₀ (g.L ⁻¹)	C ₂₄ (g.L ⁻¹)	C ₄₈ (g.L ⁻¹)	C ₇₂ (g.L ⁻¹)
Misto	20	18,0 ^b ± 0,2	18,2 ^b ± 0,4	-
Misto + N	20	16,1 ^b ± 0,5	15,6 ^b ± 0,2	-
Xilose	20	16,6 ^b ± 0,7	17,0 ^b ± 0,6	-
Xilose + N	20	13,3 ^b ± 0,4	12,9 ^b ± 0,1	-
H. Ácido	20,3	18,1 ^b ± 0,1	17,4 ^b ± 0,1	15,0 ^c ± 0,4
H. Ácido + N	20,3	17,9 ^b ± 0,1	17,4 ^b ± 0,0	15,0 ^c ± 0,7
H. Enzimático	10,4	9,8 ^b ± 0,5	9,9 ^b ± 0,5	8,0 ^c ± 0,0
H. Enzimático + N	10,4	9,2 ^a ± 0,6	8,0 ^{ab} ± 0,2	6,8 ^b ± 0,1

O maior consumo de xilose é observado nos meios denominados xilose e hidrolisado enzimático, ambos suplementados com nitrogênio. Assim como para glicose, não há consumo significativo de xilose entre 24 e 48 horas de cultivo.

Tabela 4.5: Concentração de arabinose residual ao longo do cultivo.

Meio	C ₀ (g.L ⁻¹)	C ₂₄ (g.L ⁻¹)	C ₄₈ (g.L ⁻¹)	C ₇₂ (g.L ⁻¹)
Misto	5	1,8 ^b ± 0,0	1,8 ^b ± 0,1	-
Misto + N	5	2,2 ^b ± 0,0	2,2 ^b ± 0,2	-
Arabinose	5	4,0 ^b ± 0,2	4,1 ^b ± 0,1	-
Arabinose + N	5	0,2 ^b ± 0,0	0,1 ^b ± 0,0	-
H. Ácido	12,8	9,4 ^a ± 0,1	8,3 ^b ± 0,2	6,2 ^c ± 0,1
H. Ácido + N	12,8	8,2 ^b ± 0,2	8,1 ^b ± 0,1	6,2 ^c ± 0,2
H. Enzimático	4,8	4,1 ^b ± 0,4	3,9 ^b ± 0,4	1,8 ^c ± 0,0
H. Enzimático + N	4,8	3,8 ^b ± 0,3	3,5 ^b ± 0,3	1,8 ^c ± 0,3

No meio composto por arabinose, suplementado com nitrogênio, quase todo açúcar foi consumido. Grande consumo de arabinose é observado em todos os meios, com exceção do meio composto somente por arabinose. Mais uma vez, observa-se que não há consumo significativo de arabinose entre 24 e 48 horas. Para meios sintéticos o consumo de arabinose ocorreu somente durante as primeiras 24 horas, enquanto para os meios hidrolisados observa-se consumo desse açúcar nas primeiras 24 horas e entre 48 e 72 horas.

A bactéria *B. megaterium* é capaz de metabolizar tanto glicose quanto xilose e arabinose. Pode-se observar que, em todos os meios estudados, o consumo total de açúcares é maior nos cultivos que tiveram suplementação com nitrogênio. A

determinação de nitrogênio nas amostras coletadas não foi realizada, embora fosse interessante quantificar esse nutriente para elucidar melhor sua influência.

Avaliando o consumo total de açúcares nos meios misto suplementado de nitrogênio e hidrolisados, é possível observar que a bactéria consumiu quantidade similar, independente da concentração inicial de cada meio; entretanto, a composição inicial influencia na seleção do açúcar de maior consumo.

O crescimento celular foi avaliado a partir da concentração de biomassa total ao longo do tempo. Nas Tabelas 4.6 e 4.7 são mostrados os resultados obtidos para meios sintéticos e hidrolisados, respectivamente.

Tabela 4.6: Concentração de biomassa total em meio sintético.

Meio	X ₂₄ (g.L ⁻¹)	X ₄₈ (g.L ⁻¹)
Misto	0,8 ^a ± 0,0	1,4 ^b ± 0,0
Misto + N	0,2 ^a ± 0,0	0,0 ^b ± 0,0
Glicose	0,8 ^b ± 0,1	0,8 ^b ± 0,1
Glicose + N	5,1 ^a ± 0,0	4,6 ^b ± 0,0
Xilose	0,6 ^b ± 0,2	0,6 ^b ± 0,1
Xilose + N	0,0 ^a ± 0,0	1,4 ^b ± 0,0
Arabinose	0,4 ^b ± 0,2	0,3 ^b ± 0,0
Arabinose +N	1,7 ^b ± 0,1	1,7 ^b ± 0,1

Como era esperado, o meio composto por glicose com adição de fonte de nitrogênio foi o que apresentou maior crescimento celular, pois a glicose é o açúcar mais facilmente metabolizado dentre os demais. Além disso, nota-se também uma pequena diminuição de biomassa total nesse meio.

Cabe ressaltar que em todos os meios testados foi observado crescimento, evidenciando que essa bactéria é capaz de metabolizar pentoses e não somente hexoses, como glicose e frutose, possibilitando o estudo de diversos outros resíduos além dos baseados em glicose e frutose.

Pode-se observar que, com exceção do meio misto, a adição da fonte de nitrogênio influencia positivamente no crescimento celular, uma vez que as quantidades de biomassa total obtidas para as amostras suplementadas são superiores às quantidades das amostras não suplementadas com sulfato de amônio.

Curiosamente, apesar de não haver consumo de açúcares no período entre 24 e 48 horas, nos meios misto e xilose suplementado de nitrogênio observa-se crescimento celular, conforme visto na Tabela 4.6 acima.

Tabela 4.7: Concentração de biomassa total em meio hidrolisado.

Meio	X ₂₄ (g.L ⁻¹)	X ₄₈ (g.L ⁻¹)	X ₇₂ (g.L ⁻¹)
H. Ácido	1,2 ^b ± 0,4	0,9 ^b ± 0,0	7,1 ^c ± 0,0
H. Ácido + N	0,8 ^b ± 0,0	0,8 ^b ± 0,1	6,0 ^c ± 0,3
H. Enzimático	0,1 ^a ± 0,0	3,6 ^b ± 0,1	8,7 ^c ± 0,2
H. Enzimático + N	0,2 ^a ± 0,0	3,8 ^b ± 1,4	8,2 ^c ± 0,2

O maior crescimento se deu em meio hidrolisado enzimático, apesar de, em 24 horas, o hidrolisado ácido apresentar maior quantidade de biomassa. Para os meios hidrolisados fica claro que há aumento de biomassa ao longo do tempo, o que pode ser explicado pela cinética de crescimento exponencial da bactéria ser mais lenta quando comparada à do meio sintético, devido, provavelmente, ao tempo de adaptação do microrganismo, já que o pré-inóculo foi realizado em glicose.

Para os hidrolisados ácidos, pode-se observar que não há crescimento entre 24 e 48 horas, o que condiz com os resultados de consumo, nos quais, conforme mostram as Tabelas 4.3, 4.4 e 4.5, observa-se pequeno consumo de arabinose. Após esse período, a bactéria volta a consumir açúcares e a crescer.

A suplementação com fonte de nitrogênio nos hidrolisados não apresenta ganho em biomassa como ocorre nos meios sintéticos, possivelmente, por serem meios complexos, que contenham compostos de nitrogênio com quantidades satisfatórias ao crescimento de *B. megaterium*. Esse resultado difere do obtido por Omar *et al.* (2001) que, ao estudarem a adição de diversas fontes de nitrogênio ao meio de xarope de tâmara, obtiveram maior crescimento celular em todos os testes. Da mesma forma, Gouda *et al.* (2001) alcançaram maiores quantidades de biomassa ao suplementarem melado de cana-de-açúcar com diversas fontes de nitrogênio.

Comparando os resultados de biomassa total em meios sintéticos e em hidrolisados, percebe-se que há maior crescimento no segundo, mesmo sendo esse um meio agressivo à bactéria, devido à elevada pressão osmótica e às substâncias tóxicas resultantes da hidrólise ácida. Esse comportamento se deve, provavelmente, ao fato do meio hidrolisado ser rico em nutrientes favoráveis ao crescimento dessa bactéria.

Conforme Kulpreecha *et al.* (2009), no qual maior crescimento celular foi observado em melado de cana-de-açúcar que em meio sintético, isso pode ser causado por outros nutrientes presentes no melado, como ácidos orgânicos, minerais e vitaminas, que não estão no meio sintético e que favorecem o crescimento e o acúmulo de P(3HB) pela *B. megaterium*.

Embora todos os meios testados tenham apresentado crescimento celular, nem todos continham biomassa suficiente para fazer a extração e a análise do polímero. A concentração de P(3HB) ao longo do cultivo é mostrada nas Tabelas 4.8 e 4.9.

Tabela 4.8: Concentração de P(3HB) em meio sintético.

Meio	P(3HB) ₂₄ (g.L ⁻¹)	P(3HB) ₄₈ (g.L ⁻¹)	P(3HB) ₂₄ (%)	P(3HB) ₄₈ (%)
Glicose + N	3,1 ^a ± 0,1	2,4 ^b ± 0,4	60,0 ^c ± 2,4	51,1 ^c ± 8,0
Xilose + N	-	0,4 ± 0,0	-	2,9 ± 0,2
Arabinose + N	0,2 ± 0,0	-	9,06 ± 0,7	-

Assim como para biomassa total, o meio composto por glicose suplementado de nitrogênio apresentou o maior acúmulo de P(3HB) pela bactéria e a quantidade de polímero também diminuiu com o tempo de cultivo. Pequena produção é observada também para xilose e arabinose.

Gouda *et al.* (2001), ao estudarem a conversão de diversas fontes de carbono a P(3HB) por *B. megaterium*, observou que o substrato que apresentou maior acúmulo de P(3HB) foi glicose (44,6 %) e menor, xilose (7,40 %), enquanto Omar *et al.* (2001), em cultivo em estufa rotatória durante 48 h, a 30 °C e 150 rpm, obtiveram 1,2 g.L⁻¹ de biomassa contendo 33 % de P(3HB) a partir de meio composto por glicose e 0,4 g.L⁻¹ e 5 % a partir de xilose.

Os meios sem suplementação de fonte de nitrogênio não apresentaram biomassa suficiente para extração do polímero e, por isso, não foi possível concluir sobre a influência da fonte de nitrogênio no acúmulo de P(3HB) em meios sintéticos.

Tabela 4.9: Concentração de P(3HB) em meio hidrolisado.

Meio	P(3HB) ₄₈ (g.L ⁻¹)	P(3HB) ₇₂ (g.L ⁻¹)	P(3HB) ₄₈ (%)	P(3HB) ₇₂ (%)
H. Ácido	-	-	-	-
H. Ácido + N	0,0 ± 0,0	-	0,2 ± 0,1	-
H. Enzimático	1,0 ^a ± 0,1	2,3 ^b ± 0,1	26,7 ^c ± 3,8	26,7 ^c ± 1,5
H. Enzimático + N	1,0 ^b ± 0,5	0,8 ^b ± 0,2	26,4 ^c ± 2,5	9,1 ^d ± 2,8

Para o hidrolisado ácido quase não foi observado acúmulo de P(3HB), por outro lado, o hidrolisado enzimático apresentou acúmulo de aproximadamente 2,3 g.L⁻¹ após 72 horas de cultivo. Nesse meio, é possível notar também que a fonte de nitrogênio não favorece o acúmulo de polímero.

Cabe salientar que as amostragens foram realizadas em intervalos de 24 horas, sendo possível que haja picos de maior produção entre 48 e 72 horas, pois a quantidade de P(3HB) pode diminuir durante o cultivo, pois a bactéria utiliza o polímero como fonte de energia quando os nutrientes estão se esgotando.

Outro ponto que deve ser ressaltado é o fato de que não foi feito nenhum tipo de otimização das condições de cultivo, como testar quantidade de fonte de carbono inicial e/ou razão entre carbono e nitrogênio. Além disso, maior acúmulo poderia ser observado se fosse utilizado um pré-inóculo já contendo hidrolisado para facilitar a adaptação das

células ao meio com maior pressão osmótica. Sendo assim, observa-se que há potencial para melhorar a produção de P(3HB) utilizando hidrolisado enzimático de casca de soja.

Em cultivo em estufa rotatória durante 48 h, a 30 °C e 150 rpm, Omar *et al.* (2001) obtiveram 3,3 g.L⁻¹ de biomassa e 52 % de P(3HB) para xarope de tâmara e 3,7 g.L⁻¹ e 50 %, para melado de beterraba, valores superiores aos obtidos com os demais sacarídeos testados.

O rendimento da produção de P(3HB) foi avaliado a partir do consumo total de açúcares pela bactéria, como mostrado nas Tabelas 4.10 e 4.11.

Tabela 4.10: Rendimento de P(3HB) em meio sintético.

Meio	P(3HB) ₂₄ (g _{P(3HB)} /g _{açúcar})	P(3HB) ₄₈ (g _{P(3HB)} /g _{açúcar})
Glicose + N	0,19 ^b ± 0,0	0,15 ^c ± 0,0
Xilose + N	-	0,05 ± 0,0
Arabinose + N	0,04 ± 0,0	-

Tabela 4.11: Rendimento de P(3HB) em meio hidrolisado.

Meio	P(3HB) ₄₈ (g _{P(3HB)} /g _{açúcar})	P(3HB) ₇₂ (g _{P(3HB)} /g _{açúcar})
H. Enzimático	0,18 ^b ± 0,0	0,14 ^c ± 1,5
H. Enzimático + N	0,08 ^b ± 0,0	0,04 ^c ± 0,0

Pode-se observar que, apesar de a bactéria metabolizar todos os açúcares, a glicose é a principal responsável pelo acúmulo de P(3HB), visto o rendimento obtido no meio de glicose, similar ao observado no meio hidrolisado, que é bastante superior aos obtidos nos meios compostos por xilose e arabinose. Além disso, o baixo consumo de glicose no meio hidrolisado ácido, cuja concentração inicial de glicose era muito baixa, possivelmente prejudicou o acúmulo de P(3HB) nesse meio.

A biomassa residual, obtida da subtração da massa de polímero da biomassa total, é apresentada nas Tabelas 4.12 e 4.13. Vale lembrar que nem todas as amostras foram analisadas quanto ao acúmulo de polímero e, por isso, não constam nessa tabela.

Tabela 4.12: Concentração de biomassa residual em meio sintético.

Meio	R ₂₄ (g.L ⁻¹)	R ₄₈ (g.L ⁻¹)
Misto	-	-
Misto + N	-	-
Glicose	-	-
Glicose + N	2,0 ^b ± 0,1	2,3 ^b ± 0,4
Xilose	-	-
Xilose + N	-	1,3 ± 0,0
Arabinose	-	-
Arabinose + N	1,5 ^b ± 0,1	1,7 ^b ± 0,1

Para o meio composto por glicose, pode-se observar que biomassa residual se mantém constante; logo, se a biomassa total diminui, conforme mostrado na Tabela 4.6, há consumo de polímero nesse período. Para o meio composto por arabinose, tanto a biomassa total quanto a residual se mantém constantes, ou seja, já não há mais crescimento celular nesse período.

Tabela 4.13: Concentração de biomassa residual em meio hidrolisado.

Meio	R ₄₈ (g.L ⁻¹)	R ₇₂ (g.L ⁻¹)
H. Ácido	0,9 ^a ± 0,0	7,1 ^b ± 0,0
H. Ácido + N	0,8 ^a ± 0,1	6,0 ^b ± 0,3
H. Enzimático	2,6 ^a ± 0,2	6,4 ^b ± 0,3
H. Enzimático + N	2,7 ^a ± 0,9	7,4 ^b ± 0,0

A análise da biomassa residual permite afirmar que entre 48 e 72 horas de cultivo todos os meios hidrolisados apresentaram crescimento celular, como havia sido comentado numa análise preliminar da biomassa total. Pode-se observar que a biomassa total é igual à biomassa residual para os hidrolisados ácidos e diferente para os hidrolisados enzimáticos, confirmando que houve acúmulo de polímero nesse e não naquele.

Quanto à influência da fonte de nitrogênio, fica claro que, para o hidrolisado ácido, a suplementação reduziu a concentração de biomassa, pois, como citado anteriormente, a razão entre carbono e nitrogênio ficou muito menor que 8:1, como previsto, pois se supôs que a concentração de glicose nesse meio seria maior do que realmente é. Já para o hidrolisado enzimático, que apresentou concentração de glicose próxima a do meio misto sintético, a suplementação com nitrogênio acarretou em maior crescimento celular.

A variação do pH ao longo do cultivo é mostrada nas Tabelas 4.14 e 4.15. O pH inicial de todas as amostras foi ajustado a 7,0.

Tabela 4.14: pH em meio sintético.

Meio	pH ₂₄	pH ₄₈
Misto	5,9 ^a ± 0,0	5,8 ^b ± 0,0
Misto + N	6,0 ^a ± 0,0	5,9 ^b ± 0,0
Glicose	6,0 ^b ± 0,0	5,9 ^b ± 0,0
Glicose+ N	4,0 ^b ± 0,1	3,7 ^b ± 0,0
Xilose	6,0 ^a ± 0,0	5,9 ^b ± 0,0
Xilose + N	6,3 ^a ± 0,0	5,8 ^b ± 0,0
Arabinose	6,1 ^a ± 0,0	6,0 ^b ± 0,0
Arabinose + N	4,7 ^b ± 0,0	4,5 ^b ± 0,1

Pode-se notar que o pH de todas as amostras diminui com o tempo de cultivo e isso se deve, provavelmente, a substâncias ácidas resultantes do metabolismo da bactéria. Para o meio composto por glicose suplementado de nitrogênio, nota-se que em 48 horas o pH atingiu valores muito baixos considerados inibitórios, evidenciados pela diminuição de biomassa e P(3HB).

Tabela 4.15: pH em meio hidrolisado.

Meio	pH ₂₄	pH ₄₈	pH ₇₂
H. Ácido	5,4 ^b ± 0,0	5,4 ^b ± 0,0	5,8 ^c ± 0,0
H. Ácido + N	5,3 ^b ± 0,0	5,3 ^b ± 0,0	5,8 ^c ± 0,0
H. Enzimático	6,1 ^b ± 0,0	6,0 ^b ± 0,0	5,6 ^c ± 0,1
H. Enzimático + N	6,0 ^b ± 0,0	5,9 ^b ± 0,1	5,8 ^b ± 0,0

Quando comparados os resultados dos diferentes meios, é possível observar que os valores de pH dos meios hidrolisados não diminuem tanto quanto os dos meios sintéticos, mesmo apresentando maior quantidade de biomassa.

Comportamento semelhante foi observado por Koller *et al.* (2008) ao estudarem a produção de P(3HB) por *Pseudomonas hydrogenova* utilizando como fonte de carbono permeado de soro de leite. Nesse estudo, constatou-se que no meio sintético, composto por glicose e galactose, o pH baixou durante o experimento, enquanto que no meio de permeado se manteve constante, devido a complexidade desse meio. Apesar disso, como na produção de hidrolisado enzimático foi utilizado o tampão citrato de sódio a pH 4,8, é possível que tenha auxiliado na manutenção do pH do cultivo.

Em 24 horas, o maior valor de pH foi observado no meio xilose suplementado com nitrogênio, que é o meio em que houve o menor crescimento celular; já o menor pH foi observado no meio glicose suplementado de nitrogênio, no qual foram obtidas as

maiores quantidades de biomassa, evidenciando a relação entre o pH e o metabolismo da *B. megaterium*.

Devido à maior dificuldade da *B. megaterium* em metabolizar xilose e à baixa concentração de glicose presente no hidrolisado ácido, provavelmente não houve excesso de carbono e, por isso, a bactéria não acumulou P(3HB) nesse meio.

O meio enzimático, no qual foi observado o maior crescimento celular, é o meio de menor pressão osmótica, dentre os hidrolisados. Em meio similar ao sintético utilizado nesse trabalho, foi relatado uma pressão osmótica de apenas 316 mOsm.kg⁻¹ (CASSALES, 2010), cerca de três vezes menor que o valor encontrado para o hidrolisado enzimático, ressaltando o perfil osmofílico da *B. megaterium*.

O meio sintético misto, apesar de oferecer maior concentração de açúcares e menor pressão osmótica que o hidrolisado enzimático, não apresentou resultados satisfatórios, pois houve pouco crescimento celular, não sendo possível avaliar o acúmulo de P(3HB) pela bactéria nesse meio. Outros estudos devem ser realizados para entender os fatores que influenciaram esse resultado.

Nos experimentos envolvendo hidrolisados, na determinação de açúcares foram encontrados ácido acético e glicerol, que devem ser investigados se realmente fazem parte do metabolismo da bactéria, se é algum traço do próprio hidrolisado ou se estão erradamente identificados como esses componentes. Em Lenihan *et al.* (2010), é visto que ácido acético é originado na decomposição inicial da hemicelulose, como resultado da hidrólise de grupos acetil ligados aos açúcares.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

O P(3HB) aparece como um material polimérico ambientalmente correto e, em um contexto de maior conscientização ambiental, torna-se potencial alternativa aos polímeros petroquímicos, por isso a importância de seu estudo.

O crescimento celular da bactéria *B. megaterium* e seu acúmulo de P(3HB) a partir de hidrolisado de casca de soja foram estudados e comparados aos resultados obtidos em meio sintético. O hidrolisado enzimático mostrou-se uma alternativa viável aos substratos tradicionais, pois apresentou produção de P(3HB) e grande crescimento celular, mesmo em pressão osmótica elevada e sem nenhum tipo de otimização; além disso, o pH das amostras de hidrolisado não variou tanto quanto o das amostras de meio sintético, por se tratar de um meio complexo que pode atuar como um tampão, o que é uma vantagem, pois o crescimento da bactéria é maior próximo do pH neutro.

A influência da fonte de nitrogênio foi observada nos meios sintéticos, nos quais a suplementação acarretou em maiores quantidades de biomassa; já para os meios hidrolisados, a suplementação com fonte de nitrogênio não tem influência significativa no meio hidrolisado, por se tratar de um meio rico em nutrientes, possivelmente compostos nitrogenados.

Como sugestões para trabalhos futuros pode ser citada a determinação de nitrogênio, para verificar o consumo desse nutriente pela bactéria ao longo do cultivo e relacionar com o crescimento e o acúmulo de P(3HB). Pode-se citar também a otimização do meio hidrolisado e a razão entre carbono e nitrogênio, visando maiores quantidades de biopolímero, bem como a utilização desse meio ainda na reativação da bactéria.

6 Referências

CASSALES, A. R. Otimização da hidrólise da casca de soja e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por microrganismos sobre este hidrolisado. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2010.

CASSALES, A. R.; SOUZA-CRUZ, P. B.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. *Biomass & Bioenergy*, v. 35, p. 4675-4683, 2011.

CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 110, n. 6, p. 621-632, 2010.

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*, v. 84, n. 12, p. 1756–1761, 2009.

GNANASAMBANDAN, R.; PROCTOR, A. Preparation of soy hull pectin. *Food Chemistry*, v. 65, p. 461-467, 1999.

GOUDA, M. K.; SWELLAM, A. E.; OMAR, S. H. Production of PHB by *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.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 10-18, 2009.

HICKERT, L. R. Bioconversão de hidrolisados de casca de arroz e soja a etanol e xilitol por leveduras. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2014.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation — are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, v. 8, n. 3, p. 301-306, 2005.

JAIN, A.; MORLOK, C. K.; HENSON, J. M. Comparison of solid-state and submerged-state fermentation for the bioprocessing of switchgrass to ethanol and acetate by *Clostridium phytofermentans*. *Bioenergy and Biofuels*, v. 97, n. 2, p. 905-917, 2013.

KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, v. 13, n. 3, p. 321-326, 2010.

KOLLER, M.; BONA, R.; CHIellini, E.; FERNANDES, E. G.; HORVAT, P.; KUTSCHERA, C.; HESSE, P.; BRAUNEGG, G. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 11, p. 4854-4863, 2008.

KULPREECHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 107, n. 3, p. 240-245, 2009.

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

LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, v. 14, n. 11, p. 431-438, 1996b.

LENIHAN, P.; OROZCO, A.; O'NEILL, E.; AHMAD, M. N. M.; ROONEY, D. W.; WALKER, G. M. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal*, v. 156, p. 395-403, 2010.

MAPA, 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja> (acesso em 01/03/2015).

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 673-686, 2005.

OBRUCA, S.; MAROVA, I.; MELUSOVA, S.; MRAVCOVA, L. Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037. *Annals of microbiology*, v. 61, n. 4, p. 947-953, 2011.

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*, v. 23, n. 14, p. 1119-1123, 2001.

PESSOA-JR, A.; ROBERTO, I. C.; MENOSSI, M.; SANTOS, R. R. D.; FILHO, S. O.; PENNA, T. C. V. Perspectives on Bioenergy and Biotechnology in Brazil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121-124, n. 5, p. 59-70, 2005.

Plastics Europe, 2015. Plastics - The Facts 2014/2015: an analysis of european plastics production, demand and waste data. Disponível em: <http://www.plasticseurope.org/Document/plastics-the-facts-20142015.aspx?FolID=2> (acesso em 01/03/2015).

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography A*, v. 445, p. 285-289, 1998.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 71, n. 6, p. 783-789, 2006.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *International Journal of Science and Nature*, v. 3, p. 480-486, 2012.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Process in Polymer Science*, v. 25, n. 10, p. 1503-1555, 2000.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1-11, 2002.

USDA, 2015. World Agricultural Production. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf> (acesso em 13/06/2015).

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 International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 91, n. 1, p. 1-17, 2007.

WANG, F.; 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, n. 9, p. 3703-3706, 1997.