

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DE ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO DE  
POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-CO-3-HIDROXIVALERATO) POR  
RALSTONIA EUTROPHA UTILIZANDO SUBSTRATOS DE BAIXO  
CUSTO E ÁCIDO PROPIONICO**

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do grau de mestre em  
Engenharia Química.

*Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Maria Falcão de Aragão*

*Co-orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Junior*

**Cintia Marangoni**

*Eng<sup>a</sup>. Química*

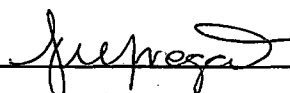
FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2000

**Estudo de Estratégias de Produção de Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por *Ralstonia eutropha* Utilizando Substratos de Baixo Custo e Ácido Propiônico**

por

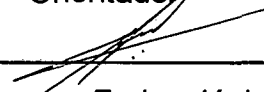
**CINTIA MARANGONI**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, pela comissão:



\_\_\_\_\_  
Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão

Orientador

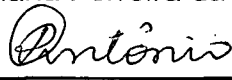

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Agenor Furigo Júnior

Co-Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Humberto Jorge José

Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Eng. Química

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Luíziana Ferreira da Silva  
\_\_\_\_\_  
Dra. Regina Vasconcellos Antônio  
\_\_\_\_\_  
Dr. Agenor Furigo Júnior  
\_\_\_\_\_  
Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2000.

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC

*Research is to see what everybody  
else sees and to think what nobody  
else has thought.*

Albert Szent-Gyorgyi

Aos meus pais com todo o meu amor e carinho.

E às minhas amigas, Vivi e Cris.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço com muita admiração a Prof. Dr<sup>a</sup> Gláucia Maria Falcão de Aragão pela orientação, disponibilidade e presença durante toda esta caminhada, e especialmente pela amizade e carinho.

Ao Prof. Dr. Agenor Furigo Junior, agradeço muitíssimo também a sua orientação, amizade e apoio durante a realização deste trabalho.

Às professoras Dr<sup>a</sup> Luiziana Ferreira da Silva e Dr<sup>a</sup> Regina Vasconcellos Antônio por aceitarem participar da banca de defesa desta dissertação, enriquecendo este trabalho.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro à ciência no Brasil.

Quero agradecer com muito carinho às minhas amigas Vivian Alexandra Krauss e Cristiana Gomes de Oliveira, pelo companheirismo, paciência, ajuda e presença especialmente nos momentos difíceis.

Também agradeço as amigas, Denise Esteves Moritz, tão disposta a ajudar a qualquer momento no dia a dia e a Márcia Brandão Palma, minha professora, por toda a segurança, incentivo, apoio e amizade dedicada.

Minha gratidão aos amigos, Rafael de Oliveira Pinto e Daniela Becker pela ajuda e contribuição, essenciais para a conclusão deste trabalho.

À todos os colegas de laboratório em especial à Rita de Cássia Siqueira Curto, meus colegas de turma, professores e funcionários do DEQA que me acolheram, conviveram e contribuíram a tornar meus projetos realidade.

*Meus agradecimentos e todo o meu amor aos meus pais, por tudo o que me representam em minha vida, mas especialmente pelo incentivo a sempre dar um passo adiante.*

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	i
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>NOMENCLATURA</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 OBJETIVOS.....	03
<b>CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	05
2.1 O IMPACTO AMBIENTAL CAUSADO POR MATERIAIS PLÁSTICOS.....	05
2.1.1 A biodegradabilidade como alternativa ao problema ambiental.....	06
2.2 DESCRIÇÃO DOS POLIHIDROXIALCANOATOS.....	07
2.2.1 Histórico dos PHA's.....	08
2.2.2 Características e Propriedades.....	09
2.3 MICRORGANISMOS PRODUTORES.....	12
2.3.1 Bactérias do gênero <i>Azotobacter</i> .....	14
2.3.2 Microrganismos metilotróficos.....	14
2.3.3 Bactérias do gênero <i>Alcaligenes</i> .....	15
2.3.4 Bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> .....	15
2.3.5 <i>Escherichia coli</i> .....	16
2.3.6 Plantas Transgênicas.....	17

2.3.7 Lodo ativado .....	17
2.3.8 <i>Ralstonia eutropha</i> .....	18
2.4 DESCRIÇÃO GERAL DA <u>RALSTONIA EUTROPHA</u> .....	18
2.5 BIOSÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE PHA'S .....	21
2.5.1 Biossíntese de P(3HB) .....	21
2.5.1.1 3-β-cetotiolase.....	22
2.5.1.2 Acetoacetil CoA redutase.....	23
2.5.1.3 PHA-sintase .....	24
2.5.1.4 Recuperação das coenzimas .....	24
2.5.2 Biossíntese de P(3HB-co-3HV) .....	25
2.5.3 Degradação Intracelular de PHA's .....	26
2.5.3.1 Regulação da Síntese de PHA's .....	27
2.6 PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS .....	29
2.6.1 Culturas em regime de batelada alimentada .....	32
2.6.2 A influência de alimentação ou carência do elemento limitante na produção de PHA's .....	33
2.6.3 Influência do ácido propiônico na produção de P(3HB-co-3HV).....	34
2.6.4 Influência da utilização de suplementos.....	35
2.6.5 Substratos de Baixo Custo .....	36
2.6.5.1 Amido hidrolisado.....	36
2.6.5.2 Gorduras e Óleos.....	37
2.6.5.3 Soro de Leite.....	37
2.6.5.4 Melaço.....	38
2.6.5.5 Resíduo da fervura de suínos .....	39
2.6.5.6 Resíduo da destilação do álcool.....	39
2.6.5.7 Caseína hidrolisada como fonte de nitrogênio.....	40
2.6.7 Influência da Concentração Celular .....	40
2.7 DETECÇÃO E EXTRAÇÃO DE PHA'S.....	41
2.8 CARACTERIZAÇÃO DE PHA'S.....	42
2.9 APLICAÇÕES .....	43
2.10 BIODEGRADABILIDADE .....	45
2.11 FATORES QUE INFLUENCIAM O CUSTO DE PRODUÇÃO.....	48
2.11.1 Produtividade de PHA .....	49



2.11.2	Conteúdo de PHA's em células .....	50
2.11.3	Custo da Fonte de Carbono .....	51
2.11.4	Influência do Oxigênio dissolvido .....	52
2.11.5	Métodos de Recuperação .....	53
<b>Capítulo III - MATERIAL E MÉTODOS .....</b>		<b>54</b>
<i>EXPERIMENTOS REALIZADOS .....</i>		<i>54</i>
<i>MICROORGANISMO .....</i>		<i>55</i>
<i>MEIOS DE CULTURA .....</i>		<i>55</i>
<i>CULTURAS EM FRASCOS AGITADOS .....</i>		<i>57</i>
3.4.1	Preparo das soluções das fontes de carbono .....	58
3.4.1.1	Glicose, Frutose, Galactose e Açúcar Invertido .....	58
3.4.1.2	Lactose Hidrolisada .....	58
3.4.1.3	Soro de leite hidrolisado .....	58
3.4.2	Preparo da Solução de Nitrogênio - Milhocina .....	60
<i>CULTURAS EM BIORREATOR .....</i>		<i>61</i>
3.5.1	Preparo do meio de cultura .....	61
3.5.1.1	Solução de açúcar invertido .....	61
3.5.1.2	Solução de soro de leite hidrolisado .....	62
3.5.2.3	Solução de Fosfato .....	62
3.5.2	Preparo do Inóculo .....	62
3.5.3	Condições de Operação .....	62
3.5.4	Estratégias de Alimentação .....	63
3.5.4.1	Alimentação em Fosfato .....	63
3.5.4.2	Alimentação em Açúcar invertido .....	63
3.5.4.3	Alimentação em ácido propiônico .....	63
3.5.4.4	Alimentação em ácido oleico .....	64
<i>MÉTODOS ANALÍTICOS .....</i>		<i>64</i>
3.6.1	Amostragem .....	64
3.6.2	Determinação da Concentração da Biomassa .....	64
3.6.2.1	Medida por espectrometria .....	66
3.6.2.2	Gravimetria .....	66
3.6.3	Dosagem de Substratos .....	66

3.6.3.1 Açúcar Invertido e Soro de leite hidrolisado.....	66
3.6.3.2 Proteínas .....	67
3.6.3.3 Dosagem de Fosfato .....	67
3.6.3.4 Dosagem de Ácido Propiônico .....	69
3.6.4 Dosagem de P(3HB-co-3HV).....	69
3.7 TRATAMENTO DE DADOS.....	70
3.7.1 Ajuste dos Dados Experimentais .....	70
3.7.2 Análise Cinética.....	70
3.7.2.1 Velocidades Específicas de Crescimento .....	70
3.7.2.2 Velocidade Específica de Produção de P(3HB-co-3HV).....	71
3.7.3 Fatores de Conversão .....	71
3.7.4 Produtividade Média de P(3HB-co-3HV) .....	71
3.7.5 Produtividade de P(3HB-co-3HV) na Fase de Produção .....	72
3.8 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE P(3HB-CO-3HV) .....	72
3.8.1 Extração de P(3HB-co-3HV).....	72
3.8.2 Caracterização de P(3HB-co-3HV).....	73
<b>Capítulo IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
4.1 ESTUDOS PRELIMINARES .....	74
4.1.1 Influência da Fonte de Carbono no Crescimento de <i>R. eutropha</i> .....	75
4.1.1.1 Uso de diferentes fontes de carbono como único substrato disponível .....	75
4.1.1.2 Uso de Misturas de Substratos .....	78
4.1.1.3 Uso de Soro de Leite como Fonte de Carbono.....	82
4.1.2 Efeito da Concentração de Substrato no Crescimento de <i>Ralstonia eutropha</i> .....	83
4.1.3 Influência da Fonte de Nitrogênio: Uso da Milhocina.....	85
4.1.4 Influência da Temperatura.....	88
4.2 AVALIAÇÃO DA ESTRATÉGIA DE LIMITAÇÃO DO NUTRIENTE NA FASE DE PRODUÇÃO: CARÊNCIA X ALIMENTAÇÃO .....	91
4.2.1 Cultura em carência de fósforo.....	92
4.2.2 Cultura em Alimentação de fósforo.....	94

4.2.3 Comparação entre a limitação em carência ou em alimentação de fósforo .....	97
<b>4.3 UTILIZAÇÃO DE SORO DE LEITE COMO FONTE DE CARBONO PARA PRODUÇÃO DE P(3HB-CO-3HV): ESTUDO DE ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO QUE INTERFEREM NA INCORPORAÇÃO DE 3HV NO POLÍMERO .....</b>	<b>101</b>
<b>4.4 UTILIZAÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO COMO FONTE DE CARBONO PARA PRODUÇÃO DE P(3HB-CO-3HV): ESTUDO DE ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO QUE INTERFEREM NA INCORPORAÇÃO DE 3HV NO POLÍMERO .....</b>	<b>108</b>
4.4.1 Cultura utilizando-se Ácido Propiônico como Regulador de pH .....	109
4.4.2 Cultura utilizando-se pulsos de Ácido Propiônico.....	110
4.4.3 Cultura utilizando-se alimentação contínua de Ácido Propiônico .....	114
4.4.4 Comparação entre as estratégias utilizadas .....	117
<b>4.5 ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO COMO INDUTOR AO ACÚMULO DE POLÍMERO .....</b>	<b>123</b>
4.5.1 Cultura utilizando-se alimentação contínua de Ácido Propiônico com suplementação em ácido oleico.....	123
4.5.2 Comparação entre as culturas .....	126
<b>4.6 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE P(3HB-CO-3HV).....</b>	<b>131</b>
 <b>CAPÍTULO V - CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....</b>	 <b>133</b>
 <b>CAPÍTULO VI - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	 <b>139</b>
 <b>ANEXOS .....</b>	 <b>161</b>
Anexo I: Material e Métodos – Curvas de Calibração .....	161
Anexo II: Estudos Preliminares – Curvas de Crescimento .....	166
Anexo III: Resultados Experimentais– Curvas de Consumo de Substrato .....	172
Anexo IV: Culturas Realizadas – Evolução do pH.....	177
Anexo V: Culturas Realizadas – Fatores de Conversão .....	182
Anexo VI: Caracterização de P(3HB-co-3HV) – Curvas de DSC e TGA.....	188

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> Estrutura geral dos polihidroxicanoatos para diferentes monômeros ...	8
<b>Figura 2.2:</b> Estrutura monomérica do Poli(3-hidroxi-burirato-co-3-hidroxi-valerato) ..	10
<b>Figura 2.3:</b> Forma de <i>Ralstonia eutropha</i> na fase de crescimento apresentada por Ampe, 1995 (Barra Branca = 10 $\mu$ m) .....	19
<b>Figura 2.4:</b> Forma de <i>Ralstonia eutropha</i> na fase de produção apresentada por Gomez et al., 1997 (Foto aumentada 32.000 vezes) .....	19
<b>Figura 2.5:</b> Metabolismo central da <i>R. eutropha</i> : ciclo de Krebs e enzimas em torno do piruvato e do acetato. AcoE: acetil-CoA sintetase; CT: $\beta$ -cetotiolase; EM: enzima málica; ICL: isocitrato liase; MS: malato sintase; OAD: oxaloacetato descarboxilase; PCK: PEP carboxiquinase; PK: piruvato quinase; PPS: PEP sintetase (apresentado por Schobert e Bowien, 1984).....	20
<b>Figura 2.6:</b> Síntese e degradação de P(3HB). CT: $\beta$ -cetotiolase (apresentado por Steinbüchel e Schlegel, 1991). .....	22
<b>Figura 2.7:</b> Via de produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) a partir de glicose e propionato apresentada por Doi (1990).....	26
<b>Figura 2.8:</b> Regulação da biossíntese e degradação de P(3HB).....	29
<b>Figura 2.9:</b> Ilustração de um processo produtivo apresentado pela empresa Metabolix.....	31
<b>Figura 2.10:</b> Esquema representativo do <i>design</i> espacial de aplicações de PHA's apresentado pela empresa Metabolix.....	45
<b>Figura 2.11:</b> Biociclo de Polihidroxicanoatos .....	48

<b>Figura 3.1:</b> Equipamento ( <i>Shaker</i> ) utilizado nas culturas de <i>Ralstonia eutropha</i> em frascos agitados.....	57
<b>Figura 3.2:</b> Esquema de obtenção do concentrado e do permeado, através da Ultrafiltração do Soro de queijos.....	59
<b>Figura 3.3:</b> Milhocina: Aspecto do resíduo antes (esquerda) e depois (direita) do tratamento necessário à sua utilização como fonte de nitrogênio.....	60
<b>Figura 3.4:</b> Biorreator utilizado para as culturas celulares.....	61
<b>Figura 3.5</b> Diagrama esquemático da seqüência de amostragem.....	65
<b>Figura 4.1:</b> Evolução da concentração de biomassa durante a cultura com açúcar invertido, glicose, frutose ou galactose, oferecidos como única fonte de carbono disponível(20 g.L <sup>-1</sup> ). .....	76
<b>Figura 4.2:</b> Evolução da concentração de biomassa (g.L <sup>-1</sup> ) ao longo da cultura de <i>Ralstonia eutropha</i> em 20g.L <sup>-1</sup> de Lactose Hidrolisada (A – concentração celular; B – logaritmo neperiano) em ensaios realizados em frascos agitados.....	77
<b>Figura 4.3:</b> Concentração de <i>Ralstonia eutropha</i> durante as culturas realizadas com mistura de lactose hidrolisada, glicose, frutose e açúcar invertido.....	79
<b>Figura 4.4:</b> Crescimento celular de <i>Ralstonia eutropha</i> durante a cultura realizada com 40 g.L <sup>-1</sup> de substrato: glicose (50%) e frutose (50%).....	80
<b>Figura 4.5:</b> Evolução da concentração celular (g.L <sup>-1</sup> ) durante a cultura quando soro de leite (15 g.L <sup>-1</sup> ) foi utilizado como fonte de carbono (A – concentração celular, B – ln da concentração).....	82
<b>Figura 4.6:</b> Evolução da concentração celular (g.L <sup>-1</sup> ) durante a cultura quando soro de leite (15 g.L <sup>-1</sup> ) e açúcar invertido (20 g.L <sup>-1</sup> ) foram utilizados como fonte de carbono (A – concentração celular, B – logaritmo neperiano).....	83
<b>Figura 4.7:</b> Concentração celular de <i>Ralstonia eutropha</i> em função da cultura quando foi utilizado diferentes concentrações de açúcar invertido.....	84
<b>Figura 4.8:</b> Evolução da concentração celular de <i>Ralstonia eutropha</i> ao longo da cultura com 40 g.L <sup>-1</sup> de substrato: glicose (25%), frutose (25%), lactose hidrolisada (25%) e açúcar invertido (25%) utilizando-se sulfato de amônia e milhocina como fontes de nitrogênio.....	86
<b>Figura 4.9:</b> Evolução da concentração celular de <i>Ralstonia eutropha</i> ao longo da cultura com 20 g.L <sup>-1</sup> de frutose com milhocina e sulfato de amônio.....	87

<b>Figura 4.10:</b> Evolução da concentração celular de <i>Ralstonia eutropha</i> ao longo da cultura de galactose em 20 g.L <sup>-1</sup> nas temperaturas de 30°C e 34°C .....	89
<b>Figura 4.11:</b> Evolução da concentração celular de <i>Ralstonia eutropha</i> ao longo da cultura com 15 g.L <sup>-1</sup> de lactose hidrolisada a 30°C (A) e a 34°C (B) .....	89
<b>Figura 4.12:</b> Evolução da massa de biomassa residual (expressa em ln) e da massa de fosfato na cultura conduzida com carência em fósforo durante a fase de produção .....	92
<b>Figura 4.13:</b> Evolução das quantidades em massa de fosfato (fosf), biomassa total (xt) e residual (xr), proteína (prot), substrato (sub) e polímero (pol) em função tempo para a cultura conduzida em carência de fosfato .....	94
<b>Figura 4.14:</b> Evolução da massa de biomassa residual (expressa em ln) e da massa de fosfato na cultura conduzida com alimentação de fósforo durante a fase de produção .....	95
<b>Figura 4.15:</b> Evolução das quantidades de fosfato (fosf), biomassa total (xt) e residual (xr), proteína (prot), substrato (sub) e polímero (pol) em função tempo para a cultura conduzida em alimentação de fosfato .....	97
<b>Figura 4.16:</b> Evolução do acúmulo de P(3HB-co-3HV) e dos monômeros 3HB e 3HV durante as culturas em função do tempo (A – carência em fosfato; B – alimentação em fosfato) .....	97
<b>Figura 4.17:</b> Composição de P(3HB-co-3HV) nas culturas realizadas sob carência (A) e alimentação (B) de P(3HB-co-3HV) .....	98
<b>Figura 4.18:</b> Produtividade média expressa em gP(3HB-co-3HV)L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> para as duas culturas estudadas .....	99
<b>Figura 4.19:</b> Velocidade específica para as duas culturas estudadas .....	100
<b>Figura 4.20:</b> Evolução da massa de biomassa residual para a cultura conduzida com pulsos de ácido propiônico e soro de leite como fonte de carbono .....	102
<b>Figura 4.21:</b> Evolução da formação de biomassa total (xt) e residual (xr), proteína (prot), acúmulo de polímero (pol) e consumo de substrato (sub) em função do tempo para a cultura com pulsos de ácido propiônico e soro de leite como fonte de carbono .....	104
<b>Figura 4.22:</b> Evolução da massa do copolímero (P(3HB-co-3HV)) e dos monômeros 3HB e 3HV ao longo da cultura realizada com soro de leite .....	105
<b>Figura 4.23:</b> Produtividade em (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) em soro de Leite .....	106

<b>Figura 4.24.:</b> Velocidade específica ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) de produção de P(3HB-co-3HV) obtida em soro de leite.....	106
<b>Figura 4.25:</b> Diagrama esquemático do mecanismo de consumo por <i>Azotobacter vinelandii</i> de ácido propiônico sugerido por Visser e Postma (1973) e descrito por Choi e Kim (1992).....	109
<b>Figura 4.26:</b> Evolução da concentração de biomassa residual (expressa em ln) e massa de fosfato em função do tempo para cultura alimentada com pulsos de ácido propiônico.....	112
<b>Figura 4.27:</b> Evolução das quantidades de biomassa total (xt) e residual (xr), proteína (prot), fosfato (fosf), açúcar invertido (sub) e polímero (pol) em função do tempo para a cultura utilizando pulsos de ácido propiônico.....	114
<b>Figura 4.28:</b> Evolução da biomassa residual e da massa de fosfato em função do tempo para a cultura conduzida com alimentação contínua de fosfato.....	115
<b>Figura 4.29:</b> Evolução das quantidades de biomassa total (xt) e residual (xr), proteína (prot), fosfato (fosf), açúcar invertido (sub) e polímero (pol) em função do tempo para a cultura utilizando alimentação contínua de ácido propiônico.....	117
<b>Figura 4.30:</b> Evolução do acúmulo de P(3HB-co-3HV) e dos monômeros 3HB e 3HV em função do tempo para as culturas com regulação de pH (A); pulsos (B); alimentação contínua (C).....	118
<b>Figura 4.31:</b> Composição final de P(3HB-co-3HV) em termos de 3HB e 3HV para as culturas com regulação de pH (A); pulsos (B); alimentação contínua (C).....	118
<b>Figura 4.32:</b> Produtividade em polímero expressa em ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) durante as culturas as quais se utiliza as três estratégias estudadas.....	120
<b>Figura 4.33:</b> Produtividade em 3HV ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) para as três estratégias analisadas.....	120
<b>Figura 4.34:</b> Velocidade específica de produção de P(3HB-co-3HV) durante as culturas estudadas.....	122
<b>Figura 4.35:</b> Velocidade específica de produção de 3HV durante as culturas estudadas.....	122
<b>Figura 4.36:</b> Evolução da biomassa residual e da massa de fosfato para a cultura alimentada com pulsos de ácido propiônico e suplementada com ácido oleico.....	125
<b>Figura 4.37:</b> Evolução das quantidades de biomassa total (xt) e residual (xr), proteína (prot), fosfato (fosf), polímero (pol) e substrato (sub) em função do tempo	

---

para a cultura com alimentação contínua de ácido propiônico e suplementada com ácido oleico.....	126
<b>Figura 4.38:</b> Evolução do acúmulo de P(3HB-co-3HV) em culturas com alimentação contínua de ácido propiônico sem suplementação (A) e com suplementação (B) de ácido oleico durante a fase de produção.....	127
<b>Figura 4.39</b> Proporção de 3HV nas culturas com ácido oleico: com suplementação (A) e sem suplementação (B).....	128
<b>Figura 4.40:</b> Produtividade média em polímero para as culturas realizadas com alimentação contínua e ácido propiônico com e sem suplementação de ácido oleico.....	128
<b>Figura 4.41:</b> Produtividade média em $\text{g3HV.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ para as culturas realizadas com alimentação contínua de ácido propiônico com e sem suplementação de ácido oleico.....	129
<b>Figura 4.42.:</b> Velocidade específica de produção de copolímero para as culturas realizadas com alimentação contínua de ácido propiônico com e sem suplementação de ácido oleico.....	129
<b>Figura 4.43:</b> Comparação entre o acúmulo de polímero para as culturas com e sem suplementação de ácido oleico aplicadas e ácido propiônico adicionado por alimentação contínua.....	130
<b>Figura 4.44:</b> P(3HB-co-3HV) precipitado em metanol e $\text{H}_2\text{O}$ (7:3) após a extração.....	131



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Principais características dos polímeros poli(3-hidroxi- <i>butirato-co-3-hidroxi-<i>valerato</i></i> ), polihidroxi- <i>octanoato</i> (PHO) e polipropileno (PP) .....	11
<b>Tabela 2.2:</b> Comparação das propriedades de P(3HB- <i>co-3HV</i> ) com outros polímeros .....	11
<b>Tabela 2.3:</b> Capacidade de acúmulo de PHA's por alguns microrganismos .....	13
<b>Tabela 2.4:</b> Produção industrial de PHA's .....	44
<b>Tabela 2.5:</b> Biodegradação de P(3HB- <i>co-3HV</i> ) em diferentes ambientes .....	46
<b>Tabela 2.6</b> Estimativa do custo operacional de produção de 100000 toneladas/ano de P(3HB) com <i>A. latus</i> , <i>M. organophilum</i> e <i>E. coli</i> recombinante como microrganismos produtores. O P(3HB) foi recuperado por surfactante e hipoclorito (Choi e Lee, 1999a). .....	50
<b>Tabela 2.7</b> Efeito do custo do substrato e do fator de conversão em P(3HB) sobre o custo de produção de P(3HB) (apresentado por Lee 1996a). .....	52
<b>Tabela 3.1:</b> Composição do meio MM .....	56
<b>Tabela 3.2:</b> Composição da solução concentrada de oligo-elementos. ....	56
<b>Tabela 3.3:</b> Composição média do soro e dos produtos obtidos através da ultrafiltração .....	59
<b>Tabela 3.4:</b> Seqüência para a dosagem de fosfato. ....	68
<b>Tabela 4.1</b> Valores de $\mu_{max}$ obtidos para diferentes associações de fontes de carbono. ....	81
<b>Tabela 4.2:</b> Testes realizados com milhocina como fonte de nitrogênio .....	88

---

<b>Tabela 4.3:</b> Alimentações realizadas durante a cultura em carência de fósforo. ....	93
<b>Tabela 4.4:</b> Alimentações realizadas durante a cultura em alimentação de fósforo. ....	96
<b>Tabela 4.5:</b> Resumo dos dados gerais obtidos nas duas culturas. ....	97
<b>Tabela 4.6:</b> Alimentações realizadas durante a cultura em soro de leite. ....	103
<b>Tabela 4.7:</b> Alimentações realizadas durante a cultura com pulsos. ....	113
<b>Tabela 4.8:</b> Alimentações realizadas durante a cultura com alimentação contínua. ....	116
<b>Tabela 4.9:</b> Resumo dos resultados obtidos nas três estratégias empregadas. ....	117
<b>Tabela 4.10:</b> Fatores de conversão de açúcar invertido em biomassa total na fase de crescimento ( $Y_{Xt/S_{cres}}$ ) e produção ( $Y_{Xt/S_{prod}}$ ) e de ácido propiônico em 3-hidroxicincomato ( $Y_{3HV/ácido}$ ) em massa e mol para as culturas realizadas. ....	119
<b>Tabela 4.11:</b> Alimentações realizadas durante a cultura com ácido oleico. ....	124
<b>Tabela 4.12:</b> Resultados obtidos para as culturas com e sem suplementação de ácido oleico. ....	127
<b>Tabela 4.13:</b> Características estudadas para a comparação de P(3HB-co-3HV) produzido experimentalmente e P(3HB-co-3HV) comercial. ....	132

## NOMENCLATURA

$\mu$	velocidade específica de crescimento celular ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_{\text{max}}$	velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\text{h}^{-1}$ )
abs	absorbância
DSM	<i>Deutsche Sammlung vor Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
PHA	polihidroxialcanoato
P(3HB)	poli-3-hidroxi-butirato
P(3HB-co-3HV)	poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato
3HV	3-hidroxi-valerato
3HB	3-hidroxi-butirato
$P_r$	produtividade média de P(3HB) ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
$P_p$	produtividade na fase de produção ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
$q_{\text{PHB}}$	velocidade específica de produção de P(3HB) ( $\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
Q	componente que pode ser biomassa, biomassa residual ou P(3HB) (g)
rpm	rotações por minuto
S	substrato utilizado (g)
t	tempo (h)
vvm	volume de ar por volume de meio por minuto
$X_r$	biomassa residual (g)
$X_{r_0}$	biomassa residual inicial (g)
$X_t$	biomassa total (g)

---

$Y_{Q/S}$	fator de conversão de substrato S no componente Q ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$Y_{Xt/S \text{ cres}}$	fator de conversão de açúcar invertido em biomassa total na fase de crescimento ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$Y_{Xt/S \text{ prod}}$	fator de conversão de açúcar invertido em biomassa total na fase de produção ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$Y_{Xr/S}$	fator de conversão de açúcar invertido em biomassa residual ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$Y_{P(3HB)/S}$	fator de conversão de açúcar invertido em P(3HB) ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$Y_{3HV/\text{ácido}}$	fator de conversão de ácido propiônico em 3-hidroxicaproato ( $\text{g.g}^{-1}$ )
fosf	fosfato
xt	biomassa total
xr	biomassa residual
prot	proteína
pol	polímero
sub	substrato
$\text{PHA}_{\text{SSC}}$	PHA ( <i>short side chain</i> )
$\text{PHA}_{\text{MSC}}$	PHA ( <i>medium side chain</i> )
PHO	polihidroxioctanoato
PP	polipropileno
ATP	adenosina trifosfato
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
IPT	Instituto de Pesquisas Tecnológicas
DNS	Dinitrosalicílico
DSC	Calorimetria de varredura diferencial
TGA	Termogravimetria
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
NPCM	<i>non polymer cell material</i>

## RESUMO

O biopolímero poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (P(3HB-co-3HV)) apresenta propriedades termoplásticas próximas aos plásticos petroquímicos e é acumulado no interior das células de diversos microrganismos em condições de crescimento desbalanceado. A produção industrial deste polímero é realizada em culturas de *Ralstonia eutropha* em glicose, mas há muito a ser pesquisado no sentido de melhorar as condições de produção visando baratear os custos deste biomaterial. Visando testar substratos alternativos que diminuíssem o custo de produção, foram realizados testes em frascos agitados, estudando-se o crescimento de *R. eutropha* em diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, galactose, lactose hidrolisada e açúcar invertido). Quando açúcar invertido foi utilizado como substrato, obteve-se a maior velocidade específica de crescimento ( $0,26 \text{ h}^{-1}$ ) em concentrações de  $20 \text{ g.L}^{-1}$ . A mistura de diferentes substratos não apresentou nenhum efeito potencializador sobre o crescimento. Em substituição à fonte de nitrogênio normalmente utilizada (sulfato de amônio), a milhocina mostrou-se viável, apenas com a ressalva que deve ser feito um tratamento prévio à sua utilização. Experimentos em regime descontínuo alimentado foram realizados em biorreator, estudando-se a alimentação ou carência de fósforo (elemento limitante). Observou-se que a alimentação em fósforo durante a fase de produção proporcionou uma produtividade em P(3HB-co-3HV) menor ( $0,19 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) do que a cultura em carência em fósforo ( $0,26 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) mas a velocidade específica de produção da primeira cultura apresentou um comportamento crescente durante toda a cultura. Assim, as demais culturas foram realizadas com alimentação de fósforo. Com o objetivo de melhorar a incorporação de unidades de 3HV ao P(3HB-co-3HV) foram aplicadas três estratégias de alimentação de ácido propiônico (regulação de pH, pulsos e alimentação contínua) em culturas conduzidas com açúcar invertido e soro de leite. A estratégia de regulação de pH não demonstrou-se viável quando utilizada com soro de leite pois este meio é rico em agentes tamponantes mantendo o pH do meio estável. Aplicando-se pulsos de ácido propiônico obteve-se baixa produtividade em polímero ( $0,07 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) mas uma composição atrativa (37% de 3HV). Das três estratégias aplicadas com açúcar invertido, o melhor acúmulo de polímero foi obtido com a técnica de regulação de pH (30,6%), mas a melhor composição obteve-se com alimentação contínua (26% de 3HV). Estudou-se a utilização de ácido oleico como suplemento nutricional na cultura com alimentação contínua e obtiveram-se melhores resultados de produtividade e de acúmulo de polímero, porém com menor quantidade de 3HV incorporada, em relação à cultura não suplementada. As características térmicas do polímero obtido foram comparadas ao polímero comercial e apresentaram-se muito próximas.

## ABSTRACT

The biopolymer poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P (3HB-co-3HV)) has thermoplastic properties close to petrochemical plastics and it is stored in the cells of many microorganisms under unbalanced conditions. The industrial production of this polymer is usually carried out in cultures of *Ralstonia eutropha* using glucose as carbon source. However, there is much more to be searched to improve the production conditions aiming cost reduction of this biomaterial. Looking for alternative substrates to reduce production costs, experiments in stirred flasks were done, studying *Ralstonia eutropha* growth in different carbon sources (glucose, fructose, galactose, hydrolyzed lactose and inverted sugar). In Inverted sugar, *Ralstonia eutropha* has shown the higher specific growth rate ( $0,26 \text{ h}^{-1}$ ) in sugar concentration of  $20 \text{ g. L}^{-1}$ . The mixture of different substrates has not shown any potential effect for the growth. Corn steep liquor has shown be viable to substitute the nitrogen source normally used (ammonium sulfate) however it is necessary a previous treatment for its utilization. Experiments in fed batch were carried out in bioreactor, studying the feeding or exhaustion of phosphorous, the limiting element. It was observed that although the (P(3HB-co-3HV) productivity for phosphorous feeding during the production phase ( $0.19 \text{ g. L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) is lower than exhaustion of phosphorous ( $0.26 \text{ g. L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), the specific production rate for phosphorous feeding has shown a growing behavior along the culture. So, the other cultures were carried out with phosphorous feeding. With the objective of getting better 3HV incorporation to P (3HB-co-3HV) three strategies of propionic acid feeding were applied (pH regulation, pulses and continuous feeding) in cultures carried out with inverted sugar and whey. The pH regulation strategy was not viable when used with whey due to its composition which maintain stable the pH of the broth. Applying pulses of propionic acid, it was obtained a small P (3HB-co-3HV) productivity ( $0.07 \text{ g. L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), but an attractive polymer composition (37% of 3HV). Comparing the three strategies, using inverted sugar as substrate, the better polymer storage was obtained with pH regulation (30.6%(wt/wt)), but the better composition was obtained with continuous feeding (26% of 3HV). It was studied the oleic acid utilization as nutritional supplement in the culture with continuous feeding of propionic acid and better results of productivity and polymer storage were obtained, but with lower 3HV. The thermal characteristics of the polymer was similar as the commercial polymer.

# ***CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO***



## **CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO**

A revolução industrial resultou na utilização de muitos materiais manufaturados pelo homem e “estranhos” ao meio ambiente. Estes materiais podem ser produtos, intermediários ou resíduos de indústrias ou outras atividades e apresentam, em alguns casos, dificuldade em fazer parte do ciclo normal de biodegradação da matéria. Esta é a simples razão pela qual microrganismos em seu habitat natural não encontram meios de degradar estes materiais. A lista de poluentes que não são degradados é longa, incluindo solventes, plasticidas, pesticidas, policlorados, fibras sintéticas, plásticos, óleos e outros. A produção de artigos compatíveis com o meio ambiente, como bioplásticos, é uma opção atrativa para minimizar este problema.

Bioplásticos podem ser usados para a manufatura de inúmeros artigos, especialmente embalagens, substituindo plásticos provenientes da indústria petroquímica. Uma classe de polímeros bacterianos que se destaca pela proximidade de suas características a de plásticos de origem petroquímica são os **Polihidroxicanoatos (PHA's)** (Doi, 1990).

Polihidroxicanoatos são uma classe geral de polímeros produzidos e acumulados como reserva de carbono e energia por inúmeras bactérias. São acumulados na forma de grânulos localizados no interior das células, os quais podem representar até 80% da massa seca total das células. São polímeros 100% biodegradáveis e biocompatíveis (Dawes e Senior, 1973).



Existem inúmeros tipos de PHA's produzidos por organismos naturais ou recombinantes. PHA's podem ter características de termoplásticos ou de elastômeros. Também podem ser produzidos na forma de blenda que, juntamente com outros materiais, proporcionam características mais apropriadas para inúmeras aplicações (Gomez e Bueno Netto, 1997). Os PHA's mais estudados são o Poli-3-hidroxi-butirato (P(3HB)) e o Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (P(3HB-co-3HV)). O segundo apresenta características mais atrativas em relação ao primeiro, em virtude da incorporação de unidades de 3-hidroxi-valerato em sua molécula. Estas unidades conferem mais elasticidade, entre outras características, tornando-o mais interessante comercialmente (Holmes, 1985).

Muitos são os microrganismos produtores de PHA's e a espécie *Ralstonia eutropha* é uma das que apresenta as condições mais favoráveis à produção industrial. Este microrganismo destaca-se pela possibilidade de acumular mais de 80% de sua massa celular em polímero, com alto peso molecular e utilizando diferentes tipos de substratos como glicose, frutose, ácido láctico entre outros (Ramsay, 1994a).

PHA's são produzidos por fontes renováveis como açúcares, gás carbônico e luz solar, no caso de plantas transgênicas. São degradados por uma grande variedade de microrganismos, e também podem ser reciclados ou hidrolisados. Em *Ralstonia eutropha*, são produzidos ou acumulados em duas fases distintas, crescimento e produção. A primeira fase ocorre sem limitação gerando biomassa em um meio de cultura balanceado e a segunda fase ocorre com limitação (alimentação ou exaustão) de um ou mais elementos nutritivos associado ao fornecimento excessivo de carbono, favorecendo o acúmulo de polímero (Doi, 1990). Alguns microrganismos são capazes de crescer e acumular PHA's ao mesmo tempo. Em geral, as culturas para produção do polímero são realizadas em processos descontínuos com alimentação de nutrientes devido à alta concentração celular desejada para o processo industrial. Estes bioplásticos têm sido produzidos em escala industrial por culturas de microrganismos desde a década de 70. São utilizados comercialmente como embalagem para cosméticos, como implantes médicos e como garrafas plásticas. O custo de produção de PHA's ainda é muito alto comparado aos plásticos convencionais, limitando suas aplicações em certos

mercados (Byrom, 1987). As formas para redução dos custos residem na utilização de novas cepas, no tipo de substrato utilizado e na forma de extração do polímero.

## 1.1 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver estratégias de produção de poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) a partir de substratos de baixo custo buscando melhorar a incorporação de unidades de 3-hidroxi valerato ao polímero através de diferentes estratégias de alimentação de ácido propiônico.

O objetivo inicial deste trabalho foi **estudar a possibilidade de utilização de diferentes substratos** para o crescimento de *Ralstonia eutropha*. Uma vez que esta bactéria produz e acumula PHA's em duas fases distintas e que a produtividade em produtividade é dependente da biomassa gerada, é interessante que se obtenha uma fase de crescimento com alta produtividade em células. Ou seja, uma diminuição no custo de produção seria possível, utilizando-se substratos de baixo custo a partir dos quais a bactéria crescesse com alta velocidade específica.

Este trabalho visou também **analisar a influência de alimentação ou carência** de um elemento essencial (fósforo) sobre o acúmulo deste polímero, já que se sabe que a forma de limitação e o elemento nutritivo limitante influenciam na quantidade de polímero acumulado (Oliveira, 1999).

O objetivo principal e final deste trabalho foi o de **estudar diferentes estratégias para melhorar a incorporação** de unidades de 3-hidroxi valerato ao polímero P(3HB-co-3HV). Sendo a produção de P(3HB-co-3HV) atrativa comercialmente, e a quantidade de 3HV incorporada determinante nas características deste polímero, é interessante obter-se um polímero com uma composição adequada à produção industrial. O fornecimento de ácido propiônico é decisivo para a incorporação de 3HV e portanto, deseja-se aplicar diferentes formas de alimentação (regulação de pH, pulsos e alimentação contínua), buscando melhores resultados de composição de P(3HB-co-3HV). Objetivou-se analisar a viabilidade de se desenvolver culturas para a produção de P(3HB-co-3HV) com estas estratégias em dois substratos diferentes: açúcar invertido e soro de leite. A vantagem da utilização destes dois substratos é a

possibilidade de diminuição do custo de produção uma vez que o primeiro existe em grande disponibilidade no Brasil, e o segundo trata-se de um resíduo da indústria de laticínios. Pretendeu-se ainda **estudar a influência de suplementos** adicionados ao meio de cultivo durante a produção de P(3HB-co-3HV) sobre a incorporação de 3-hidroxivalerato ao copolímero. Acredita-se que a utilização de ácido oleico, adicionado em pequenas quantidades, seja responsável pela indução à utilização de ácido propiônico para a produção de polímero.

Por fim, outro objetivo foi a **extração e recuperação de P(3HB-co-3HV)** a partir de uma cultura de *Ralstonia eutropha*, caracterizando as propriedades térmicas do polímero produzido e comparando-as com o mesmo polímero obtido comercialmente.

## ***CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA***



## **CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Neste capítulo é apresentado uma revisão abordando polihidroxicanoatos, uma alternativa ao impacto ambiental causado por plásticos. É descrito sobre diversos microrganismos produtores, a biossíntese e degradação de PHA's destacando parâmetros que influenciam na produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) como a utilização de substratos de baixo custo e suplementos. A detecção, extração, caracterização e biodegradação também são abordadas bem como diversas aplicações de PHA's são apresentadas.

### **2.1 O IMPACTO AMBIENTAL CAUSADO POR MATERIAIS PLÁSTICOS**

Plásticos são um dos materiais descobertos recentemente que causam grande poluição ambiental. Polipropileno, polietileno, policloreto de polivinila, poliestireno entre outros são largamente utilizados na manufatura de plásticos. Polímeros sintéticos são facilmente moldados em formas complexas, têm alta resistência química e são relativamente elásticos. Alguns até podem ser moldados em fibras ou em finos filmes transparentes. Estas características fazem destes plásticos próprios para aplicações em bens duráveis e em embalagens. A indústria plástica nos Estados Unidos movimenta sozinha 50 bilhões de dólares por ano e 20% dos rejeitos nos municípios deste país são plásticos (Rediff Home Page), acumulando 25 milhões de toneladas por ano. É estimado que são produzidos 100 milhões de toneladas de plásticos por ano em todo o mundo.

Países europeus utilizam 60 Kg/pessoa/ano de materiais plásticos enquanto que os Estados Unidos utilizam 80 Kg/pessoa/ano. Plásticos são muito usados porque são fáceis e baratos de manufaturar e duram longos períodos. Infelizmente, estas mesmas qualidades os transformam em um grande problema ambiental. Devido ao fato de ser barato e descartável, a grande demanda de produção gera poluição ambiental uma vez que este material permanece no meio ambiente resistindo a degradação. Mais de 90% dos artigos encontrados em praias são feitos de plásticos.

Incineração e reciclagem são métodos utilizados para a solução deste problema. No entanto, ambos custam mais do que a simples biodegradação (Moore e Saunders, 1997).

Consumidores de plásticos têm demonstrado preocupação a respeito do acúmulo de plásticos no meio ambiente e de seu impacto ambiental. Indústrias estão ativamente procurando por maneiras de reduzir o uso desnecessário de plásticos como forma de complementar programas de reciclagem ou de reutilização. Outras estão trabalhando em novos materiais ou na modificação de materiais antigos para reduzir o impacto ambiental de plásticos (Luzier, 1992).

### **2.1.1 A BIODEGRADABILIDADE COMO ALTERNATIVA AO PROBLEMA AMBIENTAL**

Bioplásticos são uma realidade que permite minimizar o problema de poluição causado por plásticos. Em virtude do impacto ambiental causado por plásticos petroquímicos e o crescente interesse em biopolímeros, inúmeros materiais biodegradáveis têm sido estudados: polihidroxialcanoatos (PHA's), polilactides, poliésteres alifáticos, polissacarídeos, copolímeros ou blendas dos acima citados (Lee, 1996a).

Alguns estudos no desenvolvimento de bioplásticos que podem ser citados são as indústrias Fertec (*Ferruzzi Ricercae Technology*) da Itália e Warner Lambert dos Estados Unidos, que estão desenvolvendo plásticos a base de amido completamente biodegradáveis. Estes plásticos podem ser utilizados para encapsulamento de remédios e embalagens alimentares. Outro plástico biodegradável - "Bioceta" – a base de celulose e desenvolvido pela *Rhone Poulenc's* na Bélgica e combinado com aditivos acelera a degradação por parte dos

microrganismos. Também, *Sekisui Chemistry* desenvolve um plástico a partir da copolimerização de dois compostos químicos biodegradáveis a base de derivados de poliésteres alifáticos (Rediff Home Page).

Polissacarídeos foram provavelmente os primeiros a serem utilizados dentre os polímeros produzidos microbianamente e ocorrem como reserva de energia e como materiais estruturais em paredes celulares e cápsulas extracelulares (Higgins et al., 1995). Destacam-se a goma xantana que é comercializada e o ácido hialúrico que é usado em cirurgias oftalmológicas. Outro polissacarídeo que se destaca é a pululana, muito aplicado na indústria cosmética, em alimentos dietéticos e como plástico biodegradável (Luong et al. 1988).

Poliésteres como PHA's, com propriedades similares às do polipropileno, são significativos porque são completamente biodegradáveis, com aplicações reconhecidas no aumento da velocidade de degradação de resíduos e em certas aplicações médicas (Gostomski e Bungay, 1996).

## 2.2 DESCRIÇÃO DOS POLIHIDROXIALCANOATOS

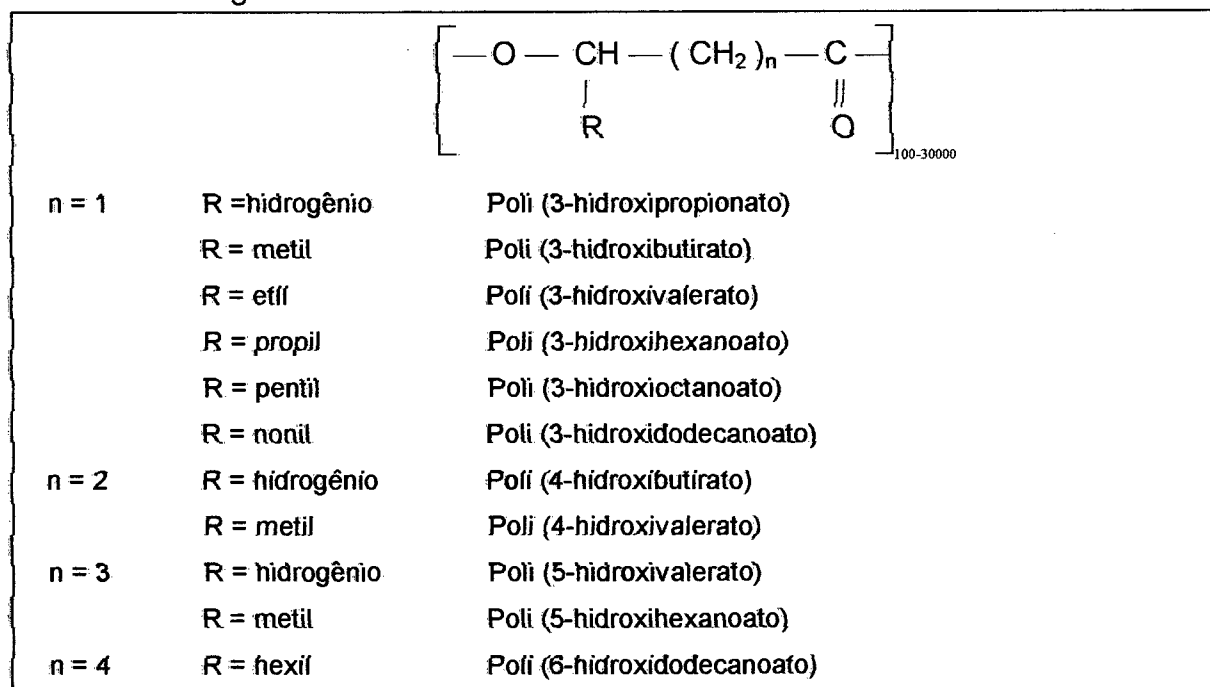
Dentre os materiais biodegradáveis em desenvolvimento, incluem-se os Polihidroxicanoatos - PHA's - que despertam atenção devido às suas propriedades materiais similares às de plásticos petroquímicos e à completa biodegradabilidade. PHA's são substâncias naturais de reserva de carbono e de energia que são acumulados no interior das células na forma de grânulos por uma grande variedade de microrganismos, em condições particulares de crescimento: a imposição da limitação de um nutriente e a presença de excesso de carbono (Dawes e Senior, 1973). Os polihidroxicanoatos constituem uma classe geral de polímeros microbianos (ésteres poliméricos) da qual os mais estudados são o poli-3-hidroxicbutirato (P(3HB)) e o poli-3-hidroxicbutirato-co-3-hidroxicvalerato (P(3HB-co-3HV)) (Doi, 1990). A fórmula geral da unidade monomérica destes polímeros é apresentada na Figura 2.1. A maioria destes são poliésteres alifáticos de carbono, oxigênio e hidrogênio. A composição da cadeia lateral ou do radical R e o valor de n determinam a identidade da unidade monomérica (Lee, 1996a).

Os PHA's podem ser classificados em dois grupos: o primeiro é formado por polímeros constituídos por unidades monoméricas de 5 carbonos ou menos e

são denominados de cadeia lateral curta (PHA<sub>SSC</sub>) e o segundo é formado de polímeros com unidades monoméricas contendo mais que 6 carbonos, denominado PHA de cadeia lateral média ou cadeia lateral longa (PHA<sub>MSC</sub>) (Ramsay, 1994a). Os primeiros possuem características próximas às dos termoplásticos enquanto que os da segunda classe aproximam-se às de termofixos (Tim e Steinbüchel, 1990).

### 2.2.1 HISTÓRICO DOS PHA'S

P(3HB) foi o primeiro composto da categoria dos PHA's a ser descrito. Na década de 20, Lemoigne, um microbiologista do Instituto Pasteur, em Paris, isolou de *Bacillus megaterium* um polímero que demonstrou tratar-se de um poliéster do ácido 3-hidroxiбутírico (Doi, 1990). Macrae e Wilkinson (citado por Braunegg et al., 1998), em 1958, observaram que *B. megaterium* estocava o homopolímero especialmente quando a razão glicose/nitrogênio no meio era elevada e a degradação deste ocorria rapidamente na ausência de fontes externas de carbono e energia. Eles concluíram desta forma que o P(3HB) era uma fonte reserva de carbono e energia.



Fonte: Lee, 1996<sup>a</sup>

Figura 2.1: Estrutura geral dos polihidroxi alcenoatos para diferentes monômeros

Em 1976, *Imperial Chemical Industries* (ICI) da Inglaterra iniciou suas pesquisas em P(3HB) e em 1980 lançou patentes para a produção de PHA's através



de vários processos (Powell et al., 1980; Hughes e Richardson, 1981; Richardson, 1984, citados por Braunegg et al., 1998).

A descoberta de outros monômeros diferentes do ácido 3-hidroxiбутírico foi feita por Wallen e Rohwedder (1974) ao isolarem estes poliésteres do lodo ativado. Os polihidroxicanoatos são compostos principalmente de 3-hidroxiácidos, mas unidades monoméricas compostas de 4-hidroxiбутirato e 5-hidroxi valerato já foram observadas (Doi et al., 1988). Em 1983, foi relatado por De Smet et al. (1983) que *Pseudomonas oleovorans* produz um polímero contendo ácido 3-hidroxi octanóico (3HO) como principal monômero quando n-octano é fornecido ao meio de cultura. Posteriormente, verificou-se que esta bactéria era capaz de incorporar monômeros com cadeias carbônicas de comprimento médio (de 6 a 12 carbonos na cadeia principal), quando suprida no meio de cultura com n-alcanos, n-álcoois ou ácidos carboxílicos com cadeias carbônicas do mesmo comprimento do principal monômero inserido (Huismann et al., 1989; Tim e Steinbuchel, 1990).

### **2.2.2 CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES**

PHA's são um dos mais promissores candidatos a resolver problemas gerados por poluição ambiental derivada de plásticos petroquímicos, pois se decompõem completamente em gás carbônico e água (Yoo et al., 1997).

Estudos com vários organismos têm mostrado que os grânulos típicos de P(3HB) têm um diâmetro de 0,2 a 0,7  $\mu\text{m}$  e são circundados por uma membrana composta por cerca de 2% de proteínas e 0,5% de lipídios cuja espessura é de 2 nm (Boatman, 1964; Lundgren et al., 1964; Wang e Lundgren, 1969; Nuti et al., 1972; Dunlop e Robards, 1973). O P(3HB) é um homopolímero alifático, poliéster, com repetidas unidades de ácido 3-hidroxiбутírico. Da mesma maneira, o P(3HB-co-3HV) é o copolímero com unidades de ácido 3-hidroxiбутírico e 3-hidroxi valerico. A Figura 2.2 apresenta a fórmula da unidade monomérica deste copolímero.

As características mais importantes dos PHAs são a sua rápida biodegradabilidade e suas propriedades termoplásticas (Doi, 1990). Estes polímeros podem ser extraídos das células sob a forma de um pó inodoro, podendo sofrer as mesmas transformações que o polipropileno e apresentando propriedades próximas daquelas do polímero de origem petroquímica. As propriedades termoplásticas do

P(3HB) são interessantes, contudo, o copolímero composto de poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato (poli(3HB-co-3HV)) apresenta propriedades mais interessantes do ponto de vista comercial (Byrom, 1987). Tais propriedades são função da composição em 3HV nas moléculas (Holmes, 1985; Doi, 1990).

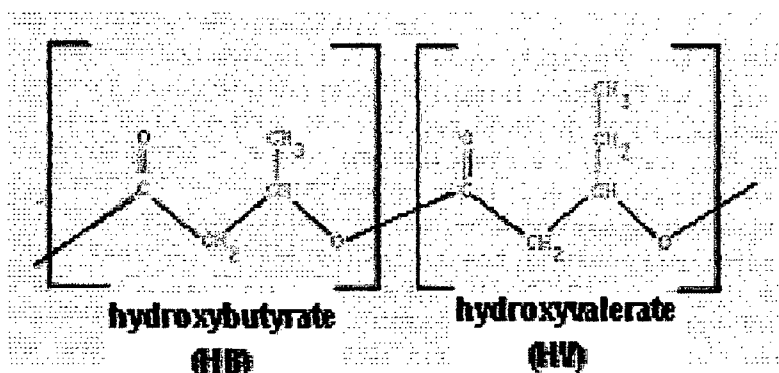


Figura 2.2: Estrutura monomérica do poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato)

As propriedades desejáveis às diferentes aplicações de um material plástico são: elevado ponto de fusão, baixa rigidez, alta resistência à pressão, resistência ao alongamento antes da ruptura e forte resistência ao impacto. O ponto de fusão do P(3HB) é próximo da temperatura que inicia sua degradação em ácido crotônico (aproximadamente 185°C), tornando difícil os processos de moldagem por injeção ou por sopro (Poirier et al., 1995). O P(3HB) tem uma resistência aos raios UV superior àquela que possui o polipropileno. Os filmes para embalagem fabricados com P(3HB) apresentam uma excelente impermeabilidade ao oxigênio (Holmes, 1985). A Tabela 2.1 apresenta características deste polímero que influem na manufatura deste e de outros como polihidroxi-octanoato (PHO) e polipropileno (PP).

O P(3HB) é um material um tanto rígido e quebradiço, o que pode limitar sua aplicação, porém a incorporação de unidades de 3HV ao P(3HB) diminui os níveis de cristalinidade e o ponto de fusão do polímero. Isto acarreta uma diminuição da rigidez assim como um aumento da resistência ao impacto. Uma porcentagem de 3HV entre 17% a 20% permite a obtenção de um copolímero com propriedades mais desejáveis, em particular a melhoria de sua flexibilidade e resistência ao impacto. (Holmes, 1985). Algumas propriedades se aproximam do polipropileno e polietileno, mas o P(3HB-co-3HV) também é comparado com aditivos naturais como colorantes, etc. (Luzier, 1992). A Tabela 2.2 apresenta dados referentes a esta incorporação de unidades de 3-hidroxi-valerato.

Tabela 2.1: Principais características dos polímeros polihidroxiobutirato (P(3HB)), polihidroxiocetanoato (PHO) e polipropileno (PP)

Característica	P(3HB)	PHO	PP
Ponto de fusão	180°C	61°C	176°C
T <sub>g</sub>	5°C	-35°C	-10°C
Densidade	1.18-1.25g/cm <sup>3</sup>	1.02g/cm <sup>3</sup>	0.905g/cm <sup>3</sup>
Cristalinidade	70%	25%	70%
Permeabilidade ao oxigênio	45(cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> /át/dia)	----	1700(cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> /át/dia)
Transmissão de Vapor	60-70(g/cm <sup>2</sup> /dia)	----	
Módulo de Young	3500MPa	8MPa	1700MPa
Tensão de Cisalhamento	40MPa	9MPa	38MPa
Resistência a ruptura	5%	380%	400%
Peso Molecular	1-8.10 <sup>5</sup>	----	2.2 – 7.10 <sup>5</sup>

Fonte: Rediff Home Page e Gomez e Bueno Netto . 1997

Tabela 2.2: Comparação das propriedades de P(3HB-co-3HV) com outros polímeros

P(3HB-co3HV)	Ponto de Fusão (°C)	Rigidez (GPA)	Resistência à Pressão (Mpa)	Resistência ao Impacto (J/m)
3% mol de HV	170	2,9	38	60
9% mol de HV	162	1,9	37	95
14% mol de HV	150	1,5	35	120
20% mol de HV	145	1,2	32	200
25% mol de HV	137	0,7	30	400
<b>P(3HB)</b>	179	3,5	40	50
<b>P(4HB)</b>	53	149	104	----
<b>Polipropileno</b>	170	1,7	34,5	45
<b>Poliestireno</b>	110	3,1	50	21

Fonte: Lee, 1996b

A capacidade de alongamento até a ruptura aumenta com a incorporação de 3HV ao copolímero. Os copolímeros de poli-3-hidroxi-hexanoato-co-3-hidroxiocetanoato (P3(HHx-co-3HO)) são elastômeros semicristalinos com baixo ponto de fusão, baixa resistência à pressão e uma elevada capacidade de alongamento até o ponto de ruptura (Lee, 1996a). Copolímeros de 3HB e 4HB também apresentam baixa cristalinidade, resultando em propriedades mecânicas próximas daquelas dos elastômeros quando o conteúdo de 4HB excede 40 mol% (Braunegg et al., 1998). De maneira similar, a cristalinidade do copolímero poli-3-hidroxiobutirato-co-3-hidroxiopropionato (P(3HB-co-3HP)) decresce com o aumento da fração das unidades de 3HP (Nakamura et al., 1991). O P(3HB) e seus copolímeros têm suas

conformações delineadas principalmente pelas forças de van der Waals existentes entre o oxigênio do grupo carbonil e o grupo metil (Braunegg et al., 1998).

P(3HB) e P(3HB-co-3HV) apresentam ainda as propriedades de serem opticamente ativos (cada monômero possui um carbono quiral em configuração D(-), serem piezoelétricos (as moléculas do polímero são organizadas em hélices sem centros simétricos), atóxicos, insolúveis em água, apresentam alto grau de polimerização e são biocompatível (o que permite seu uso na área médica e farmacêutica) (Steinbüchel e Fächtenbusch, 1998).

## 2.3 MICRORGANISMOS PRODUTORES

Os microrganismos capazes de acumular PHA's são geralmente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Byrom, 1987), que podem ser encontradas na natureza, isto é, no solo, água do mar, efluentes, etc. A seleção do microrganismo e do substrato têm grande influência no custo de fabricação do PHA (Anderson e Dawes, 1990). É desejável que as cepas tenham velocidade específica de crescimento e de produção de PHA elevados, que possam utilizar substratos de baixo custo, que apresentem uma porcentagem elevada de PHA em relação à massa total seca e, finalmente, é importante que haja um fator de conversão de substrato em PHA bastante elevado (Ramsay, 1994a). O elevado custo de produção de PHA se deve, em grande parte, ao processo de extração do polímero. Para que este seja rentável, é necessário que a cepa produtora seja capaz de acumular pelo menos 60% de sua massa celular em polímero. Este critério elimina da seleção todas as bactérias Gram-positivas e aquelas que não são capazes de acumular porcentagens elevadas de polímero (Ramsay et al., 1990a). A Tabela 2.3 apresenta a porcentagem de PHA que alguns microrganismos podem acumular.

Alguns microrganismos selecionados para produção de PHA's são: *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Escherichia coli*. Estas bactérias são divididas em dois grupos dos quais, sendo que o primeiro grupo requer a limitação de um dos nutrientes para a produção de PHA's e o segundo grupo acumula PHA's já durante a fase de crescimento. Destas citadas, pertencem ao segundo grupo somente *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* e *Escherichia coli* (Lee, 1996a).

Tabela 2.3: Capacidade de acúmulo de PHA's por alguns microrganismos

<b>Microrganismo</b>	<b>% de acúmulo</b>
<i>Ralstonia eutropha</i>	96
<i>Azospirillum</i>	75
<i>Azotobacter</i>	73
<i>Baggiatoa</i>	57
<i>Leptothrix</i>	67
<i>Methylocystis</i>	70
<i>Pseudomonas</i>	67
<i>Rhizobium</i>	57
<i>Rhodobacter</i>	80

Fonte: Rediff Home Page

Outro comportamento observado por Gomez e Bueno Netto (1997) é com relação ao comprimento da cadeia carbônica do monômero inserido. Assim, *R. eutropha* e *Rhodococcus sp.* são capazes de inserir em seus polímeros monômeros de cadeia curta (3-5 e mais raramente 6 carbonos). Por outro lado, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas oleovorans* são capazes de inserir monômeros com cadeia carbônica de comprimento médio (6 a 12 e mais raramente 5 carbonos). Também é interessante observar que bactérias como *Rhodococcus sp.* e *P. aeruginosa* são capazes de sintetizar monômeros diferentes de 3HB e inseri-los em seus polímeros, a partir de substratos que não estão relacionados estruturalmente ao monômero inserido. Por outro lado, *R. eutropha* e *P. oleovorans* só são capazes de incorporar monômeros diferentes de 3HB, se supridas com um substrato relacionado estruturalmente ao monômero que se deseja inserir, isto é, um precursor. No caso da *P. oleovorans*, por exemplo, foi observado que este microrganismo acumula ácido 3-hidroxiocetanóico como principal monômero quando n-octano é fornecido no meio de cultura (De Smet et al., 1983).

As bactérias que apresentam as características mais favoráveis para uma produção industrial são *Azotobacter sp.*, *Methylobacterium sp.* e *Ralstonia eutropha* (Byrom, 1987), essencialmente em razão da variedade de substratos que eles podem utilizar. Além disso, as bactérias como *Alcaligenes latus* e bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentam também propriedades favoráveis para a produção de biopolímeros. Não se pode esquecer, igualmente, da possibilidade da utilização de genes recombinantes em *Escherichia coli* ou em plantas transgênicas para a produção de PHA (Byrom, 1992).

### **2.3.1 BACTÉRIAS DO GÊNERO AZOTOBACTER**

*Azotobacter* sp. foi a primeira bactéria escolhida para a síntese industrial de P(3HB) por ser capaz de utilizar sacarose e glicose como substrato. Entretanto, ela foi rejeitada por produzir, paralelamente ao P(3HB), um polissacarídeo, tornando o processo de difícil controle (Byrom, 1987). Para tentar melhores condições de produção, Page e Knosp (1989) estudaram uma cepa mutante de *Azotobacter vinelandii* capaz de acumular quantidades de P(3HB) superiores a 75% de sua massa seca, com um fator de conversão glicose em polímero de 0,33 g.g<sup>-1</sup>. Depois de estabelecer que o valerato era o melhor precursor de 3HV, Page (1992) usou sais em combinação com melação de beterraba para produzir P(3HB-co-3HV) a partir desta cepa mutante de *Azotobacter vinelandii*. Os autores concluíram que a capacidade desta cepa de utilizar melação de beterraba como fonte de carbono reduziria à metade o custo de produção de PHAs formados a partir da glicose. Contudo, é preciso observar que a produtividade obtida ainda é inferior se comparado com o que se consegue usando *Ralstonia eutropha* (Ryu et al., 1997).

### **2.3.2 MICRORGANISMOS METILOTRÓFICOS**

Um outro grupo de estudo são os microrganismos metilotróficos, que tem o metanol como fonte de carbono. Bourque et al. (1992) usaram *Methylobacterium extorquens* para produzir P(3HB) a partir de metanol e P(3HB-co-3HV) a partir de metanol e valerato. Os autores consideraram o metanol um substrato interessante já que este é relativamente barato, de fácil manuseio, completamente solúvel em água e de baixa viscosidade. Entretanto, de acordo com Byrom (1992), o processo de produção é lento, gera uma baixa quantidade de polímero, que tem baixo peso molecular e a extração é difícil.

Lee (1996b) relatou que a produção de P(3HB) por inúmeras cepas de *Methylobacterium organophilum* foi patenteada pela ICI. Entretanto, relativamente pouca quantidade de acúmulo de polímero por metilotrofos torna o processo de recuperação difícil já que mais biomassa tem que ser processada por tonelada de P(3HB).

### 2.3.3 BACTÉRIAS DO GÊNERO *ALCALIGENES*

*Alcaligenes latus* é capaz de utilizar diferentes substratos com uma velocidade específica de crescimento elevada e com uma produção de biopolímero associada ao seu crescimento. Trabalhando em condições não limitantes, Yamane et al. (1996) obtiveram menos de 50% de PHA na biomassa seca com um fator de conversão de substrato em polímero de 0,17 gP(3HB)/gsacarose. Ao contrário, trabalhando sob limitação de nitrogênio, Wang e Lee (1997a) conseguiram um conteúdo de P(3HB) em biomassa seca de 88%. Portanto, apesar de *A. latus* ser classificado como um produtor de PHA associado ao seu crescimento, esta cepa pode acumular muito mais PHA sob condições de limitação (Choi e Lee, 1999a). *Alcaligenes latus* tem como desvantagem a sua sensibilidade aos precursores utilizados para a produção de poli(3HB-co-3HV) (Ramsay et al., 1990a), em particular, o crescimento desta cepa é completamente inibida em presença de 0,5 g.L<sup>-1</sup> de ácido propiônico (Braunegg et al., 1995).

### 2.3.4 BACTÉRIAS DO GÊNERO *PSEUDOMONAS*

As bactérias do gênero *Pseudomonas* podem produzir tanto polihidroxialcanoatos de cadeia lateral média (PHA<sub>MSC</sub>) quanto de cadeia lateral longa (LSC) (De Smet et al., 1983; Preusting et al., 1991; Fuller et al., 1988). Esta produção é obtida a partir de substratos de cadeia de carbono alifática longa como os alcanos e os ácidos alcanóicos. Bear et al. (1997), citado por Braunegg et al. (1998), foram capazes de produzir um copoliéster contendo acima de 37% de grupos epóxi nas cadeias laterais quando *P. oleovorans* era alimentado com uma mistura de 10-epoxiundecanóico e octanoato de sódio. Devido ao fato de ser imiscível em meio aquoso, inúmeras dificuldades surgem na preparação das culturas destes microrganismos para a produção de LSC e MSC (Ramsay et al., 1991).

O estudo de copoliésteres de P(3HB) e PHA's de cadeia média através de *Pseudomonas A33* é citado por Steinbüchel et al., (1995a), mostrando o acúmulo preferencial de um polímero composto de 3HB e 3HA<sub>MCL</sub> do que uma mistura de P(3HB) e P(3HA<sub>MCL</sub>). A biossíntese de copoliésteres a partir de substratos mistos de glicose e lactones por *Pseudomonas pseudoflava* é relatada por Choi et al. (1995).

Uma observação interessante foi citada por Lee (1995) sobre cepas de *Pseudomonas* que acumulam polímeros constituídos de P(3HB) e de ácidos 3-hidroxicanoicos de cadeia média. É sugerido que PHA<sub>SCL</sub> e PHA<sub>MCL</sub> são exclusivos sendo cada um provavelmente devido a especificidade ao substrato a síntese de PHA's. Assim, um organismo que sintetiza PHA's contendo ambos polímeros de cadeia curta e média é notável. Seria então, mais interessante observar este polímero como uma mistura do que como um poliéster, porém mais tarde isto foi atribuído ao fato destas cepas possuírem 2 PHA's sintetases diferentes.

### **2.3.5 ESCHERICHIA COLI**

Existem inúmeros relatos do emprego de *Escherichia coli* recombinante para a produção de vários bioprodutos, principalmente proteínas. Os genes da biossíntese de PHA de *Ralstonia eutropha* foram clonados em *E. coli* por 3 grupos independentes em 1988-89. Estes genes foram seqüenciados e caracterizados em detalhe e foram encontrados na forma de um operon expresso em *E. coli* (Schubert et al., 1988; Slater et al., 1988; Peoples e Sinskey, 1989a e b; Dennis et al., 1992).

A cepa de *E. coli* recombinante é capaz de acumular grandes quantidades de polímero, representando mais de 80% do peso celular seco (Fidler e Dennis, 1992; Lee, 1997). Além disso, *E. coli* pode utilizar várias fontes de carbono incluindo sacarose, lactose e xilose, o que permite a produção de P(3HB) a partir de matéria prima barata tais como melão, soro de leite e hemicelulose hidrolisada (Lee, 1997, Lee e Chang, 1993; Lee et al., 1996c; Zhang et al., 1994). Outra vantagem é que *E. coli* não possui despolimerases intracelulares que degradam o P(3HB) acumulado (Choi e Lee, 1999b). Em compensação, uma desvantagem da produção de P(3HB) por *E. coli*, é a formação de filamentos. Células de *E. coli* sofrem considerável filamentação durante a síntese de P(3HB) e a extensão desta filamentação é muito maior em um meio definido quando comparado com um meio complexo ou semi-definido (Lee, 1994; Lee et al., 1994). Em um meio definido, a filamentação das células causa redução na velocidade de crescimento celular e menor atividade metabólica causando, conseqüentemente, menor acúmulo de P(3HB). Wang e Lee (1998), usando uma cepa de *E. coli*, geneticamente modificada para suprimir a formação de filamentos, conseguiram uma concentração de P(3HB) de 104 g.L<sup>-1</sup> e



uma produtividade de  $2 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  comparável com a obtida com *R. eutropha* (Kim et al., 1994). Esta concentração de  $104 \text{ g.L}^{-1}$ , foi a maior até agora conseguida usando *E. coli* recombinante em um meio definido.

### **2.3.6 PLANTAS TRANSGÊNICAS**

A produção de PHA por de plantas transgênicas ainda está em seu início (Braunegg et al. 1998). As investigações relatam o uso da planta *Arabidopsis thaliana* hospedando genes de biossíntese de PHA da *R. eutropha*. Poirier et al. (1992), relataram com sucesso a expressão dos genes relacionados com a acetoacetil-CoA redutase e PHA sintase no citoplasma da *A. thaliana*. O gene da 3-cetotiolase é endógeno no citoplasma da planta. Este experimento resultou na síntese de P(3HB) no citoplasma, núcleo e vacúolos de todo o tecido da planta, mas em pequenas quantidades e à custa de um crescimento retardado da planta. Em compensação, quando os três genes relacionados com a síntese de P(3HB) em *R. eutropha* foram expressos nos cloroplastos da *A. thaliana*, a planta transgênica exibiu um crescimento normal e teve um conteúdo de P(3HB) de aproximadamente 14% de seu peso seco (Steinbüchel e Fuchtenbusch, 1998). A companhia Imperial Chemical Industries (ICI) (Inglaterra), investiu no desenvolvimento da produção de P(3HB) pela colza enquanto que a Monsanto (EUA) estudou a produção na colza e na soja (Poirier et al., 1995; Padgett et al., 1996).

### **2.3.7 LODO ATIVADO**

PHA's extraídos a partir de lodo e sedimentos marinhos mostraram a presença de unidades polihidroxicarboxílicas diferentes de 3HB e 3HV, que sugerem a presença de populações microbianas nestes ambientes que são capazes de produzir outros tipos de PHA (Fuller et al. 1988).

Outros PHA's com unidades monoméricas de 3HV são também acumulados por populações bacterianas presentes em lodos. O desenvolvimento da técnica de identificação por cromatografia foi realizado por Comeau et al., 1988 com amostras de uma planta piloto de tratamento de esgoto doméstico da *University of*

*British Columbia*. Esta técnica foi também aplicada com sucesso em amostras de uma planta industrial em Kelowna, British Columbia, Canada (Comeau et al. 1988).

Shirai et al. (1997) reportaram a combinação entre o tratamento anaeróbico de efluente de óleo de palma e a produção de PHA's na tentativa de reduzir custos de produção. Estudos sobre PHA's acumulados no processo biológico de remoção de fósforo de lodo ativado foi relatado por Lemos et al. (1998). Estes autores observaram as características do polímero P(3HB-co-3HV) acumulado a partir de acetato, butirato e propionato durante a fase anaeróbica do tratamento biológico.

### **2.3.8 RALSTONIA EUTROPHA**

*Ralstonia eutropha* sintetiza PHA's contendo monômeros de 3HV, 3HB, 4HB, 5HV quando ácido valérico ou propiônico são fornecidos (Rhee et al. 1992). É o microrganismo mais atraente para a produção industrial. Este microrganismo pode acumular mais de 80% de sua massa celular em P(3HB) com um alto peso molecular e utilizando diferentes tipos de substratos (Byrom, 1987) como a glicose (espécie mutante) ou a frutose, o soro de leite fermentado e os açúcares invertidos de cana-de-açúcar (Ramsay, 1994a).

Além da produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) (Holmes et al, 1985), *Ralstonia eutropha* é utilizada para a produção de P(3HB-co-4HB) (Doi et al., 1988, Saito et al., 1996), P(3HB-co-3HV-co-5HV) (Doi et al., 1987, citado por Braunegg et al., 1998) e P(3HB-co-4HB-co-3HV) (Kunioka et al., 1988, citado por Braunegg et al., 1998). Estudos de Park e Damodoran (1994) relataram a produção de P(3HB-co-3HV) por *R eutropha* modificada geneticamente para a assimilação de álcoois como o propanol.

## **2.4 DESCRIÇÃO GERAL DA RALSTONIA EUTROPHA**

*Ralstonia eutropha* (anteriormente *Hydrogenomonas eutropha* e depois *Alcaligenes eutrophus*) é um microrganismo procariótico, do tipo Gram-negativo, encontrado naturalmente no solo e água. Esta espécie possui células na forma de bastonete com dimensões de 0,5 por 1,8 a 2,6  $\mu\text{m}$ . É móvel, possuindo de 1 a 4

flagelos peritríquios. As células podem se tornar esféricas na fase estacionária de crescimento. A Figura 2.3 ilustra a forma desta bactéria na fase de crescimento e a Figura 2.4 na fase de produção.

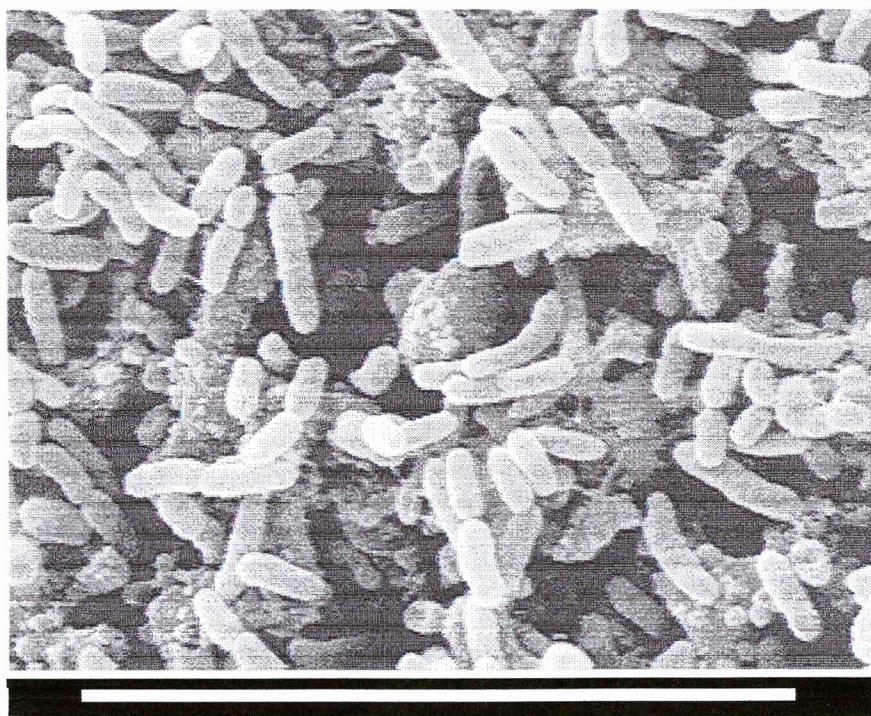


Figura 2.3: Forma de *Ralstonia eutropha* na fase de crescimento apresentada por Ampe, 1995 (Barra branca = 10  $\mu\text{m}$ )

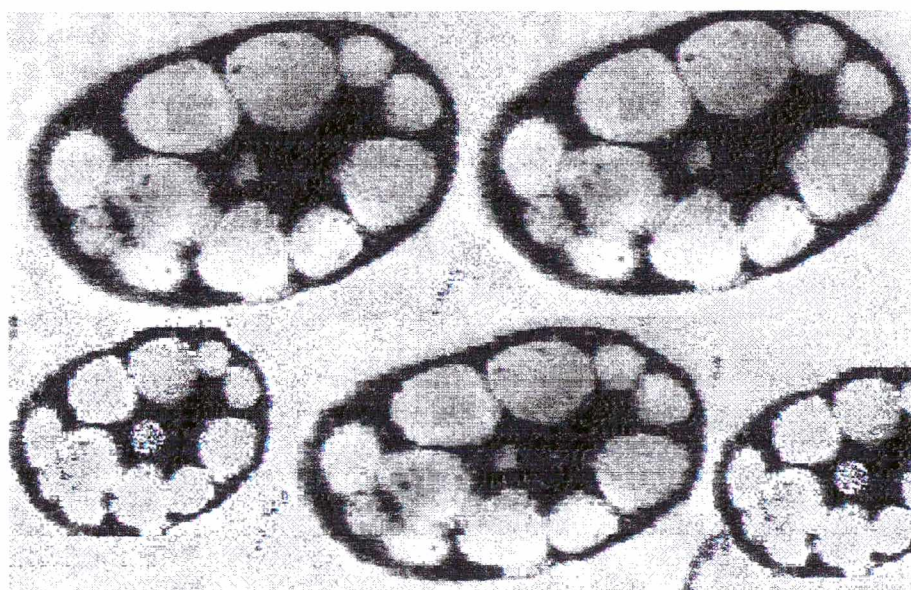
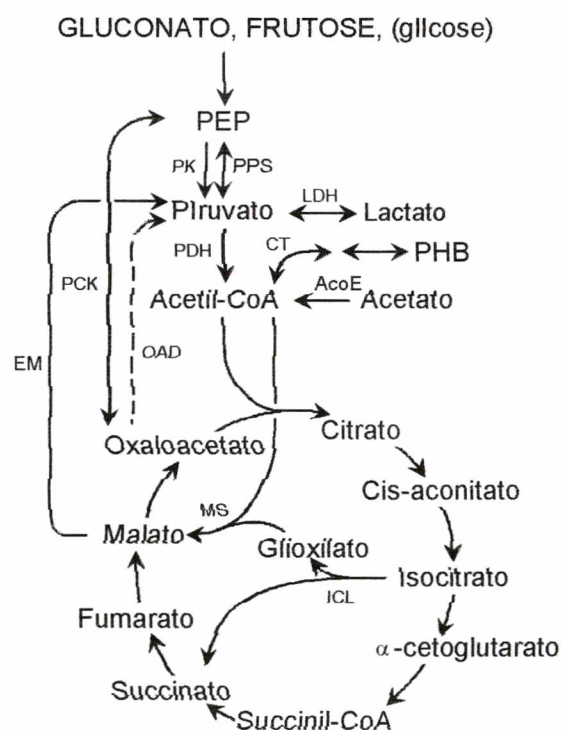


Figura 2.4: Forma de *Ralstonia eutropha* na fase de produção apresentada por Gomez et al., 1997 (Foto aumentada 32.000 vezes)

Esta bactéria pode utilizar vários compostos orgânicos como única fonte de carbono, entre os quais estão incluídos a glicose (espécie mutante), frutose, formato, acetato, propionato, lactato, gluconato, succinato, fenol, benzoato entre outros. Não pode utilizar para este fim, o etanol, glicerol e dissacarídeos. A sua temperatura ótima de crescimento é de 30 °C. Pode crescer autotroficamente em atmosfera de gases contendo H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (Tanaka et al., 1994). A frutose, e no caso de mutantes, também a glicose, é metabolizada exclusivamente através da via de Entner-Doudoroff, já que *R. eutropha* não contém a enzima fosfo-frutoquinase, necessária para a degradação via glicólise. Os produtos desta via são piruvato e gliceraldeído-3-fosfato. O piruvato assim produzido pode ser utilizado para a biossíntese e para a oxidação via ciclo do ácido tricarboxílico, para fornecimento de energia (Reutz et al., 1982).

O ciclo de Krebs faz parte do metabolismo central de *R. eutropha* e é exposto na Figura 2.5.



**Figura 2.5: Metabolismo central da *R. eutropha* : ciclo de Krebs e enzimas em torno do piruvato e do acetato. AcoE: acetil-CoA sintetase; CT: β-cetotiolase; EM: enzima málica; ICL: isocitrato liase; MS: malato sintetase; OAD: oxaloacetato descarboxilase; PCK: PEP carboxiquinase; PK: piruvato quinase; PPS: PEP sintase (apresentado por Schobert e Bowien, 1984).**

O principal desvio do piruvato para o ciclo de Krebs é a produção de P(3HB) via acetil-CoA. O pH na cultura de *R. eutropha* geralmente decresce devido à produção de subprodutos no ciclo de Krebs. Repaske, 1962 (citado por Beaulieu et al., 1995) já relatava que um pH ótimo para o crescimento e produção de P(3HB) em *R. eutropha* era de 6,9 e que um pH de 5,4 inibia o seu crescimento. O uso de tampão fosfato para manter o pH em 7,0 para a cultura de *R. eutropha* foi pesquisado por Kim, 1988 (citado por Seo et al., 1998) mas a concentração de subprodutos produzidos pelo ciclo de Krebs excederam a capacidade da solução tampão de fosfato de potássio 5 g.L<sup>-1</sup> manter o pH em 7,0. O uso de concentrações maiores desse tampão inibiam o crescimento celular. Geralmente usam-se soluções de HCl e NaOH para controlar o pH, porém estas soluções são conhecidas como desnaturantes de proteínas (Morrison e Boyd, 1983).

A *R. eutropha* é capaz de crescer em condições de quimiolitotrofia ou de heterotrofia (Reutz et al., 1982). A quimiolitotrofia é a capacidade dos microrganismos utilizarem os compostos inorgânicos como doadores de elétrons e o dióxido de carbono como fonte de carbono. A heterotrofia é a capacidade de utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono e energia (Doelle, 1975).

## 2.5 BIOSÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE PHA'S

*Ralstonia eutropha* é capaz de produzir PHA tanto na forma de homopolímero de 3HB quanto na forma do copolímero P(3HB-co-3HV) (Holmes, 1985).

### 2.5.1 BIOSÍNTESE DE P(3HB)

P(3HB) é sintetizado pela *R. eutropha* a partir de acetil-CoA que segue ora pelo ciclo de Krebs em crescimento não limitado, ora pela via de síntese de P(3HB) em crescimento limitado, mas em excesso de fonte de carbono. A produção de P(3HB) é favorecida pela limitação de um elemento nutritivo como o oxigênio, nitrogênio, fosfato, sulfato, magnésio ou potássio (Schlegel et al., 1961; Dawes e Senior, 1973; Oeding e Schlegel, 1973; Byrom, 1987; Daniel et al. 1992; Asenjo et al., 1995).



substratos com C<sub>4</sub> a C<sub>5</sub>, enquanto que a outra, denominada tipo B, é ativa para substratos de cadeia de C<sub>4</sub> a C<sub>10</sub>. Estudos *in vitro*, com as enzimas purificadas mostraram que as duas podem ser ativas na síntese de P(3HB). Haywood e colaboradores consideraram a hipótese de que a 3-β-cetotiolase do tipo B deve possuir uma outra função além daquela relacionada com a síntese de PHA, sendo, provavelmente, uma enzima degradativa relacionada com o metabolismo dos ácido graxos.

### 2.5.1.2 Acetoacetil CoA redutase

Esta enzima reduz o substrato a hidroxibutiril-CoA através da reação:



Dois tipos de acetoacetil-CoA redutase foram isoladas e estudadas por Haywood et al.(1988b) em *R. eutropha*, cada um com um substrato distinto e coenzima específica. Uma das enzimas era a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) dependente e a outra tinha como coenzima a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). A enzima NADPH-dependente é estereoespecífica, sendo ativa somente para substratos D(-)3-hidroxiacil-CoA. A melhor atividade desta enzima foi observada com substratos com cadeia C<sub>4</sub>. No caso da enzima NADH-dependente, esta é ativa para substratos D(-) e L(+) com cadeias de 4 a 10 carbonos. A enzima NADH-dependente parece estar envolvida diretamente na β-oxidação dos ácidos graxos e indiretamente na síntese de P(3HB).

Os produtos da redução de acetoacetil-CoA são D(-)3-hidroxibutiril-CoA e L(+)-3-hidroxibutiril-CoA para as enzimas NADPH-dependente e NADH-dependente, respectivamente. Na síntese de P(3HB), apenas a enzima NADPH-dependente está envolvida, produzindo o substrato D(-)3-hidroxibutiril-CoA, para a enzima PHB-sintase.

### 2.5.1.3 PHA-sintase

Em *R. eutropha*, esta enzima é capaz de polimerizar 3-hidroxi-, 4-hidroxi- e 5 hidroxialcanoatos a partir de D isômeros de 4 e 6 carbonos de hidroxiacil-CoA (Haywood et al., 1989; Valentin et al., 1992), embora sua atividade seja bastante elevada com substratos de C<sub>4</sub> (Haywood et al., 1989). Se Nakamura et al. (1991) estiverem corretos em suas considerações, sobre a via para síntese de 3-hidroxipropionato, a PHA-sintase deve também efetuar a polimerização em compostos com cadeia de 3 carbonos. Esta enzima é isolada sob duas formas, uma forma solúvel, predominante durante o crescimento não limitado, e outra em grânulo, associado quando as condições da cultura favorecem o acúmulo de P(3HB) (Haywood et al., 1989). Doi et al. (1992) estimaram que o número de moléculas de PHA-sintase em *R. eutropha* esteja por volta de 18000. A quantidade de PHA-sintase, em um organismo hospedeiro, representa uma função importante no controle do peso molecular do polímero (Sim et al., 1997). É possível que a PHA-sintase seja inibida por concentrações elevadas de CoASH, ainda que estas concentrações sejam superiores àquelas participantes da regulação da β-cetotiolase (Braunegg et al., 1998).

### 2.5.1.4 Recuperação das coenzimas

A síntese de P(3HB) não requer participação direta de ATP. Entretanto, o poder redutor na forma de NADPH é essencial. Na síntese de P(3HB), a partir de acetil-CoA, apenas a redutase ligada a NADPH é ativa. Portanto, o NADPH utilizado na reação abaixo deve ser recuperado para possibilitar a síntese de P(3HB):



Yamane (1993) considerou três possibilidades para a recuperação desta coenzima:

a) por meio da reação que envolve a glicose-6-fosfato desidrogenase, que é uma enzima ligada à via de Entner-Doudoroff;

ue



b) através da reação que envolve a 6-fosfogluconato desidrogenase, que é uma enzima ligada à via das pentoses-fosfato;

c) e pela reação envolvendo a isocitrato desidrogenase, enzima ligada ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA).

A via utilizada para a regeneração das coenzimas reduzidas é relativa ao substrato utilizado para a produção do polímero. Se for utilizado ácido acético como substrato, há uma grande possibilidade da coenzima NADPH ser regenerada pela isocitrato desidrogenase. Pode ainda ocorrer uma outra possibilidade, com o mesmo substrato, que é a transidrogenação. Neste caso, a enzima isocitrato desidrogenase não é utilizada, sendo necessária uma suplementação de ATP, obtida através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). É necessário que parte do ácido acético seja utilizado na via TCA, para obtenção do ATP.

Utilizando-se um substrato com quatro carbonos na cadeia, como por exemplo o ácido butírico, NADPH deve ser recuperada pela isocitrato desidrogenase, no ciclo TCA. A partir da glicose como substrato, a NADPH deve ser regenerada pela glicose-6-fosfato desidrogenase.

Uma outra coenzima envolvida na síntese do polímero é a coenzima A. esta coenzima é auto-reciclável durante a produção de P(3HB).

### **2.5.2 BIOSÍNTESE DE P(3HB-co-3HV)**

A produção de P(3HB-co-3HV) por *R. eutropha* é muito discutida e estudada a partir de inúmeras fontes de carbono (Shioya et al, 1988; Steinbüchel e Pieper, 1992).

Esta bactéria acumula P(3HB-co-3HV) unicamente na presença de substratos como propionato e valerato, precursores deste polímero. Estas fontes de carbono são degradadas a propionil-CoA ou 3-hidroxicinovel-CoA. Estes substratos devem ser utilizados na presença de outros como frutose e glicose (Steinbüchel e Pieper, 1992). A via de produção do copolímero a partir de glicose e propionato é ilustrada na Figura 2.7. As reações são catalizadas pelas mesmas enzimas que na produção de P(3HB).

O copolímero apresenta uma distribuição aleatória de unidades de 3HB e 3HV. A via de síntese deste copolímero é estudada por Doi et al., (1987) que tem mostrado que a partir de propionato, as unidades de 3HB e 3HV são produzidas e uma parte de propionato é convertida em acetil-CoA e P(3HB). O restante é convertido a propionil-CoA chegando a 3HV. Os estudos demonstraram que a fração molar de 3HV no copolímero restringe-se a 50% em razão do rápido metabolismo de propionil-CoA em acetil-CoA na célula. Copoliésteres contendo 90% molar de 3HV são produzidos por a partir de ácido pentanóico como fonte de carbono (Doi et al., 1988).

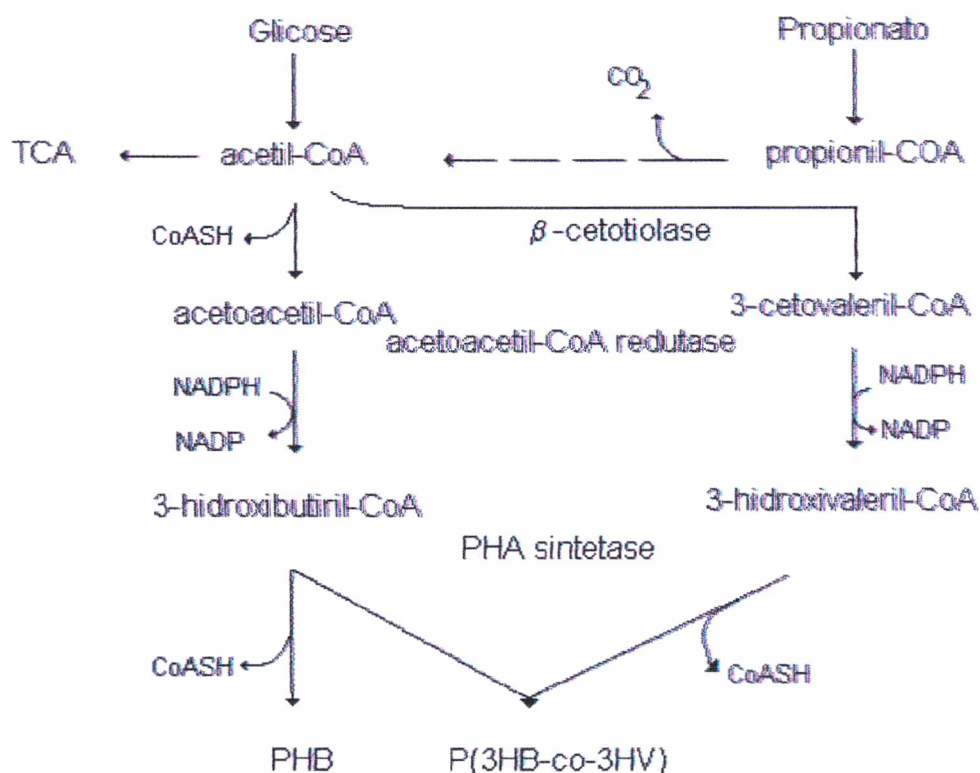


Figura 2.7: Via de produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) a partir de glicose e propionato apresentada por Doi (1990)

### 2.5.3 DEGRADAÇÃO INTRACELULAR DE PHA'S

A degradação intracelular de P(3HB) é efetuada através de uma seqüência de reações envolvendo, nesta ordem, PHA despolimerase, D(-)-3-hidroxiacetil-CoA desidrogenase e acetoacetil sintetase para formar ácido D-3-

hidroxibutírico e acetil-CoA (Doi, 1990, Jendrossek et al., 1996). O acetoacetil-CoA é um intermediário comum para as vias de síntese e degradação de P(3HB). Doi et al. (1992) estudaram a cinética de acúmulo e degradação de P(3HB) em *R. eutropha* e descobriram que a degradação do polímero é dez vezes mais lenta que a sua síntese. A degradação de polímero é controlada pela inibição da 3-hidroxibutirato desidrogenase pelo acetoacetato e o NADPH (Byrom, 1987).

### 2.5.3.1 Regulação da Síntese de PHA's

As condições necessárias para a síntese de P(3HB) são elevadas concentrações de NADPH, baixas concentrações de CoA e uma alta concentração de acetil-CoA. A regulação da síntese de PHA se faz em nível enzimático pela inibição da  $\beta$ -cetotiolase por meio da coenzima A (Steinbüchel e Schlegel, 1991). Em crescimento não limitado, a concentração de CoA é presumivelmente alta, causando assim a inibição da enzima (Oeding e Schlegel, 1973). Um crescimento limitado em nutrientes (mas não limitado em fonte de carbono) se traduz em uma diminuição na concentração de CoA e acúmulo de acetil-CoA. O elemento limitante pode ser fósforo, potássio, magnésio, oxigênio, nitrogênio, etc (Steinbüchel e Schlegel, 1989). A influência da limitação de crescimento sobre a síntese de P(3HB) se expressa em uma parte pelo equilíbrio do nível redox (coenzimas reduzidas/coenzimas oxidadas) e, de outra parte, pela existência de um fluxo do catabolismo de carbono superior ao fluxo metabólico (Braunegg et al., 1998).

Em autotrofia, a síntese de P(3HB) é observada simultaneamente a uma diminuição da relação  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  (Braunegg et al., 1998). Em heterotrofia, em condições de limitação, o aumento da síntese de P(3HB) é concomitante com o aumento da relação  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  e  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  (Lee et al., 1996). Sob limitação em oxigênio, a relação  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  aumenta, por não existir acceptor final de elétrons na cadeia respiratória. As enzimas citrato sintase e isocitrato desidrogenase, responsáveis pela entrada da acetil-CoA no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), são inibidas pelo excesso de NADH, provocando um acúmulo de acetil-CoA e, conseqüentemente, a redução de CoA. Nestas condições de acúmulo de acetil-CoA e de não inibição da  $\beta$ -cetotiolase, ocorre a síntese do polímero. Henderson e Jones (1997) (citado por Braunegg et al., 1998) discutiram a

função em potencial da citrato sintase em regular a produção de P(3HB) através de sua habilidade de controlar o fluxo de carbono dentro do ciclo do ácido tricarbóxico, obtendo um grande acúmulo de polímero.

Dawes e Senior (1973) propuseram que a síntese de P(3HB) não funciona apenas como reserva de carbono e energia, mas serve também para a diminuição do poder redutor, podendo ser considerado como regulador do poder de óxido-redução da célula. Observaram que a síntese de P(3HB) foi acompanhada por um pronunciado aumento no poder de óxido-redução da cultura com concomitante queda nas taxas de utilização de oxigênio e evolução do gás carbônico concluindo, com isto que, durante a limitação de oxigênio, as células ajustam-se ao novo meio pela reoxidação do excesso do poder redutor, através da síntese de P(3HB).

A limitação nutricional mais empregada para a produção de P(3HB) é a deficiência em nitrogênio. Suzuki et al. (1986) consideraram a limitação em nitrogênio como a melhor escolha. Isto se deve ao fato do microrganismo ser mais dependente de nitrogênio do que de outros elementos limitantes e porque a fonte de nitrogênio é mais rapidamente assimilada do que outras fontes de elementos essenciais.

Sob limitação de nitrogênio, as células não produzem mais proteínas e ocorre acúmulo de ATP. O excesso de ATP provoca uma diminuição da fosforilação oxidativa e, dessa maneira, acúmulo das coenzimas reduzidas, com as mesmas conseqüências vistas na limitação em oxigênio (Dawes e Senior, 1973). Steinbüchel e Schlegel (1989) estudaram a produção de P(3HB) por *R. eutropha* sob condições de limitação de vários nutrientes essenciais, como oxigênio, amônia, sulfato, magnésio, fosfato, potássio e ferro, utilizando gliconato como fonte de carbono. Foi observado que, sob limitação em nitrogênio, *R. eutropha* acumulava polímero a uma taxa superior àquela obtida através da limitação em oxigênio. A Figura 2.8 resume a regulação proposta pela literatura.

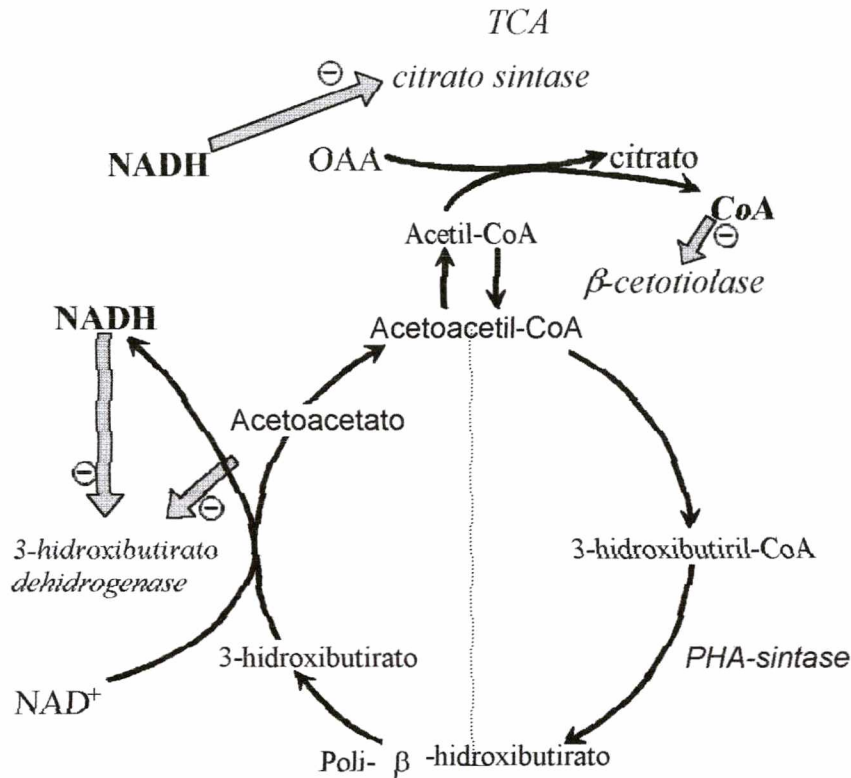


Figura 2.8 Regulação da biossíntese e degradação de P(3HB).

Em condições de excesso de energia, o nível de NADH inibe a depolimerização de P(3HB) e o ciclo de Krebs (TCA). A diminuição da concentração em CoA-SH permite que a  $\beta$ -cetotiolase (acetil-CoA aciltransferase) possa catalisar a condensação de acetil-CoA em acetoacetil-CoA e assim levar à síntese de P(3HB). Em deficiência de energia, o controle move-se no outro sentido (Byrom, 1987).

## 2.6 PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS

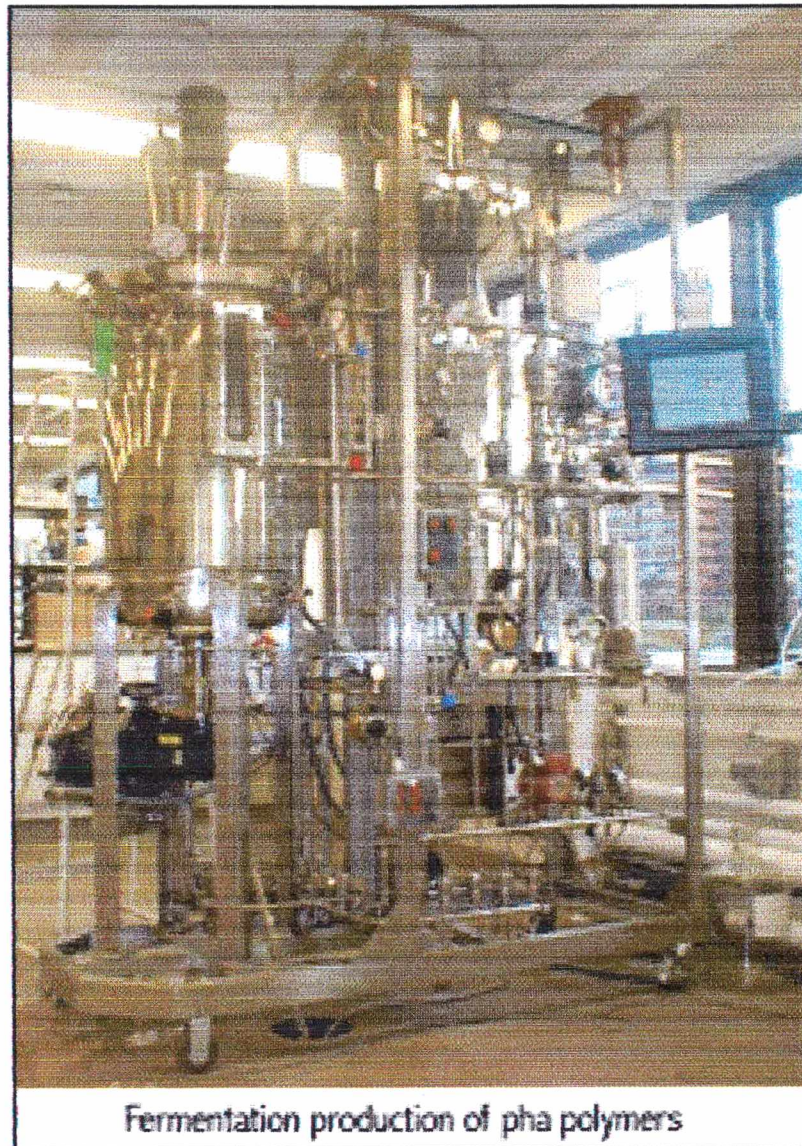
Estudos são concentrados em reduzir preço de PHA's através do desenvolvimento de novas cepas, condições de culturas mais eficientes e processos de recuperação mais econômicos. Os únicos polímeros produzidos industrialmente em quantidades apropriadas à caracterização são P(3HB), P(3HB-co-3HV), P(4HB) e P(3H<sub>x</sub>-co-3HO) (Lee et al., 1996a).

Embora as propriedades de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) como termoplásticos biodegradáveis tenham chamado atenção por mais de 20 anos, e as

patentes tenham originalmente começado nos Estados Unidos por J.N.Baptist em 1962, a primeira produção industrial de PHA's não ocorreu antes de 1982 quando a Imperial Chemical Industries (ICI) comercializou-os sob o nome industrial de Biopol. A ICI iniciou seus projetos na década de 70 e são correntemente produtores de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) a partir de glicose e ácido propiônico utilizando uma cepa mutante de *Alcaligenes eutrophus H16* em larga escala. A ICI produziu PHA's sob a estratégia de limitação de um nutriente, e o processo podia ser dividido em duas fase distintas: crescimento e acúmulo (Lee e Chang, 1995). ICI iniciou a comercialização de PHA's em 1975-6 sob o nome de Biopol e este é utilizado na Alemanha desde 1990 para manufaturar frascos de shampoo para a indústria de cosméticos da Wella. Atualmente, a produção da ICI é comercializada pela Monsanto. Em 1995, a Brocanto Internacional também passou a utilizar estes polímeros nos Estados Unidos. Atualmente PHA's estão sendo testados como materiais para embalar cosméticos. O Japão também comercializa o Biopol através da empresa Ishizawa Kenkyujo's Earthic Alga. A empresa MBX – Metabolix Inc, de Cambrige (EUA) também desenvolve tecnologias para a produção de PHA's desde 1980 aplicados a materiais biomédicos. A Figura 2.9 ilustra um processo produtivo de polihidroxicanoatos apresentado por esta empresa.

Uma série de pesquisas têm sido feitas para otimizar a produção de PHA. Entre elas destacam-se o uso de novos substratos, a utilização de novos microrganismos e uma melhor compreensão do metabolismo dos microrganismos produtores. Estas pesquisas envolvem a melhoria da produtividade e a obtenção de melhores fatores de conversão de substrato em produto, através do aperfeiçoamento dos sistemas de controle e desenvolvimento de novas técnicas de produção.

A tecnologia e economia da produção de P(3HB) em escala industrial é abordada por Byrom (1987) discutindo-se variáveis envolvidas no custo como fatores de conversão, complexidade da tecnologia de produção, custo de capital da planta e processo de separação do produto. Consequentemente, a seleção do organismo e substrato influem criticamente no custo. Com estes estudos, espera-se reduzir o custo de produção do PHA, dos atuais US\$ 16,00 Kg<sup>-1</sup>, permitindo que este seja competitivo frente aos plásticos derivados do petróleo (Braunegg et al., 1998).



**Figura 2.9:** Ilustração de um processo produtivo apresentado pela empresa Metabolix

A produção de PHA em regime descontínuo é um processo simples de produção, porém, devido à limitação pelo substrato, não se consegue obter nestas culturas uma densidade celular elevada o suficiente para a produção comercial de biopolímero. O método mais empregado para obtenção de altas densidades celulares as quais são freqüentemente necessárias para alta produtividade do polímero, tem sido culturas em batelada alimentada. Sistemas de cultura contínua podem oferecer alta produtividade tanto quanto batelada alimentada, mas somente quando a cultura pode ser mantida estável e sem contaminação (Doi e Koyama, 1995). Porém, a cultura contínua supera a cultura descontínua com alimentação como uma ferramenta de pesquisa para a determinação do efeito da velocidade de crescimento e níveis de nutriente na produção de um composto (Gostomski e

Bungay, 1996). Biorreatores com membranas também têm sido empregados para obter altas densidade de células mas necessitam de melhorias para serem empregados industrialmente (Lee e Chang, 1995).

### **2.6.1 CULTURAS EM REGIME DE BATELADA ALIMENTADA**

Durante a cultura em batelada alimentada, os nutrientes são introduzidos no reator intermitentemente ou constantemente, pelo monitoramento de inúmeros parâmetros de "feedback" tais como oxigênio dissolvido e pH. Nestes estudos, entretanto, a concentração de substrato no reator não pode ser precisamente mantida devido à natureza da estimativa indireta. A partir de estudos cinéticos para o crescimento de *Ralstonia eutropha* e acúmulo de PHA, foi encontrado que a concentração de carbono deve ser mantida em um valor ótimo para produção eficiente de PHA. Entretanto, para o desenvolvimento de um método para monitorar e controlar precisamente e controlar as concentrações da fonte de carbono é essencial. Os dois métodos mais empregados para monitorar a concentração de substrato são a estimativa por taxa de evolução de dióxido de carbono e um sistema de monitoramento *on-line*. Culturas em *fed-batch* de *R. eutropha* para a produção de P(3HB-co-3HV) são também conduzidas usando estratégias de alimentação similares (Lee e Chang, 1995).

Entre as vantagens do processo batelada alimentada, está a possibilidade de controlar os nutrientes alimentados através de mudanças nas taxas de alimentação (Borzani et al., 1975).

O processo industrial de produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) em batelada alimentada tem sido realizado pela Imperial Chemical Industries (ICI) (Byrom, 1987). Neste processo, a *R. eutropha* cresce em um meio contendo glicose e sais minerais sendo o fósforo o elemento limitante durante a fase de produção de P(3HB). O tempo total de cultura é de 110 a 120 horas e a quantidade de polímero acumulada é superior a 75% da biomassa total seca.

Um método em batelada alimentada em dois estágios, no qual foi empregado dois diferentes microrganismos, crescendo em dois substratos em um meio complexo, foi relatado por Tanaka et al. (1993) para produzir P(3HB). Em um primeiro estágio, xilose é convertida pela cepa de *Lactococcus lactis* em uma mistura



de ácido láctico e ácido acético. Após a remoção de células por centrifugação, *R. eutropha* é inoculada no meio e passa a consumir os ácidos orgânicos ali presentes e produzir P(3HB). Embora o cultivo tenha sido realizado sem a presença de um elemento limitante, os autores relatam um acúmulo de até 55% de PHB na biomassa seca total.

### **2.6.2 A INFLUÊNCIA DE ALIMENTAÇÃO OU CARÊNCIA DO ELEMENTO LIMITANTE NA PRODUÇÃO DE PHA'S**

Desde que PHA são sintetizados e acumulados sob condições de crescimento desfavoráveis na presença de excesso de carbono, é importante desenvolver estratégias de cultivo que estabeleçam tais condições e permitam obter uma produção eficiente de PHA's. Existem numerosos microrganismos que acumulam PHA's e obviamente, a condição ótima para produção de PHA's será diferente de um microrganismo para outro. Alguns microrganismos acumulam PHA's sob limitação de nutrientes, enquanto alguns outros tais como *A. latus* acumulam polímero durante a fase de crescimento. Estratégias diferentes para o crescimento destas bactérias em altas densidades têm sido desenvolvidas pois isto é necessário para obter altas concentrações de PHA's. Também condições requeridas para um acúmulo eficiente de PHA's tais como limitação de nutrientes tem sido identificadas para alguns microrganismos (Lee e Chang, 1995).

A síntese de PHA's pode ser resultado de limitações provocadas pela ausência ou deficiência de oxigênio, nitrogênio, fosfato, sulfato, magnésio ou potássio no crescimento. Magnésio é essencial para crescimento da célula e seu funcionamento parece ter três funções: manter a integridade dos ribossomos, participar do mecanismo de controle de permeabilidade das membranas da célula e como co-fator em muitas reações enzimáticas. Fosfato é um componente vital para muitas estruturas celulares: ácidos nucleicos, fosfolípidos e proteínas. Além disto, transformações entre compostos fosforilados estão envolvidos em energética celular (Asenjo et al., 1995). Nitrogênio é desejável para a manutenção da atividade anabólica de acúmulo do biopolímero (Oliveira, 1999).

Bitar e Underhill (1990) estudaram a cinética de acúmulo de P(3HB) por *R. eutropha* durante o crescimento sob carência e alimentação de nitrogênio, na fase

de produção. Quando a amônia foi fornecida ao meio a uma taxa de  $0,00065 \text{ g.h}^{-1}$ , a produtividade de P(3HB) aumentou de  $0,1 \text{ g.L}^{-1}\text{.h}^{-1}$  para  $0,99 \text{ g.L}^{-1}\text{.h}^{-1}$ .

Suzuki et al. (1986) estudaram a limitação da fonte de nitrogênio concluindo que a completa deficiência leva à perda considerável da atividade microbiana. Consequentemente, também a alimentação excessiva causaria degradação do polímero acumulado e consequentemente, a redução da capacidade microbiana de sintetizar o polímero.

Estudos sob carência em fósforo apresentam resultados ainda melhores do que sob carência ou alimentação controlada de nitrogênio. Ryu et al. (1997), trabalhando em cultura batelada alimentada de *R. eutropha*, sob limitação em fósforo e em um fermentador de 60 L, conseguiram os melhores resultados até agora relatados para a produção de P(3HB). Em seus experimentos, o acúmulo de P(3HB) foi induzido pela limitação em fosfato e o controle de pH realizado usando uma solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . A partir de uma concentração inicial de fosfato de  $5,5 \text{ g.L}^{-1}$ , a cultura em batelada alimentada resultou em uma concentração celular final de  $281 \text{ g.L}^{-1}$ , concentração de P(3HB) de  $232 \text{ g.L}^{-1}$  e uma produtividade de  $3,14 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ . O conteúdo de P(3HB) nas células alcançou 80% com um fator de conversão substrato em P(3HB) de  $0,38 \text{ g.g}^{-1}$ . Aragão (1996) acredita que a maior produtividade obtida sob carência em fósforo se deve ao fato de que este elemento não faz parte da composição de proteínas e com isso há um crescimento residual de biomassa com acúmulo de P(3HB).

Resultados obtidos por Oliveira (1999) demonstraram que os valores de produtividade de P(3HB) foram maiores nas culturas sob carência/alimentação de fósforo do que sob carência/alimentação em nitrogênio. Como fósforo não participa diretamente na síntese de proteínas, a carência e a alimentação deste nutriente não bloqueia a síntese de proteínas, o que pode permitir a manutenção de uma atividade metabólica celular mínima com produção de polímero.

### **2.6.3 INFLUÊNCIA DO ÁCIDO PROPIONICO NA PRODUÇÃO DE P(3HB-co-3HV)**

Muitas espécies de bactérias são conhecidas por acumularem P(3HB-co-3HV) quando ácido propiônico está presente no meio. Porém o crescimento de algumas bactérias (*Ralstonia eutropha* inclusive) é inibido por 0,1% (p/p) deste ácido

(Byrom, 1987). A fração de 3HV no polímero é determinada através da razão entre a concentração de glicose e ácido propiônico na fase de acúmulo do polímero. Este conteúdo de 3HV pode ser regulado através da alteração de níveis de propionato/ácido propiônico no meio, resultando em uma série de diferentes termoplásticos com vários graus de flexibilidade (Doi et al., 1988). Assim, para aumentar o conteúdo em 3HV no copolímero, o qual é importante para melhorar o processamento do polímero, são necessários controles precisos de alimentação deste substrato (Park et al., 1994).

Uma vez que este ácido é tóxico em quantidades tão pequenas, a produção em batelada alimentada é um recurso apropriado (Ramsay et al, 1990a; Doi, 1990a) com alimentações controladas por métodos *on-line*.

Outra técnica aplicada para minimizar o efeito inibitório e se obter boas concentrações de acúmulo de polímero é a investigação de várias concentrações de glicose de propionato como proposto por Park et al. (1994).

Estudos de Kim et al., (1992) demonstraram que o crescimento de *R. eutropha* é completamente inibido quando a concentração de ácido propiônico excede  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ . Estes autores conseguiram manter uma concentração ótima de ácido propiônico durante a fase de produção usando o método de regulação de pH para a alimentação deste ácido. A mesma metodologia de alimentação foi aplicada por Yoo et al, 1987 no qual o crescimento de *R. eutropha* foi testado em diferentes pHs iniciais. Em pH inicial de 7,5 os autores relatam o crescimento da bactéria em até  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido propiônico.

#### **2.6.4 INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE SUPLEMENTOS**

Estratégias para produção de PHA's com alta produtividade são necessárias para diminuir o custo total destes plásticos. Uma alternativa interessante é a utilização de suplementos ou indutores da produção de PHA's. Estes agentes podem interferir na via metabólica proporcionando maior produção de células e resultando em maior produtividade, mas também podem agir diretamente na síntese de PHA's.

Recentemente, Lee e Choi (1999) citaram a utilização de ácido oleico e da adição de ácido acético na produção de P(3HB-co-3HV) em culturas

descontínuas alimentadas de *Escherichia coli* recombinante. Estes autores sugeriram a adição de pequenas quantidades de ácido acético no meio, para estimular a via de utilização de ácido propiônico, já que o mecanismo de assimilação destes dois ácidos parece ser similar. Também sugeriram a suplementação da cultura com ácido oleico, e em ambos os casos os resultados obtidos foram melhores do que os obtidos sem a adição de ácido acético.

Em estudos realizados por Beaulieu et al. (1995), a produção de P(3HB) por *R. eutropha* com 3% de glicose foi suplementada com melaço de cana e sais de sulfato, nitrato, fosfato e cloreto tendo sido observada interferência devido a presença destes. Os melhores resultados de crescimento foram obtidos quando 0,3% de melaço de cana estava presente no meio.

## **2.6.5 SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO**

A avaliação econômica do processo de produção de P(3HB) indica que o custo do substrato tem uma contribuição importante no custo global de produção, podendo representar mais de 38 % segundo Choi e Lee (1999b). O alto custo de produção de PHA's pode ser minimizado usando resíduos orgânicos de baixo custo provenientes de plantas de processamento de alimentos.

### **2.6.5.1 Amido hidrolisado**

Kim e Chang (1998) estudaram o uso de amido hidrolisado como fonte de carbono para culturas de *Azotobacter chroococcum*, conseguindo, em batelada alimentada, uma concentração de 54 g.L<sup>-1</sup> com 46% de P(3HB) intracelular sob limitação em oxigênio. Eles atribuíram como vantagens neste experimento a capacidade do microrganismo não exigir grandes quantidades de sais e acumular P(3HB) em condições de limitação de oxigênio, o que, segundo eles, ocorre freqüentemente em operações em larga escala. Ainda de acordo com estes pesquisadores, a otimização das condições de cultura para *A. chroococcum* pode tornar este microrganismo um bom candidato para a produção industrial de P(3HB), principalmente pela sua capacidade de consumir uma fonte de carbono barata como é o amido.

### 2.6.5.2 Gorduras e Óleos

A biossíntese de PHA por *Pseudomonas resinovorans* a partir de gorduras de origem animal e vegetal foi investigado por Ashby e Foglia (1998). Nestes experimentos, foram obtidos PHAs de cadeia longa, principalmente polihidroxiocetanoatos e polihidroxidecanoatos. Como estes polímeros são aderentes à temperatura ambiente, os autores acreditam que existe a possibilidade de aplicá-los como material adesivo ou, então, desenvolver misturas com P(3HB) para ampliar a aplicação destes polímeros.

Outro estudo com óleos vegetais foi feito por Fukui e Doi (1998) sobre culturas de *R. eutropha* H16 (ATCC 17699). Quando óleo de oliva, milho ou palma foram usados como única fonte de carbono, a *R. eutropha* acumulou em torno de 80% de seu peso celular seco em P(3HB). Eles verificaram que, utilizando o óleo de oliva, a *R. eutropha* secretava lipase e sugeriram que esta enzima hidrolisava os triglicerídeos no meio, o que resultava na incorporação dos ácidos graxos pelas células e metabolização destes ácidos a acetil-CoA através do ciclo de  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos. Fukui e Doi previram que a aplicação dos óleos vegetais como fonte de carbono para a biossíntese de PHA seja capaz de reduzir os custos de produção destes poliésteres.

### 2.6.5.3 Soro de Leite

Soro de leite é um subproduto da manufatura de queijos o qual mais de 50% dos ingredientes do leite estão presentes. Devido à alta concentração de matéria orgânica ainda presente neste resíduo, sua utilização como substrato é interessante do ponto de vista econômico (Lund et al., 1992). O soro de leite é o maior subproduto da manufatura de queijo e caseína, representando de 80 a 90% do volume de leite transformado.

Wong e Lee (1998) pesquisaram o uso de soro de leite como substrato para a cultura de *E. coli* recombinante para a produção de P(3HB). Quando alimentado com uma solução de soro de leite concentrada por evaporação com  $210 \text{ g.L}^{-1}$  de lactose, conseguiu-se uma concentração celular seca de  $87 \text{ g.L}^{-1}$  e uma concentração de P(3HB) de  $69 \text{ g.L}^{-1}$  em regime batelada alimentada durante 49

horas. O conteúdo de P(3HB) foi de 80% da biomassa total seca e com uma produtividade em polímero de  $1,4 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Neste trabalho, concluiu-se que é possível aproveitar o soro de leite como fonte de carbono para as culturas de *E. coli* visando a produção de P(3HB). O soro de leite, dessa forma, deixaria de ser mais um resíduo causador de danos ao ambiente para passar a ser uma fonte de carbono aproveitável na produção de biopolímero.

Em estudos realizados por Pries et al. (1990), os genes da  $\beta$ -galactosidase foram expressos em *Pseudomonas saccharophila* permitindo que esta bactéria crescesse em lactose como única fonte de carbono. Assim, utilizou-se lactose como fonte de carbono em *Alcaligenes eutrophus* H16 e *P. saccharophila* usando técnicas de DNA recombinante. Os resultados demonstraram que a utilização de lactose e galactose tiveram sucesso em cepas de *Ralstonia eutropha*.

#### 2.6.5.4 Melaço

Outro subproduto da indústria que vem sendo estudado como fonte alternativa de carbono na produção de biopolímero é o melaço. Este substrato é largamente usado como fonte de carbono em fermentações envolvendo leveduras (Peppler, 1979, citado por Beaulieu et al., 1995). Além de ser mais barato que a glicose, o melaço contém elementos traços e vitaminas tais como tiamina, riboflavina, piridoxina e niacinamida (Crueger e Crueger, 1984, citado por Beaulieu et al., 1995) que podem ser usados como potencializadores do crescimento.

Liu et al. (1998) tiveram êxito em usar melaço de beterraba como única fonte de carbono para produzir P(3HB) em cultura batelada alimentada de *E. coli* recombinante. O melaço de beterraba foi hidrolisado e considerou-se que  $60 \text{ g.L}^{-1}$  de melaço seria a concentração ideal de substrato para a síntese de P(3HB). Os resultados de peso celular seco, conteúdo de P(3HB) e produtividade de P(3HB) foram de  $39,5 \text{ g.L}^{-1}$ , 80% (p/p) e  $1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , respectivamente, em um fermentador de 5 L e após 31,5 horas de cultura.

No Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT (IPT, 1993) foram realizados estudos com melaço de cana invertido, que eles denominaram de HTM (*High Test Molasses*). A composição deste substrato é de 33% de sacarose, 33% de glicose e 33% de frutose. Os ensaios foram desenvolvidos usando nitrogênio

como elemento limitante e utilizando, como cepa produtora de biopolímero, a *R. eutropha* DSM 545. Os resultados obtidos foram comparáveis àqueles obtidos para glicose com um acúmulo de P(3HB) em biomassa seca de 74% (p/p) e uma produtividade de  $0,9 \text{ gP(3HB)L}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

Outro estudo com melão de cana foi realizado por Beaulieu et al. (1995). Neste trabalho, o melão de cana foi usado como fator de crescimento para culturas de *R. eutropha* devido ao seu conteúdo em vitaminas e sais minerais. Os experimentos foram desenvolvidos em frascos de erlenmeyer contendo glicose como fonte única de carbono. Eles concluíram que uma concentração de 0,3% de melão de cana, como fator de crescimento, maximizava a produção de P(3HB) ao estimular um aumento na formação de biomassa durante a fase de crescimento não limitado.

#### 2.6.5.5 Resíduo da indústria de suínos

O resíduo da fervura de suínos, foi escolhido por Cho et al. (1997) como substrato devido à riqueza de componentes orgânicos e inorgânicos necessários ao crescimento bacteriano. Este resíduo contém acetato, propionato, butirato, isobutirato, valerato, isovalerato, hexanoato, nitrogênio, fosfato e sais minerais. Os estudos foram conduzidos analisando quatro substratos: glicose, glicose-alcanoato, resíduo de suíno e resíduo de suíno com glicose. *Azotobacter vinelandii* quando cultivado por 48 h em solução concentrada de resíduo de suíno com 30 g de glicose produziu  $5,18 \text{ g.L}^{-1}$  de célula,  $1,62 \text{ g.L}^{-1}$  de PHB com 10,8% de hidroxivalerato. Quanto mais diluída a solução de resíduo, melhores foram os resultados obtidos. A produção de P(3HB-co-3HV) a partir destes substratos é menor do que em glicose, provavelmente pelo efeito inibitório do acetato, propionato, butirato e valerato presentes no resíduo. Mesmo sendo menor a produção de polímero quando comparada à glicose, a utilização deste resíduo é interessante do ponto de vista econômico.

#### 2.6.5.6 Resíduo da destilação do álcool

Resíduo da destilação do álcool contém compostos nitrogenados e açúcar em sua composição permitindo o seu uso em fermentações ( $10\text{-}15 \text{ g.L}^{-1}$  açúcar-

glicose e 1.5-1.7 g.L<sup>-1</sup> de nitrogênio total). Em estudos realizados por Lee et al. (1996d) este resíduo foi utilizado como fonte para o crescimento de *Actinobacillus sp* e produção de P(3HB). O melhor rendimento foi obtido sem limitação alguma e desta forma a produção de P(3HB) foi classificada como associada ao crescimento. Os dados finais obtidos foram 4.8 g.L<sup>-1</sup> de célula e 2.1 g.L<sup>-1</sup> de PHB com acúmulo de 42,8%.

### 2.6.5.7 Caseína hidrolisada como fonte de nitrogênio

Na busca de substratos mais baratos na produção de P(3HB), Bormann et al., (1998) estudaram a produção de P(3HB) por *Ralstonia eutropha* DSM 11348 (um mutante) cultivada em meio com glicose como fonte de carbono e caseína hidrolisada como fonte única de nitrogênio. Esta proteína é interessante pois já são usados na agricultura como fonte de nitrogênio. Concluíram que proteínas hidrolisadas constituídas de aminoácidos e oligopeptídeos podem ser usadas como fontes de nitrogênio em concentrações em torno de 30 g.L<sup>-1</sup> ao invés de concentrações mais baixas como estavam sendo utilizadas.

## 2.6.6 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

Uma cultura com alta densidade celular apresenta vantagens em relação a uma cultura com baixa densidade como alta concentração de produto, produtividade aumentada e redução do custo de recuperação do produto. Assim, culturas em batelada alimentada são freqüentemente usadas para a obtenção de altas densidades celulares e reduzir efeitos inibitórios de substratos e certos subprodutos.

Lim et al, (1997) aplicando este tipo de cultura, obtiveram produtividade de 2,63 g.L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> na produção de P(3HB) por *R. eutropha*. Também Lee et al., (1996c) para produção de P(3HB-co-3HV) por *E. coli* obtiveram valores em torno de 2,88 g.L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> com 120,3 g.L<sup>-1</sup> de biomassa. Valores altos de produtividade (2,42 g.L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) foram obtidos por Chang et al., (1994) para produção de P(3HB), com controle da concentração de glicose por *R. eutropha* (164 g.L<sup>-1</sup>). Estudos de Ryu et al. (1997) demonstraram que em culturas de alta densidade de *R. Eutropha*, com



limitação em fosfato é possível obter produtividade de  $3,14 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , para produção de P(3HB).

## 2.7 DETECÇÃO E EXTRAÇÃO DE PHA'S

Tradicionalmente, o método de espectrofotometria de Law e Slepecky para análise quantitativa de PHB, através da conversão do polímero a ácido crotônico por aquecimento com solução concentrada de ácido sulfúrico, tem sido substituído por cromatografia gasosa (Braunegg et al., 1978; Comeau et al., 1988, Riis e Mai, 1988). De fato, a cromatografia gasosa é o método mais empregado para a análise da quantidade, estrutura e composição de PHA's acumulados (Braunegg et al., 1978). A técnica mais comum de detecção *in vivo* é a coloração fluorescente dos grânulos (Ostle e Holt, 1982).

Os processos de separação de PHA da biomassa podem ser divididos em duas categorias: (a) solubilização seletiva de PHA em solvente orgânico, deixando a biomassa restante em suspensão e (b) ruptura e precipitação (solubilização) dos componentes celulares outros que não o PHA, deixando os grânulos de PHA em suspensão (Ramsay, 1994b).

A utilização de compostos polares brandos como acetona e álcoois fragilizam ou destroem o material celular não polimérico (*non polymer cell material* – NPCM), deixando intactos os grânulos de P(3HB), embora alguns PHAs de cadeia longa sejam solúveis em acetona (Holmes et al., 1980, Brandl et al., 1988). NPCMs consistem principalmente de ácidos nucleicos, lipídeos e fosfolipídeos, peptidoglicanos e proteínas.

A maioria dos processos de recuperação utilizam solventes orgânicos (Ramsay, 1994b). Embora a extração por solvente seja amplamente usada para recuperar P(3HB) com elevada pureza, este método requer grandes quantidades de solventes tóxicos e/ou voláteis, o que não apenas aumenta o custo total de produção como também causa danos ao meio ambiente (Choi e Lee, 1997).

A digestão de NPCM também pode ser obtida com soluções alcalinas de hipoclorito de sódio. Entretanto, durante a digestão do material celular não polimérico, é observada severa degradação de PHA resultando na perda de peso molecular do polímero (Berger et al., 1989). De acordo com Asenjo et al. (1995) um

baixo peso molecular do polímero associado a uma ampla distribuição destes pesos moleculares são fatores indesejáveis para a produção industrial. Entretanto, fazendo um pré-tratamento com surfactante e a digestão com hipoclorito sob condições ótimas (pH, temperatura, duração e relação biomassa/fase aquosa), se obtém um biopolímero menos degradado e com alta pureza (Ramsay et al., 1990b).

Recentemente, Choi e Lee (1999b) desenvolveram um método simples de digestão alcalina para recuperar P(3HB) a partir de *E. coli* recombinante. Quando as células de *E. coli* recombinante contendo 77% de P(3HB) foram tratadas com NaOH 0,2 M a 30 °C durante 1 hora, o P(3HB) foi recuperado com uma pureza de 98,5%. Empregando o método de digestão alcalina, o custo de produção de P(3HB) foi 25% menor que o obtido empregando o método de digestão por surfactante-hipoclorito.

## 2.8 CARACTERIZAÇÃO DE PHA'S

Características como peso molecular e temperatura de fusão são importantes de serem quantificadas pois influem nas aplicações de PHA's. A caracterização destes polímeros pode ser realizada avaliando-se propriedades como densidade, cristalinidade, temperatura de transição vítrea, resistência a UV, permeabilidade ao oxigênio, biodegradabilidade, resistência ao impacto e a ruptura, distribuição do peso molecular, entre outras.

O peso molecular pode ser determinado por cromatografia por permeação (GPC) em gel utilizando-se como fase móvel clorofórmio a 30°C com um conjunto de cinco colunas de microstiragel para determinar a média da viscosidade de P(3HB) produzido por *Ralstonia eutropha*. Dawes e Senior (1973) também citam esta técnica como a melhor para a determinação da massa molecular.

Temperaturas de fusão e transição vítrea de PHA's em estado sólido são determinadas por calorimetria de varredura diferencial (DSC) (Anderson e Dawes, 1990; Zhang e Wang, 1994). Propriedades cristalinas são estudadas por raio-X (Lauzier e Marchessault, 1994).

## 2.9 APLICAÇÕES

Devido às características que possuem os P(3HB) e P(3HB-co-3HV), estes polímeros foram inicialmente usados na manufatura de garrafas, filmes e fibras para embalagens biodegradáveis, bem como, sacos de proteção para plantas. Além disso, filmes de PHAs podem ser aplicados em papel ou papelão para formar uma película impermeável e produzir um material composto completamente biodegradável, o que é uma alternativa aos materiais compostos não biodegradáveis preparados a partir de, por exemplo, papelão mais polietileno ou alumínio (Steinbüchel e Fächtenbusch, 1998).

Os PHAs também têm suas aplicações na área médica, tais como, materiais osteossintéticos e suturas cirúrgicas. Estes biopolímeros podem ser aplicados como matriz de materiais para liberação lenta de drogas, hormônios, herbicidas, inseticidas e fragrâncias para as indústrias farmacêutica e de alimentos. As aplicações médicas e farmacêuticas do P(3HB) são, todavia, restritas devido à sua biodegradação muito lenta e elevada estabilidade hidrolítica em tecidos estéreis. Finalmente, está sendo estudado o uso de PHAs como matéria-prima para a produção de tintas (Steinbüchel e Fächtenbusch, 1998).

O modo básico de operação para propósitos de cirurgias, tais como cliques, chapas e fibras requer um certo grau de elasticidade e a habilidade de suportar um grau de flexibilidade sem fraturar, que alguns PHA's podem atender.

Embora propriedades físicas de P(3HB) possam variar de acordo com as unidades de 3HV, o uso de técnicas de misturas com polissacarídeos, por exemplo, aumenta a versatilidade destes materiais. Isto pode ser interessante e útil, entretanto produz uma faixa de materiais biodegradáveis com um largo espectro de propriedades físicas para a investigação de misturas compatíveis.

Apesar de um método comum para aumentar a processabilidade e abaixar o módulo de tensão inicial de um polímero ser o uso de plasticidas durante o processo de operação, para aplicações biomédicas o uso de plasticidas apresenta dificuldades, primariamente por causa do potencial de toxicidade de substâncias normalmente usadas neste processo. Polímeros podem, em princípio, serem usados como plasticidas poliméricos para mudar propriedades físicas. Um polímero de interesse é o poliéster de poli-caprolactona (PCL) o qual em recentemente tem

sido muito explorado por sua propriedade única de misturar-se com muitos polímeros em várias composições. Nestas condições, por ser biodegradável, PCL misturado a PHA's é um polímero de potencial interesse, particularmente para aplicações biomédicas (Yasin e Tighe, 1992). A Tabela 2.4 apresenta a produção industrial e as áreas de interesse e aplicações de algumas empresas.

Tabela 2.4: Produção industrial de PHA's

<b>Companhia</b>	<b>Companhias produtoras de PHA's e Área de Atuação</b>
Berlim Packaging Corp. (USA)	Marketing
Bioscience Ltda (Finlândia)	Aplicações médicas
Bio Ventures Alberta Inc (Canadá)	Produção por <i>E coli</i> recombinante
Metabolix Inc (USA)	Produção por plantas transgênicas
Polyferm Inc (Canadá)	Produção por substratos de baixo custo
Zeneca Bio Products – ICI	Produção por <i>R. eutropha</i>
Zeneca seeds	Produção por plantas transgênicas
Petrochemia Danubia	Produção por <i>A latus</i>

A Figura 2.10 apresenta um esquema geral sobre o emprego de polihidroxicanoatos representando o *design* espacial de aplicação destes polímeros. Este esquema é apresentado pela empresa Metabolix, que atualmente dedica suas pesquisas e produção em PHA's aplicados à área médica. Este diagrama é apresentado da seguinte forma: as propriedades químicas da molécula do polímero (radicais presentes nas moléculas) no centro do *design* espacial determinam os atributos do polímero como o fato de ser biocompatível, termoplásticos ou termofixos, hipoalérgicos, etc. Estes atributos, por fim, determinam as suas aplicações como em válvulas para o coração, encapsulamento de remédios, suturas e outros.

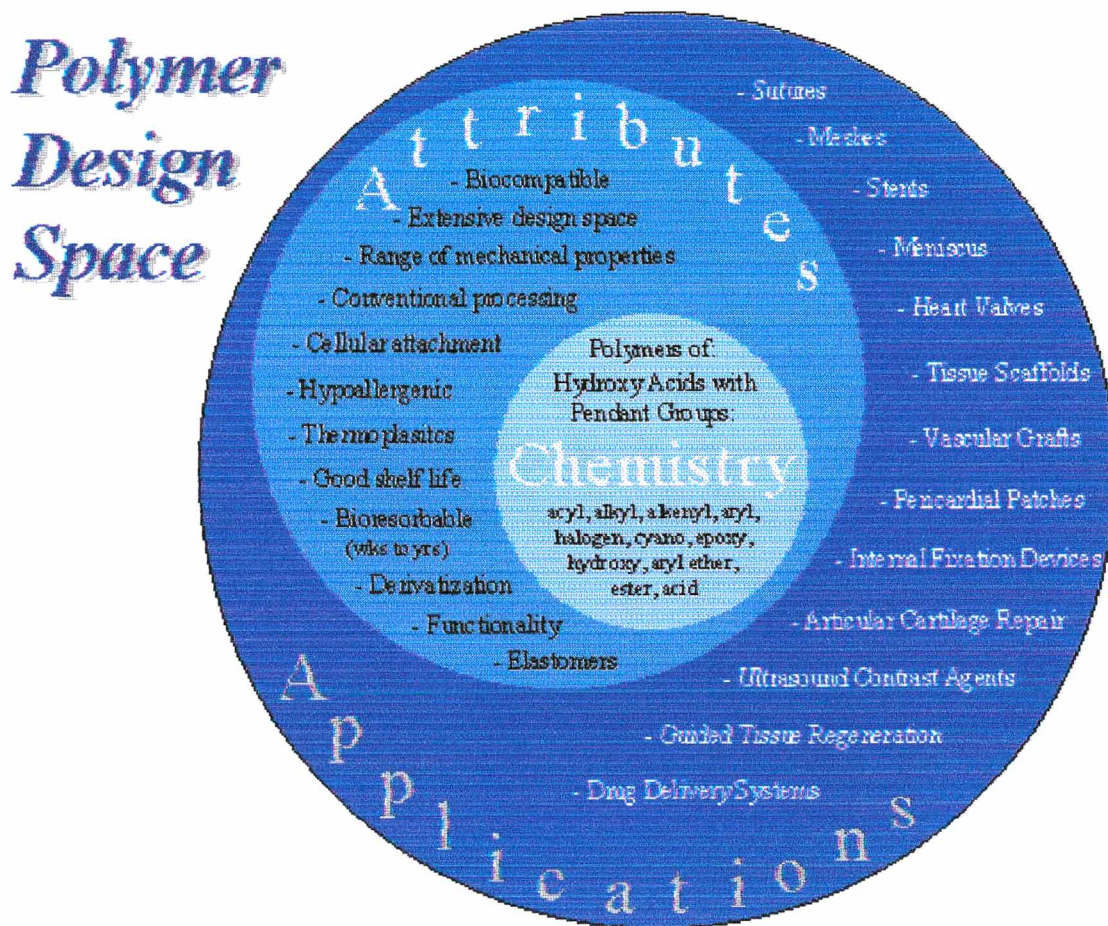


Figura 2.10: Esquema representativo do design espacial de aplicações de PHA's apresentado pela empresa Metabolix

Em suma, inúmeros materiais biodegradáveis termoprocessáveis têm sido produzidos, com propriedades físicas e degradativas as quais podem ser alteradas através da variação de quantidades de componentes de polímeros usados e os quais têm uma dependência composicional complexa. Certamente estas misturas são um grupo de materiais promissor (Sasikala e Ramana, 1996).

## 2.10 BIODEGRADABILIDADE

Biodegradabilidade é a capacidade de decomposição de materiais, em compostos inócuos, pela ação de seres vivos como, por exemplo, os microrganismos. Bactérias e fungos são os principais participantes no processo de biodegradação na natureza. A quebra destes materiais fornece aos microrganismos degradadores os precursores de componentes celulares além de energia. Deste

modo a biodegradação nada mais é que um processo catabólico (Braunegg et al., 1998). Uma das propriedades que distingue PHA's dos plásticos provenientes do petróleo é a sua biodegradabilidade. Produzidos naturalmente por bactérias do solo, PHA's são degradados quando expostos ao solo, ou a sedimentos marinhos. Apesar de sua biodegradabilidade os PHA's também têm boa resistência à água e ao vapor e são estáveis sob condições normais de estocagem e uso.

P(3HB) e P(3HB-co-3HV) são degradados, em sistemas biológicos tanto aeróbios quanto anaeróbios pela ação de enzimas extracelulares secretadas pelos microrganismos. A degradação ocorre mais rapidamente em despejos anaeróbios e mais lentamente no mar. Em ambientes aeróbio, os produtos finais são dióxido de carbono, água e húmus. Sob condições anaeróbias, metano também é produzido. Durante o processo de degradação não há a produção de intermediários nocivos (Luzier, 1992).

A Tabela 2.5 ilustra a degradação de um filme de 1 mm P(3HB-co-3HV) em diferentes ambientes como solo, água do mar, ambiente aeróbio e anaeróbio, e sedimentos de estuários.

Tabela 2.5: Biodegradação de P(3HB-co-3HV) em diferentes ambientes

<b>Ambiente</b>	<b>100% em perda de massa (semanas)</b>
Ambiente anaeróbio	6
Sedimentos estuários	40
Ambiente aeróbio	60
<i>Solo</i>	75
<i>Água do mar</i>	350

Fonte: Luzier, 1992

As velocidades de biodegradação dependem de uma série de fatores, incluindo área superficial, atividade microbiana, ambiente disponível, pH, temperatura, nível de mistura e presença de outros materiais nutrientes. Doi et al. (1990) estudaram a degradação hidrolítica e enzimática de filmes de P(3HB), P(3HB-co-3HV) e poli-3-hidrovalerato-co-4-hidrobutirato (P(3HV-co-4HB)) em vários ambientes. Eles verificaram que a presença de unidades de 4HB acentuavam as velocidades de degradação dos dois processos. Nakamura et al. (1992) expuseram filmes de P(3HB-co-4HB) à ação de PHA despolimerase isolada de *Alcaligenes*

*faecalis*. A degradação enzimática foi acelerada para frações de 4HB acima de 28 mol%, mas a depolimerização foi inibida para frações de 4HB acima de 85 mol%. Em outro experimento similar (Kang et al., 1995), a fração crítica de 4HB era de 13 mol%, fração para a qual a velocidade de degradação era 10 vezes mais rápida do que o homopolímero P(3HB). Doi et al. (1990) consideraram que esta aceleração possa ser atribuída ao decréscimo da cristalinidade dos copolímeros de 4HB em relação aos polímeros de P(3HB) e P(3HB-co-3HV), oferecendo às enzimas degradativas melhor acesso às cadeias poliméricas.

Nishida e Tokiwa (1993) sugerem que dois diferentes métodos de ataque microbiano ocorrem em P(3HB): uma degradação preferencial às regiões amorfas do polímero pela despolimerase extracelular, seguido da colonização bacteriana da superfície do filme, com subsequente degradação localizada.

Uma importante perda de massa (50-100%) de amostras de P(3HB-co-3HV) exposta durante 120 dias em lodos ativados foi observado por Gilmore et al. (1993) que demonstraram que a degradação resultava inteiramente da atividade biológica. A partir de experimentos em laboratório, Briese et al. (1994) relataram que a degradação de P(3HB-co-3HV) em despejo de lodo aeróbio era fortemente dependente do pH, com uma faixa de valores entre 7 e 8,5.

A Figura 2.11 representa o biociclo completo de produção e degradação de PHA's. Neste ciclo através da fotossíntese, as plantas fazem uso da luz solar e convertem dióxido de carbono e água em carboidratos (1-2). Estes na forma de açúcares simples fornecem matéria-prima para a produção de PHA's (3). Um microrganismo específico é utilizado no processo fermentativo para converter carboidratos em polímeros (4). Depois de acumular cerca de 80% de sua massa seca em forma de PHA's, o polímero é purificado (5) e pode ser manufaturado (6). Após seu uso, PHA's podem ser depositados em ambientes microbianos ativos (7) e a biodegradação deste polímero fornecerá água e gás carbônico (8). Por fim, uma rota direta através de plantas que produzem PHA's pode ser obtida (9).

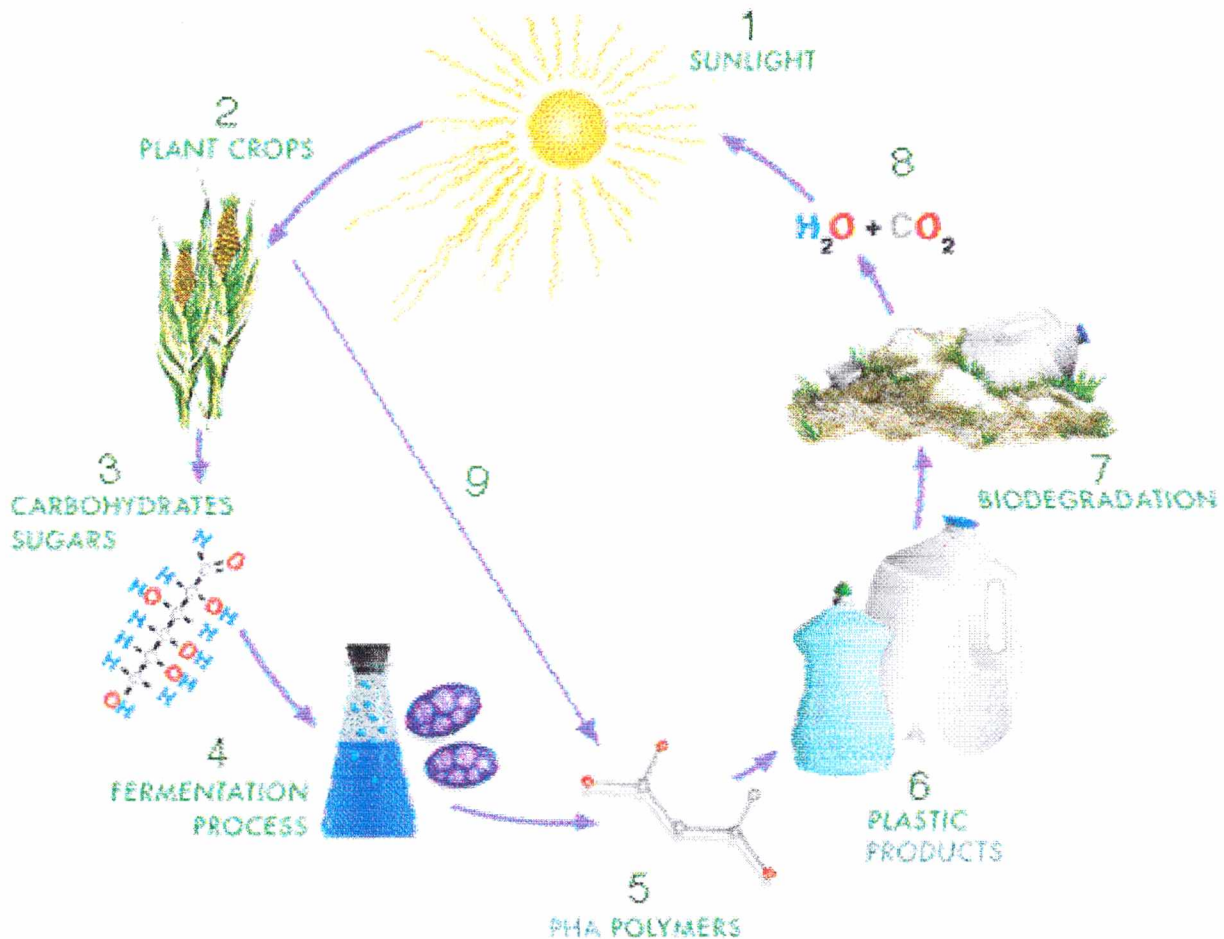


Figura 2.11 Biociclo de Polihidroxialcanoatos

## 2.11 FATORES QUE INFLUENCIAM O CUSTO DE PRODUÇÃO

PHAs são substitutos ideais dos plásticos derivados do petróleo por terem propriedades similares a vários termoplásticos e elastômeros, além de serem completamente biodegradáveis. Porém, o uso do PHA em uma faixa maior de aplicações é limitado principalmente pelo alto custo de produção deste biopolímero, quando comparado aos polímeros de origem petroquímica (Byrom, 1987).

Com o objetivo de reduzir o custo de produção e tornar o PHA um produto mais competitivo frente aos plásticos não biodegradáveis, tem-se procurado desenvolver melhores cepas de microrganismos produtores e processos mais eficientes de produção e recuperação de PHA (Lee, 1996a e b). Estes esforços permitiram, por exemplo, reduzir drasticamente o valor do copolímero P(3HB-co-3HV) (Luzier, 1992). Este copolímero era comercializado pela Monsanto com o nome



de Biopol e sua produção anual em 1998 era de aproximadamente 800 toneladas (Braunegg et al., 1998). O Biopol teve seu preço reduzido de US\$ 800,00 Kg<sup>-1</sup>, no início da década de 1980, para US\$ 16,00 Kg<sup>-1</sup> em 1989 (Luzier, 1992). Ainda assim, este valor continua sendo muito elevado quando comparado ao preço de mercado de plásticos como o polietileno e o polipropileno que custam menos de US\$ 1,00 Kg<sup>-1</sup> (Poirier et al., 1995). Entre os fatores que afetam o custo final de produção de PHA, encontram-se: produtividade de PHA, conteúdo de PHA, fator de conversão de substrato em biopolímero, preço da fonte de carbono e método de recuperação empregado.

### **2.11.1 PRODUTIVIDADE DE PHA**

A produtividade é definida como sendo a quantidade de produto produzido por unidade de volume e unidade de tempo. Para a produção de mesma quantidade de PHA por ano, o processo com menor produtividade requer um equipamento maior. Por exemplo, pode-se assumir que um determinado processo produza 100 gPHA.L<sup>-1</sup> em 50 horas (produtividade de 2 gPHA.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Entretanto, se em 50 h fossem obtidos 50 gPHA.L<sup>-1</sup> (produtividade de 1gPHA.L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>), um biorreator duas vezes maior seria necessário para atender à mesma finalidade (Choi e Lee, 1999a).

Comparando-se dois processos de produção de P(3HB) por *E. coli* recombinante com duas diferentes produtividades, para uma capacidade de produção estimada de 100.000 ton/ano, é possível ver o efeito da produtividade sobre o custo de produção (Choi e Lee 1997, 1999). Quando a produtividade de P(3HB) aumentou de 1,98 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> para 3,20 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, o custo operacional de produção de P(3HB) reduziu de US\$ 5,37 Kg<sup>-1</sup> para US\$ 4,91 Kg<sup>-1</sup> de P(3HB). Uma avaliação econômica mostrou que o aumento da produtividade provocou a redução dos custos de capital fixo direto, mão-de-obra e equipamentos (Choi e Lee 1997,1999a). A Tabela 2.6 apresenta o custo operacional estimado, fornecido por Choi e Lee (1999a), para a produção de 100.000 toneladas/ano de P(3HB) usando diversos microrganismos a partir de glicose.

Tabela 2.6- Estimativa do custo operacional de produção de 100000 toneladas/ano de P(3HB) com *A. latus*, *M. organophilum* e *E. coli* recombinante como microrganismos produtores. O P(3HB) foi recuperado por surfactante e hipoclorito (Choi e Lee, 1999a).

<b>Parâmetros</b>	<b><i>A. latus</i><sup>a</sup></b>	<b><i>A. latus</i></b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>M. organophilum</i></b>
<b>Desempenho da cultura</b>					
Tempo de cultura (h)	18	20	41	49	70
Concentração celular (g.L <sup>-1</sup> )	143	111,7	112	204,3	250
Concentração de P(3HB) (g.L <sup>-1</sup> )	71,4	98,7	81	157,1	130
Conteúdo de P(3HB) (%)	50	88	72,3	77	52
Produtividade de P(3HB) gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	3,97	4,94	1,98	3,2	1,86
Fator de conversão (gP(3HB)/gcarbono)	0,17	0,42	0,29	0,27	0,19
<b>Avaliação econômica</b>					
Custo do capital fixo direto	1,42	0,73	1,31	1,00	1,57
Custo da mão-de-obra	0,20	0,12	0,21	0,16	0,23
Administração	0,09	0,05	0,09	0,08	0,11
Custo da matéria-prima	4,94	1,26	2,99	2,97	3,31
Equipamentos	0,49	0,29	0,42	0,36	0,46
Tratamento/remoção de resíduos	1,13	0,15	0,35	0,34	1,01
Custo total de produção (US\$ Kg <sup>-1</sup> P(3HB))	8,30	2,60	5,37	4,91	6,69

a- uma elevada concentração de inóculo (13,70 g de células secas.L<sup>-1</sup>) foi usado.

### 2.11.2 CONTEÚDO DE PHA'S EM CÉLULAS

Choi e Lee (1999a) consideraram que o conteúdo de PHA afetava a eficiência do processo de recuperação e também o fator de conversão de substrato em PHA. O grau de pureza e o rendimento de PHA recuperado é fortemente dependente de seu conteúdo na biomassa. A recuperação de biopolímero da célula é facilitada por um conteúdo elevado de PHA.

Estes autores consideraram a influência do conteúdo de PHA sobre o fator de conversão de substrato em polímero comparando duas culturas em batelada alimentada de *A. latus*. Para a cultura batelada alimentada de *A. latus* na qual se obteve um conteúdo de P(3HB) de 50%, o fator de conversão de substrato em P(3HB) foi de apenas 0,17 gP(3HB)/gsacarose (Yamane et al., 1996). No entanto, quando o conteúdo de P(3HB) aumentou para 88% da biomassa seca total,

aplicando limitação em nitrogênio, o fator de conversão foi de 0,42 gP(3HB)/gsacarose (Wang e Lee, 1997a). A análise econômica destes processos demonstraram que o custo de recuperação decresceu com o aumento do conteúdo de P(3HB). O conteúdo de P(3HB) de 50% resultou em um custo de recuperação de US\$4,80 Kg<sup>-1</sup> de P(3HB), enquanto que, para o processo que obteve um conteúdo de 88% de P(3HB) o custo foi de US\$ 0,92 Kg<sup>-1</sup> de P(3HB) (Lee e Choi, 1998). Comparando os dois processos, percebeu-se que o menor conteúdo de P(3HB) resultou em um maior custo de recuperação devido, principalmente, ao uso de grandes quantidades de agentes químicos para separar o P(3HB) e ao aumento no custo do tratamento dos resíduos. O custo dos equipamentos também aumentou com um menor conteúdo de PHA porque uma grande quantidade de células passa a ser necessária para obter a mesma quantidade de PHA.

### **2.11.3 CUSTO DA FONTE DE CARBONO**

O custo da fonte de carbono contribui significativamente para o custo de produção global de PHA (Yamane 1992, 1993). Choi e Lee (1999b) verificaram que, para um processo usando *E. coli* recombinante com uma concentração de P(3HB) de 157 g.L<sup>-1</sup>, obteve-se um conteúdo de 77% de P(3HB) e uma produtividade de 3,2 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> de P(3HB). O custo da fonte de carbono representava algo em torno de 38% do custo total de produção para uma escala de produção assumida de 100.000 ton/ano.

O uso de fontes de carbono de baixo custo pode reduzir o custo de produção de P(3HB). Se amido de milho (US\$ 0,22 Kg<sup>-1</sup>) for usado no lugar de glicose (US\$ 0,51 Kg<sup>-1</sup>) para a produção de P(3HB) por *E. coli* recombinante, sem modificar as condições de processo, o custo de produção de P(3HB) decrescerá de US\$ 4,91 Kg<sup>-1</sup> para US\$ 3,72 Kg<sup>-1</sup> (Choi e Lee, 1999a).

A Tabela 2.7 apresenta o custo das fontes de carbono com base nos fatores de conversão teóricos (Lee, 1996a).

Tabela 2.7 Efeito do custo do substrato e do fator de conversão em polímero sobre o custo de produção de P(3HB) (apresentado por Lee 1996a).

Substrato	Preço aproximado {US\$ Kg <sup>-1</sup> }	Fator de conversão em P(3HB) [(gP(3HB) (gsubstrato) <sup>-1</sup> ]	Custo do substrato {US\$ [(Kg P(3HB)) <sup>-1</sup> ]
Glicose	0,493 <sup>a</sup> (0,220 <sup>c</sup> )	0,38 <sup>b</sup>	1,30 (0,58)
Sacarose	0,290 <sup>d</sup>	0,40	0,72
Metanol	0,180 <sup>e</sup>	0,43	0,42
Acetato	0,595 <sup>e</sup>	0,38	1,56
Etanol	0,502 <sup>a</sup>	0,50	1,00
Melaço de cana	0,220 <sup>a</sup>	0,42	0,52
Soro de queijo	0,071 <sup>a</sup>	0,33	0,22
Hemicelulose hid.	0,069 <sup>a</sup>	0,20	0,34

a- Dado obtido de Hocking e Marchessault (1994)

b- Calculado multiplicando o fator de conversão teórico por 0,80 (assumindo 80% de polímero acumulado) (Yamane 1992, 1993).

c- Estimado do valor do amido de milho hidrolisado.

d- Preço de mercado internacional do açúcar bruto.

e- Preço internacional obtido do Chemical Journal (Korea).

#### 2.11.4 INFLUÊNCIA DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO

Fornecer oxigênio suficiente para manter as condições aeróbias adequadas pode ser potencialmente oneroso (van Weger et al., 1998). Quando PHA é produzido em culturas de alta concentração celular, o oxigênio dissolvido freqüentemente atua como um fator limitante (Lee, 1996c). A prevenção da limitação do oxigênio geralmente requer um vaso pressurizado, elevada energia de mistura, elevadas vazões de gás e alimentação de ar enriquecido com oxigênio (Choi e Lee, 1999a).

Neste caso, é interessante também pesquisar cepas capazes de obter uma elevada produção de PHA sob limitação em oxigênio. Wang e Lee (1997b) trabalhando sob limitação em oxigênio (1-3% de ar saturado) para culturas batelada alimentada de *E. coli* recombinante, conseguiram uma elevada concentração de P(3HB) que foi de 157,1 g.L<sup>-1</sup> com um conteúdo de 77% de P(3HB) e uma produtividade de 3,2 gP(3HB)L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, o que é considerado bastante alto.

### 2.11.5 MÉTODOS DE RECUPERAÇÃO

Em um processo de recuperação, os grânulos de PHA não devem conter muitos contaminantes (Steinbüchel et al., 1995). PHA altamente puro deve ser obtido pelo processo de quebra da célula e solubilização do material celular outros que não o PHA's. Assim sendo, os métodos de digestão simples através de produtos químicos de baixo custo são os mais eficientes e econômicos para a recuperação de PHA's. Tais métodos são especialmente eficientes na recuperação de PHA's em células com elevado conteúdo de biopolímero e são aplicados na obtenção de PHA's altamente puro de várias bactérias (Choi e Lee 1999b). Quando *Azotobacter vinelandii* UWD foi cultivada em um meio suplementado com peptona de peixe, as células tornaram-se frágeis. Um tratamento simples com  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 M durante 10 minutos resultou em uma pureza de 94% (Page, 1992).

Choi e Lee (1999b) recuperaram P(3HB) de células de *E. coli* recombinante com uma pureza de 98,5% usando no processo uma solução de  $\text{NaOH}$  2 M por um período de duas horas. Este método permitiu uma redução de 25% nos custos de produção quando comparado ao método de digestão por surfactante-hipoclorito. A redução no custo de produção encontra-se, principalmente, na redução do custo de tratamento de resíduos que, segundo o trabalho, reduziu de US\$ 0,34  $\text{Kg}^{-1}$  para US\$ 0,02  $\text{Kg}^{-1}$  usando o tratamento alcalino.

Choi e Lee (1999b) compararam processos para a produção de P(3HB-co-3HV) por *E. coli* recombinante com outros processos nos quais microrganismos selvagens foram utilizados. Para a produção de 1000  $\text{m}^3$ . ton/ano com 14,3 % mol de 3HV por *R. eutropha* custaria \$9,75/Kg quando digestão com hipoclorito fosse utilizado como método de recuperação. Para o mesmo processo com *E. coli*, a produção deste polímero com 10,6% mol de 3HV reduziria o custo para \$5,05 kg com o mesmo método de recuperação. Se utilizada a digestão simples com  $\text{NaOH}$ , o custo seria de apenas \$3,95 Kg.

Apesar disto, Ramsay (1994b) bem como Byrom (1987) citam que o método empregado industrialmente para a recuperação de PHA's é o enzimático. Esta extração é mais atrativa economicamente pois a recuperação é mais eficiente.

## ***CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS***



## **CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS**

Neste capítulo são apresentadas as descrições dos equipamentos e metodologias utilizadas para execução dos experimentos realizados. As técnicas analíticas adotadas para as determinações das concentrações celulares, do consumo de substrato e produção, recuperação e caracterização de P(3HB-co-3HV), bem como os procedimentos experimentais adotados também estão descritas.

### **3.1 EXPERIMENTOS REALIZADOS**

A condução dos experimentos foi realizada em 5 etapas, descritas a seguir.

**1ª etapa:** testes em frascos agitados buscando a melhor velocidade específica máxima de crescimento celular, utilizando-se duas temperaturas diferentes (30° e 34°C), duas fontes de nitrogênio (milhocina e sulfato de amônia) e cinco fontes de carbono (frutose, glicose, açúcar invertido, galactose e lactose hidrolisada e misturas destes). O uso de soro de leite como substrato de baixo custo também foi estudado;

**2ª etapa:** cultivos de *Ralstonia eutropha* cepa DSM 545 estudando-se duas estratégias de limitação do nutriente fósforo (alimentação e carência) na fase de produção;

**3ª etapa:** culturas em batelada alimentada aplicando três formas diferentes de alimentação de ácido propiônico na fase de produção: por regulação de pH, pulsos e alimentação contínua. Dois substratos foram testados: açúcar invertido e soro de leite;

**4ª etapa:** culturas em batelada alimentada com suplementação de ácido oleico para estimular a incorporação de unidades de 3HV na molécula do polímero;

**5ª etapa:** Recuperação e caracterização do polímero

## **3.2 MICRORGANISMO**

A linhagem de microrganismo utilizada é a *Ralstonia eutropha* DSM 545 devido à sua capacidade de utilizar glicose como fonte de carbono (mutante espontâneo).

A cepa de *R. eutropha* é mantida em um meio ágar nutriente sólido (NA) sob refrigeração. A composição deste meio é de 5,0 g.L<sup>-1</sup> de peptona de carne, 3,0 g.L<sup>-1</sup> de extrato de carne e 1,5% de ágar.

## **3.3 MEIOS DE CULTURA**

Dois meios de cultura líquidos são utilizados:

- ➔ meio NB, utilizado na primeira pré-cultura que possui a seguinte composição: peptona de carne, 5,0 g.L<sup>-1</sup>; extrato de carne 3,0 g.L<sup>-1</sup>.
- ➔ meio mineral (MM), utilizado na segunda pré-cultura e como meio final, é baseado em Ramsay et al.(1990a), baseado por Aragão (1996) cuja a composição é dada na Tabela 3.1.



Tabela 3.1: Composição do meio MM

		Solução Conc. (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Volume adic. (ml.L <sup>-1</sup> de meio)	Conc. no meio (g.L <sup>-1</sup> )
SOLUÇÃO 1	Ácido nitriloacético	19,1	10	0,19
	Citrato ferroso de amônia	10	6	0,06
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	50	10	0,5
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	5	2	0,01
	Solução de oligo-elementos <sup>b</sup>		1	(1mL.L <sup>-1</sup> )
	Água			
SOLUÇÃO 2	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	223,8	40	8,95
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	37,5	40	1,5
SOLUÇÃO 3	Fonte de carbono <sup>c</sup>			
SOLUÇÃO 4	Fonte de nitrogênio <sup>d</sup>			

<sup>a</sup> concentrações dadas por litro de meio

<sup>b</sup> a composição da solução concentrada de oligo-elementos é dada na Tabela 3.2

<sup>c</sup> a composição da fonte de carbono depende do estudo realizado

<sup>d</sup> a composição da fonte de nitrogênio depende do estudo realizado

O pH da solução 1 é ajustado a 7,0 com KOH 5M. As soluções 1, 2 e 3 são autoclavadas separadamente durante 20 minutos a 120°C e adicionadas assepticamente para compor o meio final.

Tabela 3.2: Composição da solução concentrada de oligo-elementos.

Elemento	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3 g.L <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2 g.L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g.L <sup>-1</sup>
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,03 g.L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,03 g.L <sup>-1</sup>
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02 g.L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,01 g.L <sup>-1</sup>

### 3.4 CULTURAS EM FRASCOS AGITADOS

Duas pré-culturas são necessárias para a cultura de *Ralstonia eutropha*. A primeira é realizada em um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 150 mL de meio NB inoculado com duas a três alçadas da cepa mantida em meio ágar. Esta pré-cultura é incubada durante 24 h à temperatura de 30 °C<sup>(1)</sup>, sob agitação de 150 rpm. Após este período um segundo frasco Erlenmeyer aletado de 500 mL contendo 150 mL de meio MM recebe uma quantidade correspondente a 10% de seu volume final de inóculo proveniente do meio NB. Este meio MM também é incubado durante 24 h à temperatura de 30 °C<sup>(1)</sup> e agitação de 150 rpm. A concentração e a fonte de carbono são dependentes do ensaio realizado.

Nas análises preliminares, a cultura final para o crescimento do microrganismo é feita em frasco erlenmeyer aletado de 1000 mL, contendo 300 mL de meio MM e incubada à temperatura de 30 °C<sup>(1)</sup>, sob agitação de 150 rpm. A inoculação é feita a 10% de seu volume a partir da pré-cultura anteriormente preparada em meio MM. Da mesma maneira, a fonte de carbono depende do ensaio a ser realizado.

A Figura 3.1 mostra o equipamento utilizado para as culturas em frascos agitados.



**Figura 3.1: Equipamento (*Shaker*) utilizado nas culturas de *Ralstonia eutropha* em frascos agitados**

(1) Alguns ensaios foram realizados a 34°C e estão indicados quando discutidos.

### **3.4.1 Preparo das soluções das fontes de carbono**

#### **3.4.1.1 Glicose, Frutose, Galactose e Açúcar Invertido**

Prepara-se uma solução concentrada ( $500 \text{ g.L}^{-1}$ ) do respectivo açúcar a ser adicionada nos frascos agitados para proporcionar uma concentração final no meio de cultivo de acordo com o experimento realizado.

#### **3.4.1.2 Lactose Hidrolisada**

Prepara-se uma solução de  $50 \text{ g.L}^{-1}$  e procede-se a hidrólise desta solução. A metodologia de hidrólise consiste em adicionar na solução 4 mL da enzima lactase (lactozim) por litro de solução e uma solução tampão (a base de fosfato e sódio) na solução e deixar em banho a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 1,5 h. Esta metodologia é indicada pela *Novo Nordisk S.A.*, empresa fornecedora da enzima. A concentração final de glicose na solução é determinada através do kit colorimétrico enzimático Biodiagnóstica. Esta solução hidrolisada será adicionada ao meio de cultivo e o volume deve proporcionar uma concentração final de acordo com o ensaio realizado.

#### **3.4.1.3 Soro de leite hidrolisado**

O soro de leite utilizado foi fornecido pela empresa *Do Vale S.A.* da região de Palhoça – SC. Este soro provém da manufatura de queijos e para a utilização como meio de cultivo, utiliza-se a técnica de ultrafiltração. O soro é ultrafiltrado a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , 3 bar e com uma velocidade tangencial de  $2 \text{ m.s}^{-1}$  e o permeado obtido é congelado para posterior hidrólise e utilização como meio de cultivo. A Figura 3.2 apresenta o esquema de ultrafiltração do soro de leite, obtendo o concentrado e o permeado, e a Tabela 3.3 apresenta a composição média do soro e dos produtos obtidos da ultrafiltração.

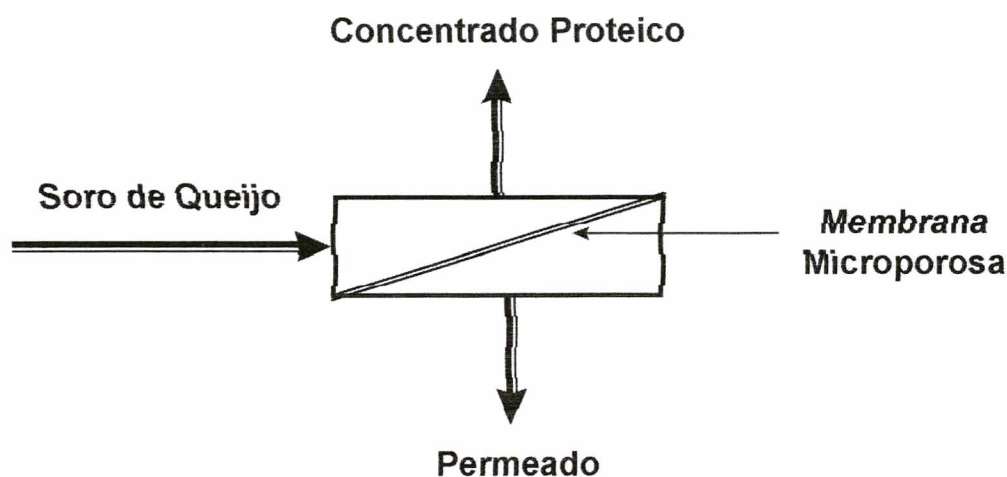


Figura 3.2: Esquema da obtenção do concentrado e do permeado, através da ultrafiltração do soro de queijos

Tabela 3.3: Composição média do soro e dos produtos obtidos através da ultrafiltração

<b>Principais Componentes</b>	<b>Soro de queijo</b>	<b>Concentrado</b>	<b>Permeado</b>
Água	93,00	90,00	94,00
Proteína	0,95	3,00	0,20
Gordura	0,40	1,60	0,00
Lactose	5,00	4,60	5,30
Sais Minerais	0,65	0,80	0,50
	100,00	100,00	100,00

Para a hidrólise do soro, segue-se a mesma metodologia adotada para a hidrólise da lactose com exceção da adição da solução tampão, desnecessária nesta hidrólise. A concentração final que se obtém é em torno de  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose pelo fato que não se hidrolisar soluções concentradas de soro.

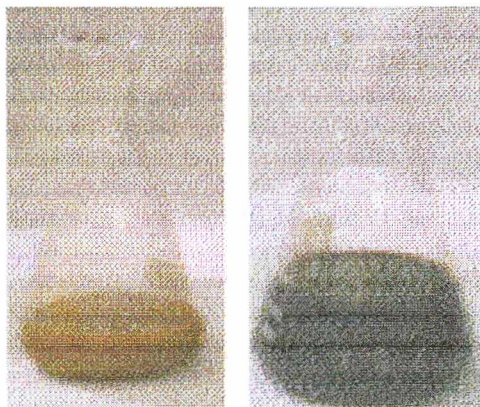
### 3.2.4.2 Preparo da Solução de Nitrogênio - Milhocina

A milhocina, água de maceração do milho, foi fornecida pela Refinações de Milho Brasil e necessita de um tratamento prévio à sua utilização.

Este resíduo é preparado seguindo-se os passos sugeridos por Hoch (1997) e adaptados de acordo com a capacidade dos equipamentos disponíveis. A seqüência utilizada consistem em:

- Centrifugação a 5000 rpm por 20 minutos;
- Elevação do pH do sobrenadante a 7.0 com NaOH 7M;
- Centrifugação a 5000 rpm por 20 minutos;
- Esterilização do sobrenadante;
- Centrifugação a 5000 rpm por 20 minutos;
- Esterilização do sobrenadante;
- Congelamento.

A concentração final de nitrogênio no meio deve ser a mesma que a utilizada com sulfato de amônia. De acordo com os dados fornecidos pela empresa, este resíduo contém  $64 \text{ g.L}^{-1}$  de nitrogênio. A Figura 3.3 mostra a milhocina em suas duas fases. Primeiramente sem o tratamento e depois do tratamento (aspecto mais escuro).



**Figura 3.3: Milhocina: Aspecto do resíduo antes (esquerda) e depois (direita) do tratamento necessário à sua utilização como fonte de nitrogênio.**

## 3.5 CULTURAS EM BIORREATOR

As culturas são realizadas em biorreator de 5 L (BIOFLO III, fabricado pela New Brunswick Scientific CO.). O fermentador, contendo a solução 1 do meio MM (item 3.2.3), é autoclavado durante 20 minutos a 120 °C. O volume de trabalho é de 4 L com 10% de seu volume de inóculo. A Figura 3.4 ilustra o equipamento utilizado.



Figura 3.4: Biorreator utilizado para as culturas celulares

### 3.5.1 Preparo do meio de cultura

#### 3.5.1.1 Solução de açúcar invertido

Prepara-se uma solução concentrada ( $500 \text{ g.L}^{-1}$ ) de açúcar a ser adicionada ao biorreator para proporcionar uma concentração final de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  no meio de cultivo.

### **3.5.1.2 Solução de soro de leite hidrolisado**

Procede-se a mesma forma que o indicado no item 3.4.1.3 sendo o volume de hidrólise igual a 3L.

### **3.5.1.3 Solução de Fosfato**

A solução de fosfato é preparada de maneira a ocorrer a limitação deste nutriente em aproximadamente  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de concentração celular. Uma solução concentrada contendo  $223,8 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  e  $32,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  é adicionada ao meio para a obtenção de uma concentração final de fosfato de  $8,95 \text{ g.L}^{-1}$  e  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  respectivamente.

## **3.5.2 Preparo do Inóculo**

O meio de cultura do inóculo é o mesmo citado no item 3.3, acrescido da solução de açúcar de acordo com o ensaio. O volume de trabalho é de 400 mL em frasco de 1000 mL, a temperatura de operação é de  $30^\circ\text{C}$ , a agitação 150 rpm e o tempo de cultura é determinado através da concentração celular. Quando esta atinge um valor de aproximadamente  $5 \text{ g.L}^{-1}$  segue-se a inoculação do meio de cultura. No Anexo I encontra-se uma curva padrão de calibração utilizada para o cálculo da concentração.

## **3.5.3 Condições de Operação**

A temperatura para o desenvolvimento da cultura é mantida constante a  $30^\circ\text{C}$  e o pH ajustado automaticamente a 7,0. Em todos os ensaios  $\text{NH}_4\text{OH}$  5% foi utilizado para corrigir pH ácidos e, segundo a necessidade do estudo,  $\text{HCl}$  1M ou ácido propiônico 4M foram utilizados para corrigir pH básicos.

As condições iniciais de agitação e aeração são de 400 rpm e 0,04 vvm, respectivamente, e atingiram, gradualmente, 780 rpm e 1 vvm. O polipropilenoglicol é utilizado como antiespumante.

### 3.5.4 Estratégias de Alimentação

Todas as estratégias de alimentação descritas são realizadas a partir do início da fase de produção de P(3HB-co-3HV). A fase de produção é caracterizada a partir da análise de fosfato, conforme será descrito no item 3.6.3.4.

#### 3.5.4.1 Alimentação em Fosfato

Nos ensaios em que se realiza a alimentação em fosfato, uma solução de 2,61 g.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O e 0,44 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> é preparada para proporcionar uma concentração no meio de 0,15 g.L<sup>-1</sup> e 0,025 g.L<sup>-1</sup> de fosfato, respectivamente. A vazão é correspondente a 23 ml.h<sup>-1</sup>.

#### 3.5.4.2 Alimentação em Açúcar invertido

Açúcar invertido é alimentado sempre que sua concentração decresce a aproximadamente 10 g.L<sup>-1</sup>. Este valor é monitorado através do método de DNS, como será descrito no item 3.6.3.1. A alimentação deve ser realizada de forma a proporcionar uma concentração final de 30 g.L<sup>-1</sup> de açúcar invertido.

#### 3.5.4.3 Alimentação em ácido propiônico

Três formas de alimentação em ácido propiônico são utilizadas de acordo com o ensaio realizado: regulação de pH, pulsos e alimentação contínua.

A alimentação através de **regulação de pH** é realizada através de uma solução 4M do ácido. Inicialmente introduz-se no meio um pulso inicial de 10 mL de propionato de potássio com uma concentração de 454,5 g.L<sup>-1</sup>. A medida que este é consumido o pH do meio se eleva conforme é explanado no item 3.4.1. O ácido propiônico é então introduzido no meio sempre que o pH aumenta.

A alimentação através de **pulsos** é conduzida a partir de pulsos de 10 mL de propionato de potássio 454,5 g.L<sup>-1</sup>, seguidos de pulsos de 5 mL de ácido propiônico 4M intercalados em 1,5 horas.



A **alimentação contínua** de ácido propiônico é realizada a uma vazão de  $15 \text{ ml.h}^{-1}$ , a partir de uma solução  $80 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido.

#### **3.5.4.4 Alimentação em ácido oleico**

Adiciona-se ao meio um volume de 1 mL de ácido oleico (P.A.) previamente esterilizado obtendo-se uma concentração final no meio de  $0.25 \text{ g.L}^{-1}$ .

## **3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **3.6.1 Amostragem**

A amostragem nos ensaios em frascos agitados é realizada de hora em hora até 8 horas de cultura seguido de intervalos de 2 horas. O volume de amostra retirado é de 2 mL para leitura em espectrofotômetro e de 8 mL para determinação da concentração celular por gravimetria em três tempos: 0 h, 5 h e 12 h.

Nos ensaios em biorreator, descartam-se inicialmente 10 mL, e amostras, de 20 mL são retiradas em intervalos de 2 horas até a oitava hora, seguidas de tomadas de amostras a cada 1,5h até o fim da cultura.

As amostras são congeladas em duplicata a  $-20^{\circ}\text{C}$ , depois de devidamente preparadas para posterior análise. Duplicatas são guardadas para possíveis realizações de análises novamente. A Figura 3.5 apresenta um diagrama sequenciando os passos de amostragem.

### **3.6.2 Determinação da Concentração da Biomassa**

A concentração celular é determinada por dois métodos: por espectrometria (durante a cultura) e por gravimetria.

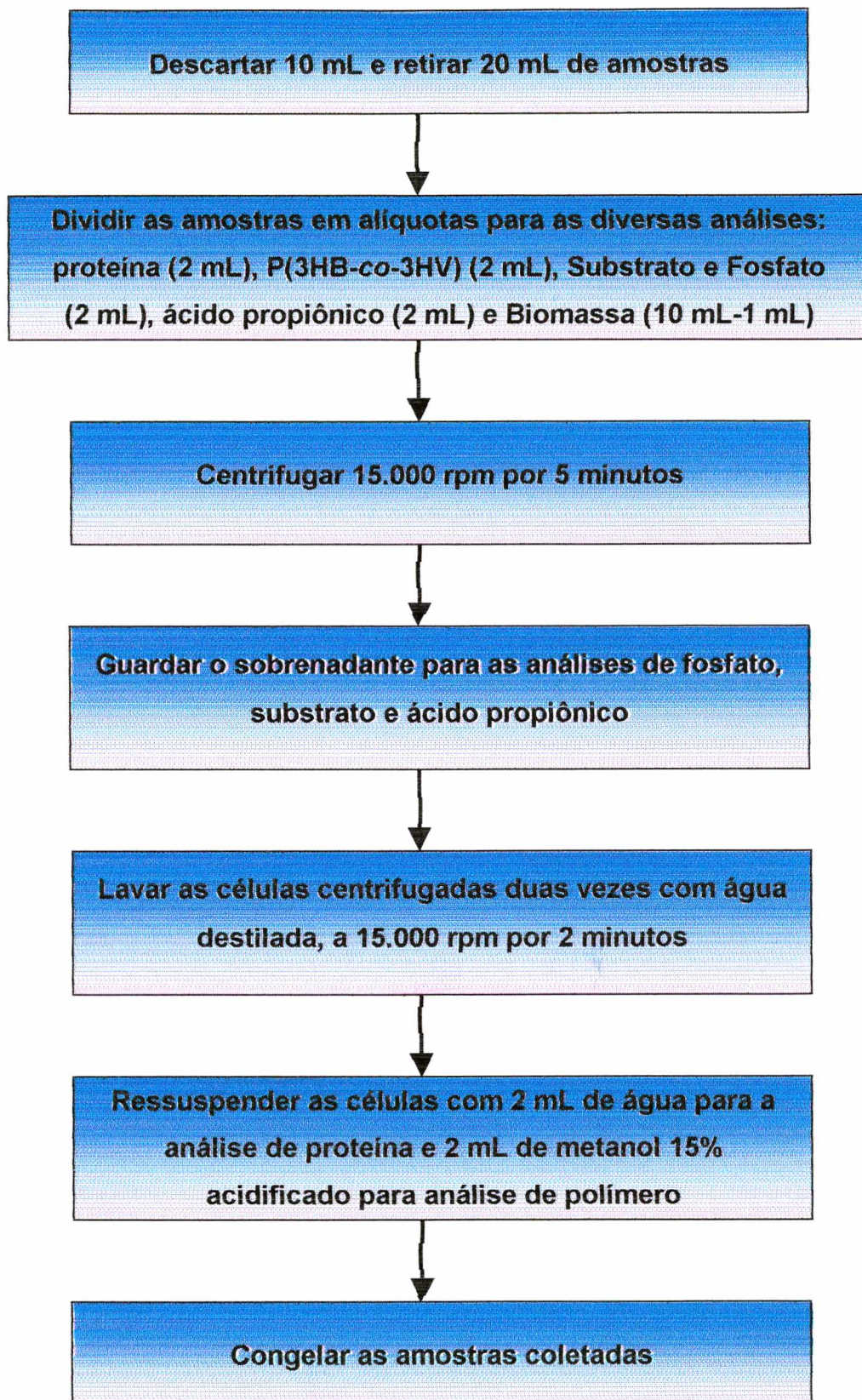


Figura 3.5 Diagrama esquemático da seqüência de amostragem

### **3.6.2.1 Medida por espectrometria**

A concentração de biomassa do material coletado é avaliada em um espectrofotômetro (modelo E225-D, marca CELM) medindo-se a absorbância a 600 nm. Para manter uma precisão adequada (região linear), a faixa de absorbância utilizada é de 0,000 até 0,800. A partir deste valor são feitas diluições para manter a linearidade.

### **3.6.2.2 Gravimetria**

A concentração celular é obtida por gravimetria a partir de um volume conhecido de cultura compreendido entre 1 e 10 mL, filtrado através de membranas Millipore de poliamida pré-pesadas (poro de 0,2  $\mu\text{m}$ ). O filtrado é lavado duas vezes com HCl 0,01M, para remover íons e sais presentes na biomassa, seguido de secagem em estufa a 90°C por 24 h. A existência de uma relação linear entre a biomassa e a absorbância a 600 nm, na fase de acúmulo celular, permite construir uma curva de calibração de biomassa em função da absorbância que serve para estimar a concentração de células durante a fase de crescimento da cultura (Anexo I – Figura A1).

## **3.6.3 Dosagem de Substratos**

### **3.6.3.1 Açúcar Invertido e Soro de leite hidrolisado**

A dosagem de açúcar invertido é feita pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (Miller,1959), que determina a concentração de açúcares redutores. O reativo é preparado da seguinte forma:

- 300 g tartarato duplo de sódio e potássio e 16 g de NaOH dissolvido em água destilada.
- Adicionar aos poucos 10 g de ácido dinitrosalicílico (aquecer se necessário).
- Completar volume a 1 litro de água destilada.

A metodologia de análise é a seguinte: um volume de 200  $\mu\text{l}$  de sobrenadante, previamente diluído, é adicionado a 200  $\mu\text{l}$  de reativo DNS e depois colocado em ebulição, durante 5 minutos, em banho-maria. Após o resfriamento em banho de gelo, adiciona-se 2 mL de água destilada. Um tempo de 15 minutos é necessário para que a amostra se estabilize à temperatura ambiente. A leitura espectrofotométrica é realizada a 540 nm contra um branco de água destilada. A escala é compreendida entre 0 e 2  $\text{g.L}^{-1}$  de glicose. A curva de calibração expressa a concentração de glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) vs. absorvância (540nm). O Anexo I apresenta um exemplo de curva padrão (Anexo I – Figura A2).

### 3.6.3.2 Proteínas

Amostras do meio de cultura compreendidas entre 2 e 4 mL são centrifugadas a 15.000 rpm por 5 minutos e o precipitado é lavado duas vezes com água destilada e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise pelo método de Biureto (Stickland, 1951). O precipitado é ressuspenso em 5,5 mL de água destilada e a lise celular é provocada por adição de 1mL de NaOH 20% (p/v) e incubação em banho-maria a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Após resfriamento, 170  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuSO}_4$  25% (p/v) são adicionados, e deixam-se em repouso por mais 5 minutos. O sobrenadante obtido, após centrifugação a 5000 rpm durante 10 minutos, é analisado por espectrofotometria em um comprimento de onda de 560 nm. A concentração em  $\text{g.L}^{-1}$  é obtida através de uma curva de calibração de proteína ( $\text{g.L}^{-1}$ ) vs absorvância (560nm), utilizando albumina bovina (BSA) entre 0 e 3 $\text{g.L}^{-1}$  como padrão conforme ilustrado no Anexo I (Figura A3).

### 3.6.3.3 Dosagem de Fosfato

Para a dosagem do fosfato é utilizado um kit colorimétrico (Fosfato Dolles). Os reagentes utilizados são os seguintes:

- *Solução Padrão*: solução aquosa contendo 5  $\text{mg.dL}^{-1}$  de fósforo;
- *Ácido Ascórbico*: frasco contendo 2 g de ácido ascórbico. Após reconstituição, tem-se uma solução 0,084 M de ácido ascórbico.

- *Reagente Molibdato*: solução 0,018 M de molibdato de amônio em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 M.
- *Solução alcalina*: solução 16 M de monoetanolamina.

Identificam-se 3 tubos de ensaio com B (branco), T (teste) e P (padrão) e procede-se conforme a seqüência apresentada na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Seqüência para a dosagem de fosfato.

	<b>Branco</b>	<b>Teste</b>	<b>Padrão</b>
Ácido Ascórbico	3 mL	3 mL	3 mL
Amostra	-	100 µL	-
Solução padrão	-	-	100 µL
Reagente Molibdato	1 mL	1 mL	1 mL
<i>As proteínas se precipitam. Deixar repousar durante 1 minuto</i>			
Solução alcalina	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL

Agita-se e deixa-se repousar por 2 minutos. Lêem-se as absorvâncias de teste e padrão, ajustando-se o zero com o branco, em espectrofotômetro em 660nm.

A concentração de fosfato é calculada em g.L<sup>-1</sup> de acordo com a equação 3.1, onde abs é a absorvância lida.

$$\text{fosfato} = \frac{\text{abs teste}}{\text{abs padrão}} \times 0,05(\text{g/L}) \quad (\text{Eq.3.1})$$

### 3.6.3.4 Dosagem de Ácido Propiônico

A dosagem deste substrato é realizada de acordo com a metodologia proposta por Anderson e Madden (1998) que consiste na extração do ácido seguida por análise cromatográfica. Os passos para a extração são os seguintes:

- 1mL de sobrenadante é misturado com 1 mL de ácido butírico 0.01% (v/v) e 1mL de éter;
- Agita-se vigorosamente;

⇒ Centrifuga-se a 1000g durante 5 minutos.

A análise cromatográfica é realizada exatamente nas mesmas condições que as aplicadas para a dosagem de P(3HB-co-3HV), conforme descrito no item 3.3.3.3. O Anexo I apresenta um exemplo da curva de calibração (Figura A4).

### **3.6.4 Dosagem de P(3HB-co-3HV)**

O P(3HB-co-3HV) é dosado por cromatografia gasosa conforme o método de metanólise baseado em Braunegg et al. (1978), com as modificações propostas por Brandl et al. (1988).

As amostras, com volume conhecido de meio de cultura, são centrifugadas a 15.000 rpm por 5 minutos. O precipitado é lavado duas vezes com água destilada e a última ressuspensão é realizada em 2 mL de metanol acidificado ( $H_2SO_4$  15%), contendo ácido benzóico  $0,4 \text{ g.L}^{-1}$  como padrão interno. A amostra é então congelada a  $-20^\circ\text{C}$  para posterior análise. Após descongelamento, um volume de 2 mL de clorofórmio é adicionado e a mistura aquecida a  $100^\circ\text{C}$  durante 140 minutos. Depois de 1 hora de aquecimento, a mistura é agitada durante alguns segundos e devolvida ao aquecimento. Após resfriamento à temperatura ambiente, adiciona-se 1 mL de água destilada e as amostras são agitadas durante 30 segundos, seguido de decantação. A fase orgânica (inferior) é retirada com uma seringa e guarda-se em geladeira para posterior análise em cromatografia gasosa. A curva padrão (Anexo I – Figura A5) é feita utilizando-se o poli-3-hidroxitirato-co-3-hidroxitrato (Sigma), como padrão externo, com massa variando entre 0,0010 g e 0,010 g. Submetem-se os padrões à mesma metanólise que as amostras. A coluna utilizada para dosagem do P(3HB) é de sílica fundida ( $\varnothing 0,53\text{mm} \times 30\text{m}$ ) modelo Supercowax-10. O cromatógrafo é um CG-90 equipado com um detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio). O gás de arraste utilizado é o nitrogênio a 20 mL/min e as temperaturas de injeção, detecção e coluna são respectivamente de  $185^\circ\text{C}$ ,  $230^\circ\text{C}$  e  $110^\circ\text{C}$ . O volume injetado é de 1  $\mu\text{L}$ . A integração e os cromatogramas (Anexo I – Figura A6) foram obtidos através de uma placa interface AD/DA-MICROQUÍMICA.

## **3.7 TRATAMENTO DE DADOS**

### **3.7.1 Ajuste dos Dados Experimentais**

Os dados experimentais obtidos são ajustados pelo programa Lissage, desenvolvido pelo laboratório do “Institut National des Sciences Appliquees de Toulouse” França, por Ardaillon-Simoes, Arroyo, Uribebarrea.

### **3.7. Análise Cinética**

Como o acúmulo de P(3HB-co-3HV) é intracelular, as taxas específicas de crescimento celular e de produção de P(3HB-co-3HV) devem ser calculadas em relação à biomassa residual ( $X_r$ ), obtida pela diferença entre a quantidade de biomassa total ( $X_t$ ) e a quantidade de P(3HB-co-3HV) ( $X_r = X_t - P(3HB-co-3HV)$ ).

#### **3.7.2.1 Velocidades Específicas de Crescimento**

As velocidades específicas máximas de crescimento na fase de crescimento não limitado são calculadas a partir do coeficiente angular da curva linearizada pelo logaritmo neperiano da biomassa residual com o tempo de acordo com a equação 3.2.

$$\ln(X_r) = \ln(X_{r_0}) + \mu t \quad \text{Eq. 3.2}$$

Onde:

$X_r$  = biomassa residual (g)

$X_{r_0}$  = biomassa residual inicial (g)

$\mu$  = velocidade específica máxima de crescimento celular ( $h^{-1}$ )

$t$  = tempo (h)

#### **3.7.2.2 Velocidade Específica de Produção de P(3HB-co-3HV)**

A velocidade específica de produção de P(3HB-co-3HV), ou de 3-hidroxicaprolato são calculadas através da relação entre a derivada das curvas ajustadas de produção de polímero dividido pela biomassa residual no programa Lissage.

### 3.7.3 Fatores de Conversão

O fator de conversão é obtido a partir do coeficiente angular da porção linear do gráfico da quantidade analisada (biomassa, biomassa residual ou P(3HB-co-3HV)) contra a quantidade de substrato de acordo com a equação 3.3.

$$Y_{Q/S} = -\frac{dQ}{dS} \quad \text{Eq. 3.3}$$

Onde:

$Y_{Q/S}$  = fator de conversão de substrato S no componente Q ( $\text{g.g}^{-1}$ ).

Q = componente que pode representar a biomassa, biomassa residual ou P(3HB-co-3HV) (g).

S = substrato utilizado (g).

### 3.7.4 Produtividade Média de P(3HB-co-3HV)

A produtividade média, ilustrada na equação 3.4, é calculada pela diferença entre a concentração de P(3HB-co-3HV) em um instante de tempo t e a concentração inicial de P(3HB-co-3HV) dividida pelo intervalo de tempo correspondente.

$$P_r = \frac{P(3HB-co-3HV)_t - P(3HB-co-3HV)_{t_0}}{t - t_0} \quad \text{Eq. 3.4}$$

Onde:

$P_r$  = produtividade média de P(3HB-co-3HV) ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ).



PHB<sub>t</sub> = quantidade de P(3HB-co-3HV) no instante de tempo t (g).

PHB<sub>t<sub>0</sub></sub> = quantidade de P(3HB-co-3HV) no tempo t<sub>0</sub> inicial (g).

### 3.7.5 Produtividade de P(3HB-co-3HV) na Fase de Produção

A produtividade na fase de produção, indicada na equação 3.5, é calculada pela diferença entre a quantidade de P(3HB-co-3HV) em um instante de tempo t após o início da fase de produção e a concentração de P(3HB-co-3HV) no início da fase de produção dividida pelo intervalo de tempo correspondente a estas concentrações.

$$P_p = \frac{P(3HB-co-3HV)_t - P(3HB-co-3HV)_{t_i}}{t - t_i} \quad \text{Eq. 3.5}$$

Onde:

$P_p$  = produtividade na fase de produção ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ).

$P(3HB-co-3HV)_t$  = concentração de P(3HB-co-3HV) no instante de tempo t após o início da fase de produção ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

$P(3HB-co-3HV)_{t_i}$  = concentração de P(3HB-co-3HV) no tempo t<sub>i</sub> inicial da fase de produção ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

## 3.8 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE P(3HB-co-3HV)

### 3.8.1 Extração de P(3HB-co-3HV)

A técnica utilizada para a recuperação intracelular de P(3HB-co-3HV) foi baseada em Lee (1996b), modificada de acordo com a limitação dos equipamentos disponíveis.

Primeiramente, as células são separadas do caldo fermentativo por floculação. O pH do meio é ajustado a 9,0 com NH<sub>4</sub>OH 5%, o meio é aquecido a

60°C e o pH é novamente ajustado a 4,0 com HCL 1M. Segue-se a uma centrifugação 4000 min<sup>-1</sup> durante 20 minutos. O precipitado é congelado para posterior recuperação do polímero. Esta recuperação é efetuada através das seguintes etapas:

- ▶▶▶ Tratamento das células com acetona (4:1) durante 20 minutos a 50 °C;
- ▶▶▶ Secagem das células em estufa por 2 horas a 60 °C;
- ▶▶▶ Refluxo das células misturadas em clorofórmio a 30°C por 48 horas;
- ▶▶▶ Filtração das células;
- ▶▶▶ Precipitação de P(3HB-co-3HV) em metanol e água (7:3).

### **3.8.2 Caracterização de P(3HB-co-3HV)**

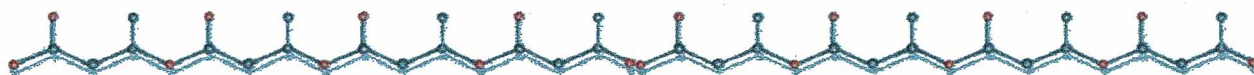
Para a análise térmica do polímero duas técnicas são empregadas: Calorimetria de varredura diferencial (DSC) e Termogravimetria (TGA).

A análise por DSC é realizada com nitrogênio a uma vazão 50 mL/min. A temperatura inicial é de 0°C, a final, 300°C e degraus de 10°C/min são utilizados.

A análise por TGA, da mesma forma é realizado com uma vazão de 50 mL/min de nitrogênio, a uma variação de 0°C a 400°C com 10°C/min.

As análises são realizadas pela Central de Análises Químicas da Universidade Federal de Santa Catarina e fornecem os dados de temperatura de fusão, de transição vítrea e de degradação.

## ***CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO***



## **CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos de acordo com os experimentos descritos no capítulo de Material e Métodos.

### **4.1 ESTUDOS PRELIMINARES**

O processo de produção de PHA's por *Ralstonia eutropha* é conduzido em duas fases distintas: **fase de crescimento** não limitado com produção de biomassa e **fase de produção** com acúmulo de polímero (Dawes e Senior, 1973). Se a primeira fase tiver uma produtividade em células alta, será rápida e, conseqüentemente, haverá uma melhoria na produtividade global do polímero. Portanto, é interessante utilizar condições de cultivo que proporcionem valores de velocidade de crescimento altos. Também, o uso de fontes que reduzam o custo final do polímero é interessante para torná-lo mais competitivo comercialmente. Neste sentido, foram estudados diferentes substratos (inclusive de baixo custo) e condições de cultivo que levassem a melhorar os valores de velocidade específica de crescimento celular na fase de crescimento e diminuíssem o custo de produção de PHA's. Os valores de velocidade específica de crescimento nesta seção foram calculados com base na biomassa total gerada.

### **4.1.1 Influência da fonte de carbono no crescimento de *R. eutropha***

A fonte de carbono é talvez o parâmetro que mais influencia o crescimento de um microrganismo. Tal fato levou a sucessivos estudos buscando se encontrar uma fonte de carbono que proporcione bom crescimento e tenha um custo reduzido (Lemos et al., 1997; Linko et al., 1993). Neste sentido, a comparação de várias fontes de crescimento se apresenta como uma forma de procurar uma alternativa de melhorar a produtividade na fase de crescimento e diminuir o custo final de produção.

Cinco fontes de carbono foram estudadas: glicose, frutose, galactose, lactose hidrolisada e açúcar invertido. Estes substratos foram oferecidos como única fonte de carbono disponível e também foi empregada a mistura destes. Testes foram realizados em frascos agitados, a 30 °C, por 12 horas. Estes ensaios foram conduzidos durante 12 horas (mesmo com concentrações de substrato ainda disponíveis ao fim do ensaio) pois este período consistiu aproximadamente na fase de crescimento obtido por Oliveira (1999) em estudos anteriores.

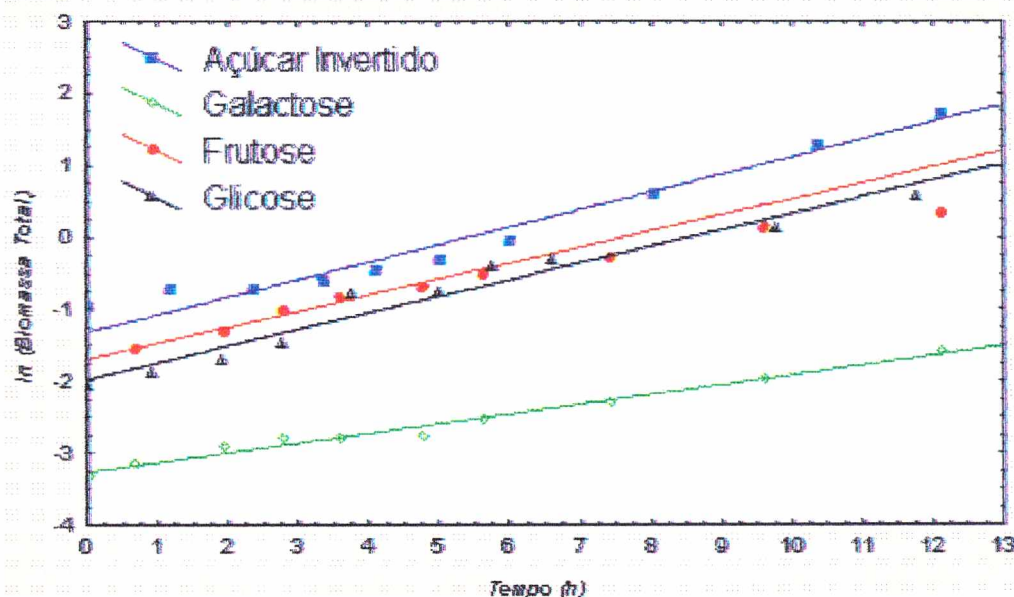
#### **4.1.1.1 Uso de diferentes fontes de carbono como único substrato disponível**

Primeiramente, cada uma das fontes de carbono foi utilizada com o único substrato disponível ao crescimento de *Ralstonia eutropha*. Cada um dos ensaios foi realizado em concentrações em torno de 20 g.L<sup>-1</sup>. Os gráficos ilustrando a evolução da concentração de biomassa obtida em função do tempo para cada ensaio são apresentados no Anexo II (Figura A6).

A Figura 4.1 ilustra o ln da biomassa total (representando a concentração celular) durante a cultura onde o açúcar invertido, galactose, frutose e glicose foram utilizados como substrato.

O valor de velocidade específica máxima de crescimento obtido em açúcar invertido ( $\mu_{\max} = 0,26 \text{ h}^{-1}$ ) é ligeiramente maior do que o obtido em glicose ( $\mu_{\max} = 0,23 \text{ h}^{-1}$ ). Isto sugere que este substrato pode potencialmente substituir a

glicose, uma vez que o valor de velocidade de crescimento é mais alto e o custo deste é menor comparado ao da glicose. O valor obtido para glicose ( $0,23 \text{ h}^{-1}$ ) é o mesmo relatado por Kim e Lee (1993). Cabe ressaltar que o açúcar invertido tem uma composição de 20% de sacarose, 40% de glicose e 40% de frutose (Copersucar – Dados não publicados).



**Figura 4.1: Evolução da concentração de biomassa durante a cultura com açúcar invertido, glicose, frutose ou galactose, oferecidos como única fonte de carbono disponível ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ).**

Foi obtido o crescimento da bactéria em galactose com velocidade específica máxima de crescimento igual a  $0,13 \text{ h}^{-1}$ . Este fato é interessante pois permite a utilização de ambos os açúcares resultantes do processo de hidrólise da lactose, mesmo que com velocidade específica mais baixa do que a glicose. O valor encontrado para a velocidade específica máxima de crescimento é equivalente ao relatado na literatura por Pries et al., 1990, que obtiveram crescimento em galactose utilizando *Ralstonia eutropha* modificada geneticamente com velocidade específica máxima de crescimento de  $0,13 \text{ h}^{-1}$ .

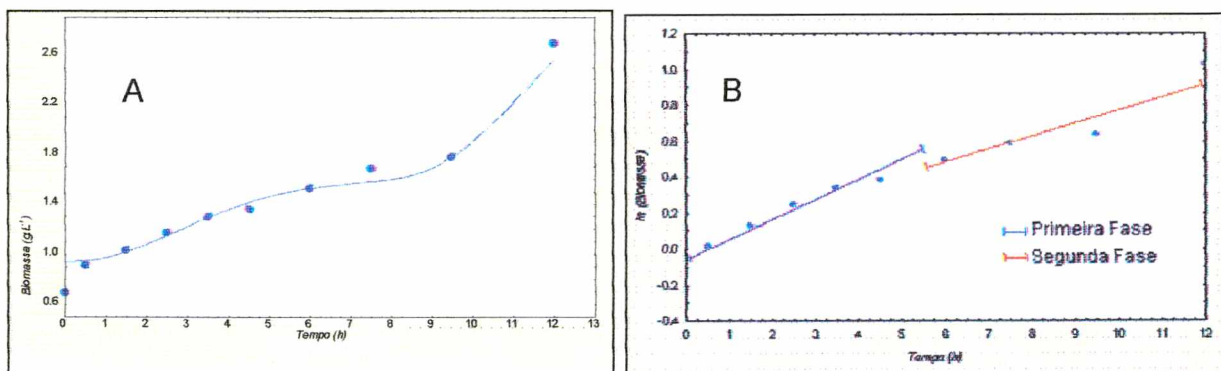
O crescimento em frutose apresentou uma velocidade específica de crescimento igual a  $0,21 \text{ h}^{-1}$ . Esperava-se que este substrato proporcionasse a mais alta velocidade de crescimento uma vez que em estudos realizados por Linko et al (1993), o crescimento em frutose proporcionou os melhores valores de concentração

de polímero e de crescimento microbiano, entre outros substratos, embora os autores não forneçam os valores de velocidade específica de crescimento. Por outro lado, estudos realizados por Luong et al. (1989) apresentaram  $0,17 \text{ h}^{-1}$  como valor de velocidade específica de crescimento.

*Ralstonia eutropha* não possui a capacidade de assimilação direta de lactose, portanto é necessária uma hidrólise prévia deste substrato, permitindo então a assimilação dos açúcares provenientes desta hidrólise (glicose e galactose) por parte da bactéria. Tal hidrólise pode ser realizada através de enzimas ou quimicamente, através de ácidos ou bases. Ambos os métodos foram testados.

Os testes realizados com hidrólise ácida apresentaram resultados insatisfatórios e muito abaixo do esperado, comparando-se com glicose. Acredita-se que este tipo de hidrólise provoque um acúmulo muito grande de sais no meio, pois necessita-se de muita base para ajustar o pH a 7.0 após a hidrólise, e com isso há uma alteração substancial na composição de sais do meio. Assim, todos os testes foram realizados com hidrólise enzimática conforme descrito no item 3.4.1.2

A Figura 4.2 ilustra o crescimento em lactose hidrolisada por enzima com uma concentração de açúcar em torno de  $25 \text{ g.L}^{-1}$  sendo  $12,5 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose e  $12,5 \text{ g.L}^{-1}$  de galactose. Nesta cultura são observadas duas fases distintas de crescimento, a primeira correspondente ao consumo de glicose e a segunda ao consumo de galactose.



**Figura 4.2: Evolução da concentração de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) ao longo da cultura de *Ralstonia eutropha* em 20g/l de lactose hidrolisada (A – concentração celular; B – logaritmo neperiano) em ensaios realizados em frascos agitados**

Observa-se na figura 4.2 (B) que a mudança de inclinação da velocidade específica máxima de crescimento ocorre em torno de 5 h, mesmo instante em que a curva (A) mostra uma desaceleração do crescimento. Para a análise deste comportamento deve-se considerar que o fator de conversão de glicose em biomassa por *Ralstonia eutropha* é  $0,5 \text{ g.g}^{-1}$  (Aragão, 1996) e que abaixo de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  existe limitação do crescimento (Oliveira, 1999). A análise dos dados do gráfico mostram que foi produzido  $0,53 \text{ g}$  de biomassa até aproximadamente 5 h. Considerando o fator de conversão, ter-se-ia consumido  $1,2 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, restando-se  $11,3 \text{ g.L}^{-1}$  no meio. Esta concentração está próxima do valor da concentração de limitação do crescimento (Oliveira, 1999), indicando que o microrganismo passa a consumir o outro substrato disponível (galactose).

Os valores da velocidade específica máxima de crescimento obtidos na primeira e na segunda fase foram respectivamente de  $0,20 \text{ h}^{-1}$  e  $0,11 \text{ h}^{-1}$ . Estes valores são muito próximos aos obtidos quando estes açúcares são consumidos como única fonte de carbono, confirmando o consumo inicial de glicose ( $\mu_{\text{max}} = 0,23 \text{ h}^{-1}$ ), seguido do consumo de galactose ( $\mu_{\text{max}} = 0,13 \text{ h}^{-1}$ ).

#### 4.1.1.2 Uso de Misturas de Substratos

Ensaio com misturas de substratos foram realizados com o objetivo de se estudar a possibilidade de existir um efeito potencializador da velocidade específica de crescimento do microrganismo pelo efeito sinérgico dos substratos. Foram utilizadas misturas de lactose hidrolisada, glicose, frutose e açúcar invertido. Duas séries de ensaios foram conduzidas: a primeira em concentrações de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  ( $7,5 \text{ g.L}^{-1}$  de cada um dos substratos) e a segunda com  $40 \text{ g.L}^{-1}$  ( $10 \text{ g.L}^{-1}$  de cada um dos substratos). Além destes, ensaios foram conduzidos com concentrações variando entre  $40 \text{ g.L}^{-1}$  e  $80 \text{ g.L}^{-1}$  buscando-se a possibilidade de melhores resultados quando os substratos estão associados. No anexo II (Figura A7) encontram-se as curvas que ilustram a evolução da biomassa produzida pelo tempo para os ensaios conduzidos com misturas de substratos.

A Figura 4.3 ilustra o crescimento de *Ralstonia eutropha* nos ensaios com concentrações iniciais de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  e  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de substrato. A velocidade específica máxima de crescimento obtida no ensaio com  $7,5 \text{ g.L}^{-1}$  de cada um dos substratos



(30 g.L<sup>-1</sup> total inicial) foi de 0,23 h<sup>-1</sup> enquanto que este valor foi de 0,17 h<sup>-1</sup> quando foi utilizado a 10 g.L<sup>-1</sup> de cada um dos substratos (40 g.L<sup>-1</sup> total inicial). O  $\mu_{max}$  mais elevado obtido (0,23 h<sup>-1</sup>) foi próximo ao obtido com glicose e açúcar invertido, mostrando que não ocorre efeito sinérgico entre estes substratos quando associados durante o crescimento.

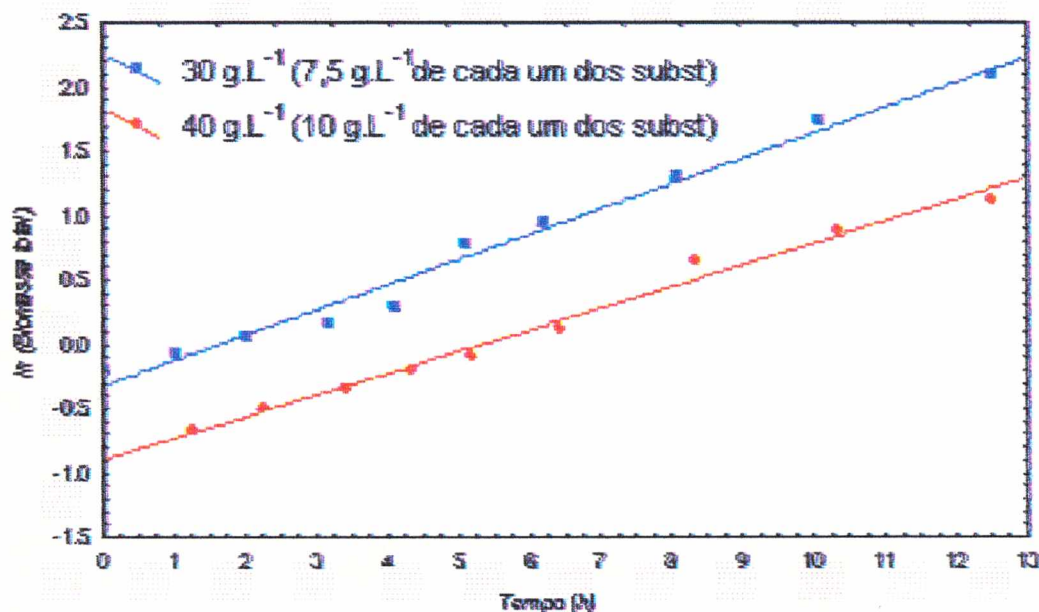
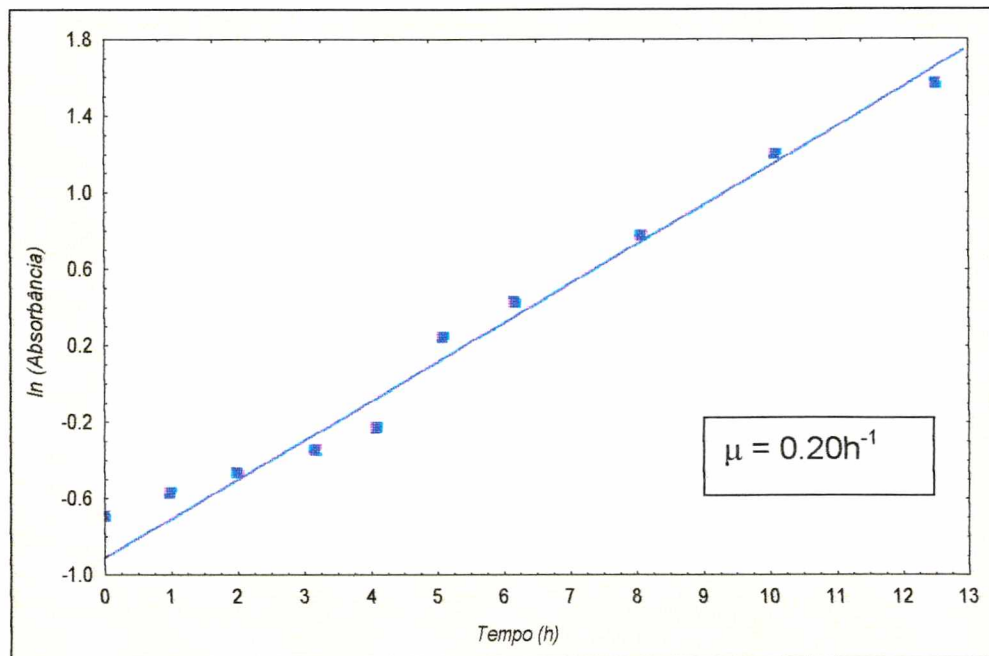


Figura 4.3: Concentração de *Ralstonia eutropha* durante as culturas realizadas com mistura de lactose hidrolisada, glicose, frutose e açúcar invertido

Como o melhor valor de  $\mu_{max}$  obtido foi quando açúcar invertido foi utilizado como fonte de carbono, estudou-se a mistura de glicose e frutose, em iguais proporções, comparando-se assim com o ensaio realizado com açúcar invertido. A Figura 4.4 ilustra este ensaio. O valor da velocidade específica obtida foi 0,20 h<sup>-1</sup>, menor que o obtido com açúcar invertido (0,26 h<sup>-1</sup>), o que leva à hipótese de existir um efeito potencializador do crescimento quando glicose e frutose compõem o açúcar invertido, que pode ser devido à composição do último.



**Figura 4.4: Crescimento celular de *Ralstonia eutropha* durante a cultura realizada com em 40 g.L<sup>-1</sup> de substrato: glicose (50%) e frutose (50%)**

Outros ensaios com novas misturas de substratos e em diferentes concentrações foram realizados. A Tabela 4.1 resume os dados apresentados para as diversas fontes de carbono estudadas.

Os resultados expostos na Tabela 4.1 indicam que açúcar invertido apresentou o melhor valor de velocidade específica de crescimento quando utilizado como única fonte de carbono. Quando este substrato foi utilizado com frutose, a velocidade específica de crescimento alcançou um valor próximo ao obtido com açúcar invertido como fonte única de carbono. O mesmo comportamento não foi observado quando a combinação foi açúcar invertido e glicose.

Em quase todos os ensaios nos quais a lactose esteve presente foram observadas duas fases de crescimento, com comportamento muito similar ao anteriormente discutido para a lactose hidrolisada, ou seja,  $\mu_{\max}$  correspondente ao consumo de glicose na primeira fase, seguido de um  $\mu_{\max}$  correspondente ao consumo de galactose. Quando lactose esteve presente associada a outros substratos em ensaios cujas concentrações totais iniciais foram de 60 g.L<sup>-1</sup> e 80 g.L<sup>-1</sup>, não foram observadas duas fases de crescimento e atribuiu-se este fato à alta concentração de substrato disponível ao consumo, anteriormente a galactose.

Tabela 4.1 Valores de  $\mu_{max}$  obtidos para diferentes associações de fontes de carbono.

<b>Fonte de Carbono Utilizada</b>	<b>Concentração Inicial (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>\mu</math> na 1<sup>a</sup> fase (h<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>\mu</math> na 2<sup>a</sup> fase (h<sup>-1</sup>)</b>
Açúcar Invertido	20 g.L <sup>-1</sup>	0,26 h <sup>-1</sup>	-----
Glicose	20 g.L <sup>-1</sup>	0,23 h <sup>-1</sup>	-----
Frutose	20 g.L <sup>-1</sup>	0,21 h <sup>-1</sup>	-----
Galactose	20 g.L <sup>-1</sup>	0,13 h <sup>-1</sup>	-----
Lactose Hidrolisada	20 g.L <sup>-1</sup>	0,20 h <sup>-1</sup>	0,11 h <sup>-1</sup>
Glicose (25%), Frutose (25%), Açúcar Invertido (25%) e Lactose Hidrolisada (25%)	30 g.L <sup>-1</sup>	0,23 h <sup>-1</sup>	-----
Glicose (25%), Frutose (25%), Açúcar Invertido (25%) e Lactose Hidrolisada (25%)	40 g.L <sup>-1</sup>	0,17 h <sup>-1</sup>	-----
Glicose (50%) e Frutose (50%)	40 g.L <sup>-1</sup>	0,20 h <sup>-1</sup>	-----
Glicose (50%) e Lactose hidrolisada (50%)	40 g.L <sup>-1</sup>	0,26 h <sup>-1</sup>	0,13 h <sup>-1</sup>
Açúcar Invertido (50%) e Lactose hidrolisada (50%)	40 g.L <sup>-1</sup>	0,21 h <sup>-1</sup>	0,11 h <sup>-1</sup>
Açúcar Invertido (50%) e Frutose (50%)	40 g.L <sup>-1</sup>	0,23 h <sup>-1</sup>	-----
Açúcar Invertido (50%) e Glicose (50%)	40 g.L <sup>-1</sup>	0,18 h <sup>-1</sup>	-----
Açúcar Invertido (25%), Lactose Hidrolisada (25%), Glicose (25%) e Frutose (25%)	80 g.L <sup>-1</sup>	0,10h <sup>-1</sup>	-----
Lactose Hidrolisada (33%), Glicose (33%) e Frutose (33%)	60 g.L <sup>-1</sup>	0,16h <sup>-1</sup>	-----
Açúcar Invertido (33%), Lactose Hidrolisada (33%) e Frutose (33%)	60 g.L <sup>-1</sup>	0,14h <sup>-1</sup>	-----
Açúcar Invertido (33%), Frutose (33%) e Glicose (33%)	60 g.L <sup>-1</sup>	0,16h <sup>-1</sup>	-----

Nos ensaios conduzidos a 60 g.L<sup>-1</sup> e 80 g.L<sup>-1</sup> observaram-se valores de velocidade específica de crescimento inferiores aos obtidos em outros ensaios. Percebe-se que  $\mu_{max}$  decresce à medida que o valor de concentração do substrato aumenta. Sabe-se que existe influência da concentração do substrato no valor da

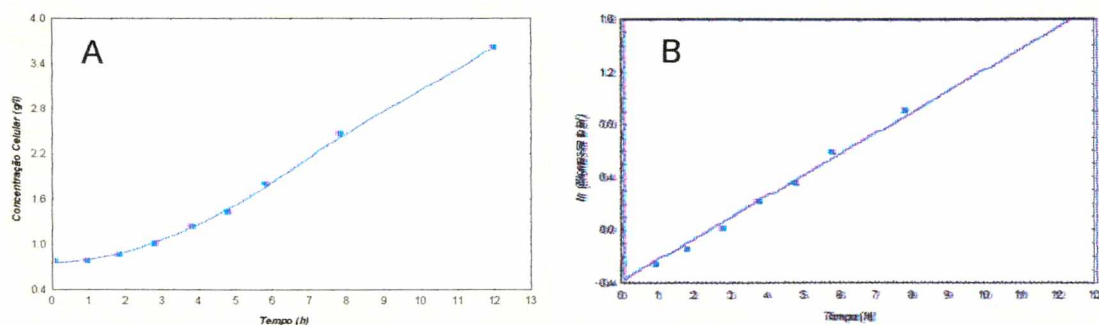
velocidade específica de crescimento. A partir desta observação procurou-se estudar qual a influência causada pela concentração de substrato em ensaios conduzidos com açúcar invertido no cultivo de *Ralstonia eutropha*. Estes resultados serão apresentados no item 4.1.2.

Como os resultados obtidos com lactose hidrolizada mostraram-se satisfatórios e como se tinha o objetivo de diminuir o custo de produção do biopolímero, realizaram-se ensaios utilizando-se soro de leite como fonte de carbono.

### 4.1.1.3 Uso de Soro de Leite como Fonte de Carbono

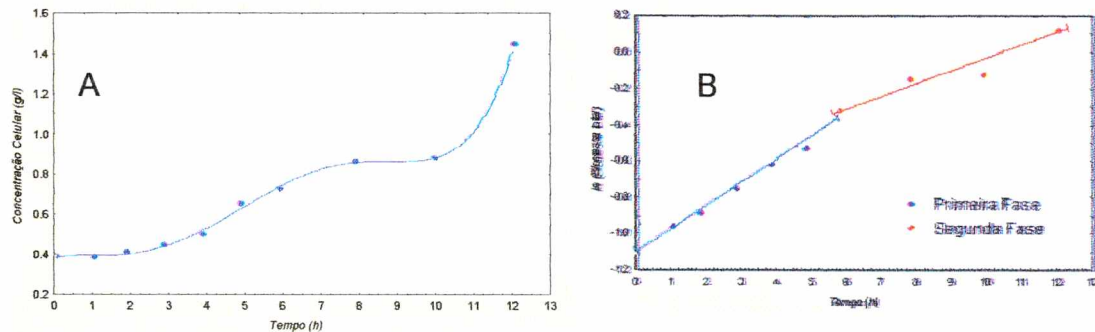
Com o objetivo de reduzir o custo de produção de P(3HB-co-3HV) e sendo que os resultados obtidos com lactose hidrolizada mostraram-se satisfatórios, realizaram-se ensaios com soro de leite. O soro de leite é um resíduo da indústria de laticínios, proveniente, normalmente, da produção de queijos e que possui 5% de lactose em sua composição. Seu permeado, obtido a partir da ultrafiltração, é um meio alternativo muito atrativo para a substituição da fonte de carbono. Estudos já foram realizados utilizando o soro previamente concentrado como fonte de carbono por Wong e Lee (1998) utilizando *Escherichia coli* que assimila naturalmente a lactose.

Foram realizados estudos com soro de leite ( $15 \text{ g.L}^{-1}$ ) e com a mistura soro de leite ( $15 \text{ g.L}^{-1}$ ) e açúcar invertido ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ) e as Figuras 4.5 e 4.6 ilustram os resultados obtidos para estes ensaios, respectivamente.



**Figura 4.5: Evolução da concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) durante a cultura quando soro de leite ( $15 \text{ g.L}^{-1}$ ) foi utilizado como fonte de carbono (A – concentração celular, B –  $\ln$  da concentração)**

Quando soro de leite foi utilizado como única fonte de carbono, o valor de velocidade específica máxima de crescimento ( $0.20 \text{ h}^{-1}$ ) foi similar aos ensaios conduzidos com lactose hidrolisada. Porém, não foi observada uma a segunda fase de crescimento neste experimento.



**Figura 4.6: Evolução da concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) durante a cultura quando soro de leite ( $15 \text{ g.L}^{-1}$ ) e açúcar invertido ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ) foram utilizados como fonte de carbono (A – concentração celular, B – ln da concentração)**

Quando a mistura açúcar invertido e soro de leite foi utilizada, os valores de velocidade específica obtidos foram  $0.23 \text{ h}^{-1}$  e  $0.12 \text{ h}^{-1}$  para a primeira e a segunda fase, respectivamente. Comparando-se estes resultados com outros substratos, percebe-se que tanto soro de leite, quanto a mistura de soro e açúcar invertido são alternativas atrativas para a utilização como fonte de carbono, mesmo que apresente uma fase de crescimento com velocidade menor. Como o seu valor econômico é muito barato, o custo maior residiria no investimento para a hidrólise deste substrato (enzima lactase).

#### **4.1.2 Efeito da Concentração de Substrato no Crescimento de *Ralstonia eutropha*.**

Em estudos realizados no Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT (1993), observou-se que concentrações de açúcares redutores totais acima de  $40 \text{ g.L}^{-1}$  causariam inibição do crescimento de *Ralstonia eutropha*. Segundo Kim e Lee (1993) e Chang et al. (1994), *Ralstonia eutropha* utiliza glicose eficientemente como fonte de carbono com uma velocidade específica máxima de  $0.23 \text{ h}^{-1}$  em concentrações em torno de  $20 \text{ g.L}^{-1}$ . Além disto, foi observado por Oliveira (1999)

que em valores abaixo de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  ocorre limitação no crescimento desta bactéria. Assim, é possível que uma faixa ótima de concentração de substrato para o crescimento seja entre  $10 \text{ g.L}^{-1}$  e  $40 \text{ g.L}^{-1}$ .

Com o objetivo de verificar se esta é realmente a faixa ótima de concentração de açúcar invertido para a cepa em estudo, testes foram realizados em concentrações iniciais de 20, 40, 60 e  $80 \text{ g.L}^{-1}$ , em frascos agitados, observando-se a velocidade específica máxima de crescimento.

A Figura 4.7 ilustra a concentração celular de *Ralstonia eutropha* durante as culturas realizadas com diferentes concentrações de açúcar invertido. Os valores de velocidade específica máxima ( $\mu_{\max}$ ) obtidos foram de  $0,20 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,23 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,12 \text{ h}^{-1}$  e  $0,10 \text{ h}^{-1}$  para os ensaios conduzidos com as concentrações iniciais de  $20 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $40 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $60 \text{ g.L}^{-1}$  e  $80 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Os valores obtidos para concentrações de  $20 \text{ g.L}^{-1}$  e  $40 \text{ g.L}^{-1}$  são bastante próximos, como uma pequena melhora para a concentração em torno de  $40 \text{ g.L}^{-1}$ . O valor de  $\mu_{\max}$  mais alto e mais próximo do obtido em culturas com glicose como substrato foi obtido quando a concentração inicial foi  $40 \text{ g.L}^{-1}$ .

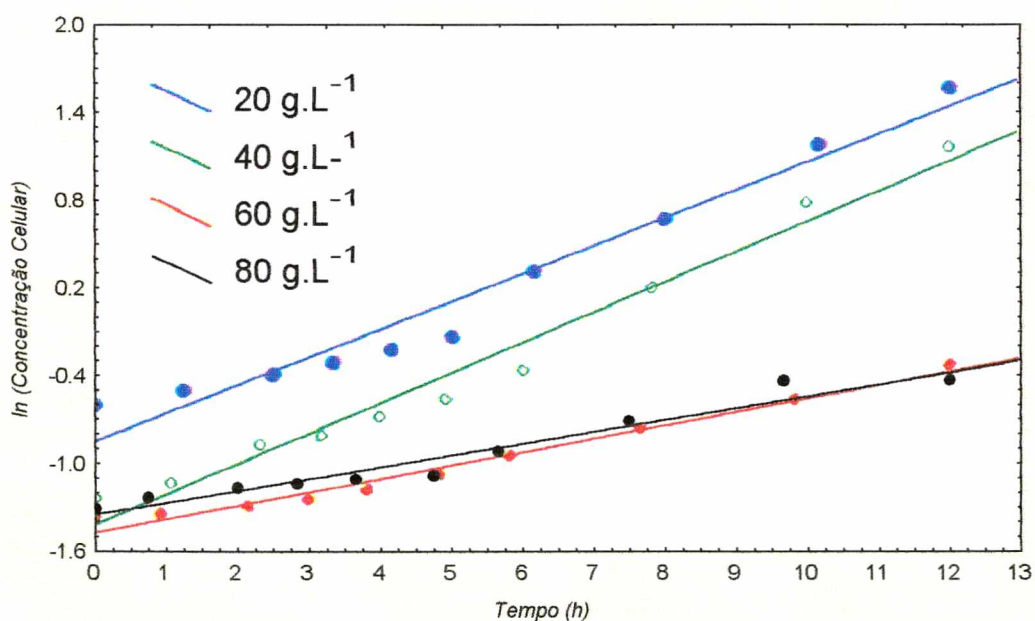


Figura 4.7: Concentração celular de *Ralstonia eutropha* em função do tempo de cultura quando foi utilizado diferentes concentrações de açúcar invertido

Observa-se que próximo a  $60 \text{ g.L}^{-1}$  ocorre uma queda acentuada na velocidade específica máxima de crescimento que aumenta quando a concentração é em torno de  $80 \text{ g.L}^{-1}$ . Estes resultados estão de acordo com as faixas de trabalho sugeridas na literatura (Kim e Lee, 1993; IPT, 1993; Oliveira, 1999).

A comparação do crescimento de *Ralstonia eutropha* em diferentes concentrações iniciais de açúcar invertido e substratos mistos permitiu concluir que ocorre inibição no crescimento causada a partir de concentrações iniciais superiores a  $40 \text{ g.L}^{-1}$ , considerando as concentrações utilizadas neste estudo. A condução do processo em batelada alimentada é interessante para assegurar a concentração ótima de substrato e assim garantir alta produtividade em células e, por conseguinte, em polímero.

A partir destes resultados e com o objetivo de garantir uma boa fase de produção, sem a necessidade de alimentações sucessivas muito freqüentes como ocorre quando a concentração inicial é  $20 \text{ g.L}^{-1}$ , optou-se por utilizar uma concentração inicial de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  para as culturas em biorreator.

### **4.1.3 Influência da Fonte de Nitrogênio: Uso da Milhocina**

O sulfato de amônio é uma fonte de nitrogênio relativamente barata, se comparada, por exemplo, ao extrato de levedura. No entanto, comparada aos resíduos industriais, esta fonte não se torna economicamente atrativa. A milhocina, água de maceração do milho, é rica em nitrogênio, podendo ser uma fonte alternativa em substituição ao sulfato de amônio.

Inúmeros estudos são realizados com milhocina, aplicando-a como substrato, fonte de nitrogênio ou suplemento nutricional (Pessoa e Vitolo, 1999; Park et al., 1998; Huang et al., 1998). Okabe et al. (1999) compararam extrato de levedura, *gluten meal* e milhocina na produção de ácido araquidônico em culturas de *Mortierella alpina*. Estes autores estudaram o efeito da fonte de nitrogênio na morfologia micelial e não observaram diferenças entre estas fontes. West e Strohfus (1999) utilizaram milhocina na produção de pullulanas por *Aureobasidium pullulans* comparando-a com proteínas hidrolisadas da soja e sulfato de amônio e observaram que a produção em questão era a mesma em todos os casos. Schoroeder et al. (1998) também usaram este resíduo para produção de ácido propiônico a partir de

*Propionibacterium shermanii* e observaram maior produtividade em relação ao uso do extrato de levedura. Hoch (1997) utilizou milhocina em substituição ao extrato de levedura no cultivo de *Zymomonas mobilis* e concluiu que não houve alterações nos parâmetros fermentativos. Os estudos em que esta fonte foi aplicada em substituição às fontes de nitrogênio normalmente utilizadas demonstram a viabilidade de seu uso.

Neste sentido, ensaios foram realizados comparando-se a velocidade específica de crescimento utilizando-se sulfato de amônio e milhocina como fontes de nitrogênio. A Figura 4.8 ilustra a evolução do crescimento celular durante as culturas quando um substrato composto de glicose (25%), frutose (25%), lactose hidrolisada (25%) e açúcar invertido (25%) a uma concentração inicial de  $40 \text{ g.L}^{-1}$  foram utilizados com milhocina e com sulfato de amônio. As curvas que representam a evolução da concentração da biomassa ao longo do tempo encontram-se no Anexo II (Figura A8).

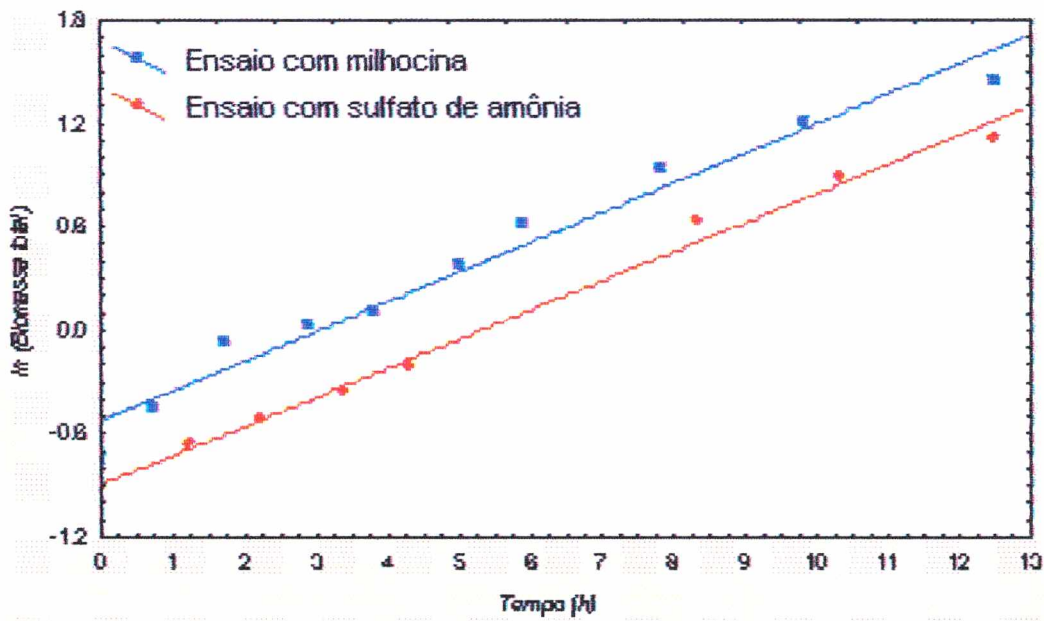


Figura 4.8: Evolução da concentração celular de *Ralstonia eutropha* ao longo da cultura com  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de substrato: glicose (25%), frutose (25%), lactose hidrolisada (25%) e açúcar invertido (25%) utilizando-se sulfato de amônio e milhocina como fontes de nitrogênio.



Observa-se que ambos os ensaios apresentaram comportamento exponencial muito parecido. De fato, os valores da velocidade específica são muito próximas, sendo  $0.20 \text{ h}^{-1}$  para o ensaio realizado com milhocina e  $0.19 \text{ h}^{-1}$  para o ensaio realizado com sulfato de amônio. Pode-se concluir que a milhocina mostrou-se capaz de substituir a fonte de nitrogênio normalmente utilizada.

Analisando-se o efeito da milhocina em uma única fonte de carbono, a Figura 4.9 ilustra o crescimento do microrganismo em frutose, com milhocina e com sulfato de amônio. Neste caso, também se observou que as velocidades específicas de crescimento são muito próximas entre si quando a fonte de nitrogênio utilizada foi a milhocina ou o sulfato de amônio. Os valores de velocidades específicas obtidos foram respectivamente de  $0.21 \text{ h}^{-1}$  e  $0.24 \text{ h}^{-1}$ , para com sulfato de amônio e com milhocina como fontes de nitrogênio. A mudança de inclinação apresentada na nas duas curvas pode ser em virtude de alguma limitação ocorrida durante a cultura.

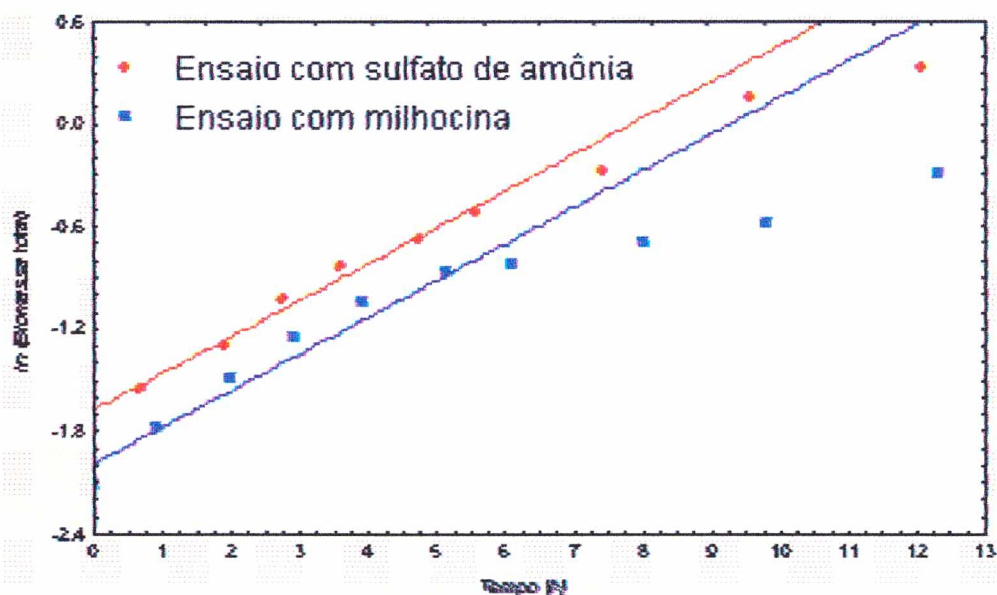


Figura 4.9: Evolução da concentração celular de *Ralstonia eutropha* ao longo da cultura com  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de frutose com milhocina e com sulfato de amônio

Testes utilizando milhocina como fonte de nitrogênio foram realizados com outros substratos. A Tabela 4.2 ilustra os valores de velocidade específica máxima de crescimento para estes ensaios.

Tabela 4.2: Testes realizados com milhocina como fonte de nitrogênio

<b>Substrato Utilizado</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Veloc. Espec. (h<sup>-1</sup>)</b>
Açúcar Invertido (50%) e Glicose (50%)	40 g.L <sup>-1</sup>	0,19 h <sup>-1</sup>
Açúcar Invertido (50%) e Lactose hidrolisada (50%)	40 g.L <sup>-1</sup>	0,19 h <sup>-1</sup>
Lactose Hidrolisada (50%) e Glicose (50%)	40 g.L <sup>-1</sup>	0,24 h <sup>-1</sup>

Os valores obtidos para as velocidades específicas máximas nos ensaios apresentados na Tabela 4.2 são próximos aos obtidos com glicose (0,23 h<sup>-1</sup>), lactose hidrolisada (0,20 h<sup>-1</sup>) e açúcar invertido (0,26 h<sup>-1</sup>), substratos estes utilizados nestas misturas. Este fato confirma que não existem diferenças substanciais no uso da milhocina em substituição à fonte de nitrogênio utilizada. Este resíduo, então, é uma alternativa interessante e viável em substituição ao sulfato de amônio.

No entanto, algumas desvantagens podem ser levantadas para futuros ensaios, conduzidos em biorreator, como a necessidade de um tratamento prévio (falta de equipamentos para tratar grandes quantidades) e a dificuldade de análise do crescimento celular por gravimetria (quando milhocina está presente existe algum resíduo retido nas membranas). Assim, optou-se por utilizar o sulfato de amônio nos ensaios conduzidos em biorreator.

#### **4.1.4 Influência da Temperatura**

A temperatura ótima de crescimento é um parâmetro muito importante na condução de culturas de microrganismos. A literatura cita duas temperaturas ótimas de crescimento (30 e 34°C), e a maioria dos estudos são realizados a 30°C. A partir disto, propõe-se estudar a influência destas duas temperaturas na velocidade específica máxima de crescimento de *Ralstonia eutropha*.

A Figura 4.10 representa o crescimento celular nas duas temperaturas utilizando-se galactose como fonte de substrato. No Anexo II (Figura A9) encontram-se as curvas que representam a evolução da concentração do crescimento celular através do tempo.

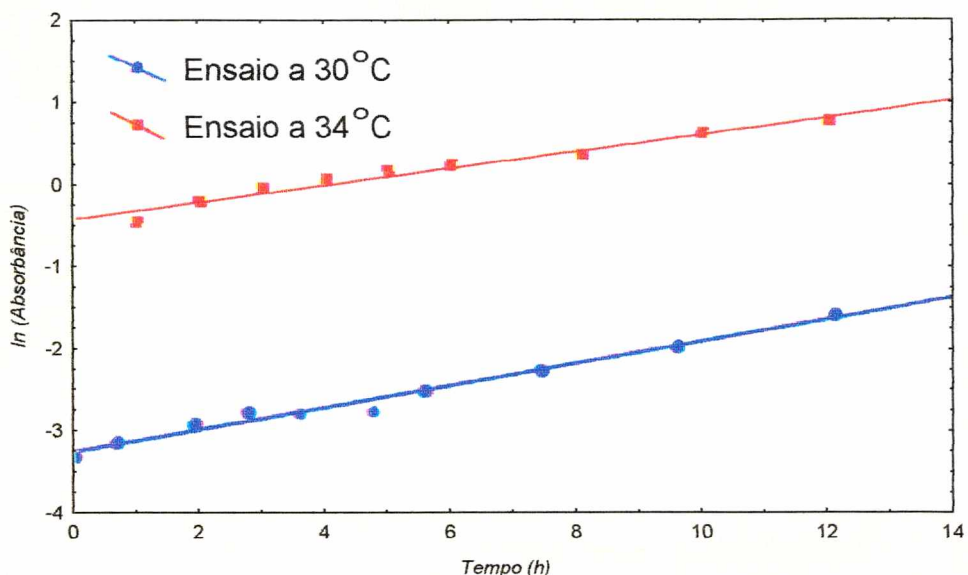


Figura 4.10: Evolução da concentração celular de *Ralstonia eutropha* ao longo da cultura de galactose em 20 g.L<sup>-1</sup> nas temperaturas de 30°C e 34°C.

O valor de velocidade específica máxima de crescimento obtido em galactose a 30 °C foi de 0.13 h<sup>-1</sup> enquanto que a 34 °C foi de 0.10 h<sup>-1</sup>, sugerindo que este substrato é melhor consumido à temperatura de 30 °C.

O mesmo estudo foi realizado com lactose hidrolisada como fonte de substrato a curva que representa a velocidade específica de crescimento é ilustrada na Figura 4.11.

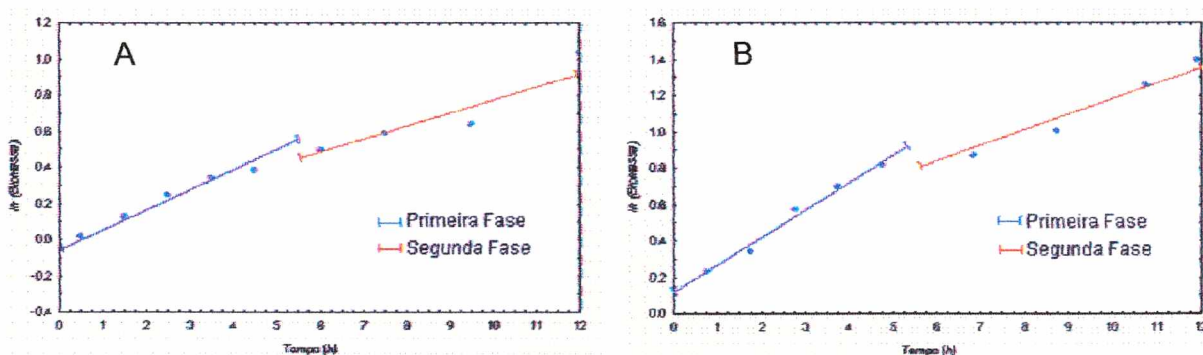


Figura 4.11: Evolução da concentração celular de *Ralstonia eutropha* ao longo da cultura com 15 g.L<sup>-1</sup> de lactose hidrolisada a 30°C (A) e a 34°C (B)

Como relatado anteriormente, observam-se duas fases de crescimento e os valores de velocidade específica de crescimento foram respectivamente de  $0.19 \text{ h}^{-1}$  e  $0.17 \text{ h}^{-1}$  a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e a  $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para a primeira fase e  $0.10 \text{ h}^{-1}$  a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $0.11 \text{ h}^{-1}$  a  $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para a segunda fase.

Pouca alteração da velocidade específica máxima de crescimento foi observada entre as duas temperaturas. No entanto, cabe ressaltar que na literatura quando a temperatura de  $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$  é utilizada o pH é mantido em 6,8, como nos estudos realizados por Anderson e Madden, 1998. Vários estudos em que se trabalhou a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , o pH normalmente utilizado foi 7,0 (Kim et al., 1992; Brauneeg et al. 1995; Choi e Lee, 1997). Como nossos estudos foram realizados com temperatura de  $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e pH 7,0, seria interessante o estudo da influência do pH e da temperatura simultaneamente.

Baseando-se nos resultados obtidos, a temperatura utilizada para estudos posteriores foi de  $30^{\circ}\text{C}$ . No entanto cabe ressaltar que é interessante conduzir ensaios a temperatura de  $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$  em escala industrial pois quando mais alta a temperatura de operação, menor será o custo atribuído à outras etapas do processo produtivo como às de resfriamento.

## 4.2 AVALIAÇÃO DA ESTRATÉGIA DE LIMITAÇÃO DO NUTRIENTE NA FASE DE PRODUÇÃO: CARÊNCIA X ALIMENTAÇÃO

O acúmulo de polímero por *Ralstonia eutropha* é favorecido pela limitação de um nutriente como oxigênio, magnésio, potássio, enxofre, nitrogênio ou fósforo (Schlegel et al., 1961, Dawes e Senior, 1973). Uma das formas de promover um melhor acúmulo do polímero durante a fase de produção é induzir a uma limitação adequada, e que leve ao máximo de acúmulo do polímero.

Estudos já comprovaram que a limitação em fósforo é uma escolha interessante, pois este não está relacionado à composição das proteínas e então a limitação deste nutriente permite um crescimento residual sem alterar diretamente a capacidade de biossíntese das proteínas (Luzier, 1992; Oliveira, 1999; Ryu, 1999), o que levaria a um aumento na produção de polímero.

Em estudos realizados por Oliveira (1999) na produção de P(3HB) observou-se que não houve interrupção da síntese de proteínas em limitação de fósforo. Também observou-se que os valores de produtividade foram mais elevados comparando-se com culturas com limitação em nitrogênio. Nestes estudos, foi concluído que uma alimentação controlada de fósforo não induz a valores maiores de produtividade do que o observado em cultura sob a carência deste elemento durante a fase de produção. Uma das explicações para este fato foi a variação de pH e oxigênio dissolvido ocorrida durante estas culturas.

As estratégias utilizadas para a produção de P(3HB) (Oliveira, 1999; Aragão, 1996) serviram de base para os estudos de produção do copolímero (P(3HB-co-3HV)), mantendo-se a mesma alimentação de fósforo e controlando-se o pH da cultura. As culturas foram realizadas em biorreator de 5 L com açúcar invertido como fonte de carbono. As concentrações de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foram reduzidas em relação à pré-cultura, para 0.9 e 0.15  $\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente. Estas concentrações têm o objetivo de se obter a exaustão de fósforo no meio após a produção de aproximadamente 10  $\text{g.L}^{-1}$  de biomassa, baseado no rendimento de 103  $\text{g.g}^{-1}$  obtido por Aragão (1996), caracterizando-se assim o início da fase de produção. As culturas se diferenciam na fase de produção: carência, ou seja sem adição de fósforo ou alimentação com adição limitada de fósforo. O ácido propiônico

foi alimentado na forma de correção de pH em ambas as culturas de acordo com o exposto na seção 4.5.4.3. Maiores detalhes sobre a assimilação do ácido serão expostos na seção 4.4.1. A concentração de açúcar invertido foi mantida entre uma faixa de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  e  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de acordo com os estudos já relatados.

### 4.2.1 CULTURA EM CARÊNCIA DE FÓSFORO

A Figura 4.12 apresenta o logaritmo da massa de biomassa residual e a massa residual de fosfato no meio ao longo da cultura. Os dados das figuras apresentadas neste capítulo são apresentados em massa para eliminar a variação ocorrida devido à diluição no meio provocada pelas alimentações em açúcar invertido. A limitação pelo de fósforo ocorre a partir do ponto em que o logaritmo neperiano da concentração de biomassa residual não é mais ajustado em uma reta. A fase de crescimento exponencial é caracterizada pelo ajuste linear do logaritmo da concentração de biomassa com velocidade específica de crescimento de  $0,22 \text{ h}^{-1}$ . Nesta figura, observa-se que esta fase termina em 17 h de cultura, momento em que a massa de fosfato era de  $0,2 \text{ g}$  correspondente a  $0,077 \text{ g.L}^{-1}$ . As curvas que ilustram as alimentações de açúcar durante a cultura para estes ensaios são apresentadas no Anexo III (Figura A10) e a evolução do pH em função do tempo é ilustrada no Anexo IV (Figura A14).

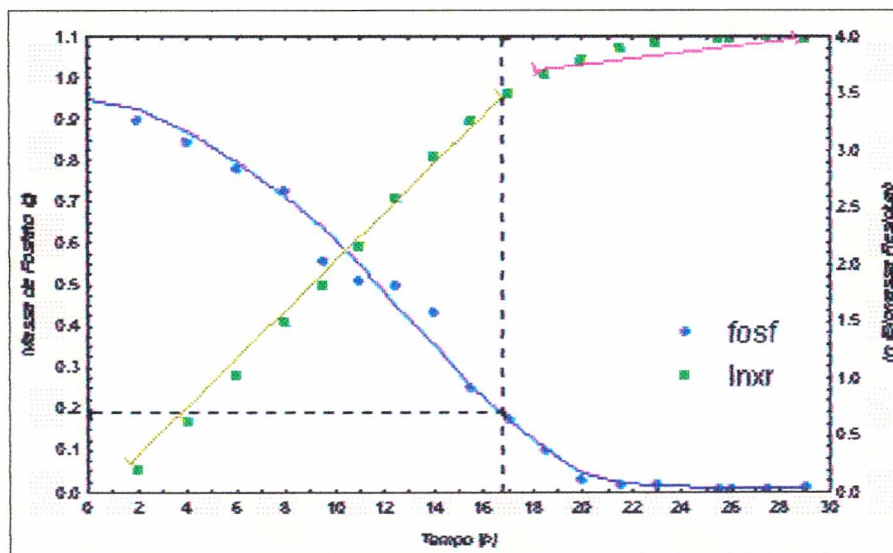


Figura 4.12: Evolução da massa de biomassa residual (expressa em ln) e da massa de fosfato na cultura conduzida com carência em fosfato durante a fase de produção

Nesta figura, percebe-se que a partir de 17 h (ponto indicado pela linha pontilhada) a biomassa residual começa a crescer de forma linear com  $\mu$  de aproximadamente  $0,02 \text{ h}^{-1}$ , indicando o início da fase de produção. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Oliveira (1999) que observou que a limitação do crescimento se inicia antes do esgotamento total do fosfato no meio ( $0,23 \text{ g} - 0,05 \text{ g.L}^{-1}$ ). Durante a cultura, o início da fase de produção foi determinado pela análise de fósforo, quando esta decrescia a valores inferiores a  $0,10 \text{ g.L}^{-1}$ , conforme estudos realizados por Oliveira (1999). A partir deste momento (14,3 h) determinava-se o início da alimentação em ácido propiônico para produção do copolímero. A análise dos dados (Figura 4.12) mostra uma pequena diferença em relação ao exato momento da limitação e o início real da fase de produção. Este fato pode ser explicado devido à limitação da informação durante a cultura: o kit de fosfato utilizado não é uma medida 'on-line'. É possível que a utilização de uma sonda de oxigênio possa fornecer o momento preciso da limitação.

A Tabela 4.3 apresenta o momento em que ocorre todas as alimentações realizadas para a cultura conduzida em carência de fósforo.

*Tabela 4.3: Alimentações realizadas durante a cultura em carência de fósforo.*

<b>Substrato</b>	<b>Momento</b>	<b>Conc. Final</b>	<b>Forma de Alim.</b>
Açúcar invertido	14,3 h	30 $\text{g.L}^{-1}$	Pulso
	22 h		
Ácido propiônico	14,3 h	1 $\text{g.L}^{-1}$	Pulso seguido por regulação de pH

Os resultados das análises das quantidades de biomassa total e residual, fosfato, proteína, substrato, e polímero obtidos para a cultura em carência de fosfato são apresentados na Figura 4.13. A linha perpendicular ao eixo das abscissas representa o momento em que ocorre a limitação pelo fósforo, conforme a análise da Figura 4.12. A fase à esquerda da linha corresponde à fase de crescimento e a fase à direita, à fase de produção. A fase inicial demonstra crescimento exponencial de biomassa total e proteína. A biomassa residual corresponde ao valor da biomassa total, porque o acúmulo de P(3HB-co-3HV) nesta fase é praticamente nulo. Observa-se que a partir de 17 horas de crescimento não limitado, a curva da

biomassa residual e da produção de massa de proteína assumem um comportamento linear, indicando um crescimento limitado. A partir deste momento, a produção de P(3HB-co-3HV) é acelerada. A quantidade final de polímero acumulada foi de 30.01 g correspondente a 42% de acúmulo intracelular. Os pontos experimentais de biomassa residual apresentam algumas oscilações em virtude da resposta analítica de biomassa total e acúmulo de polímero. Não foi detectado ácido propiônico nas análises realizadas, indicando que este foi totalmente consumido assim que adicionado.

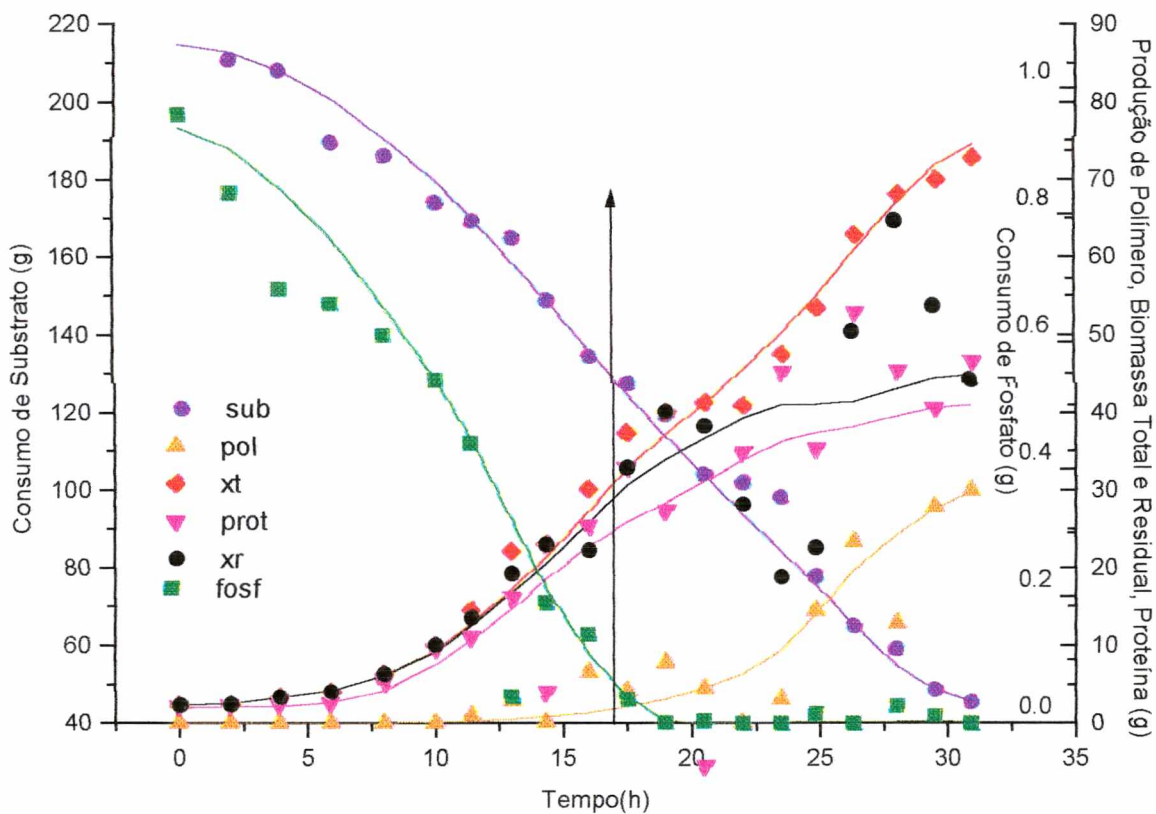


Figura 4.13: Evolução das quantidades em massa de fosfato(fosf), biomassa total (xt) e residual (xr), proteína (prot), substrato (sub) e polímero (pol) em função tempo para a cultura conduzida em carência de fosfato

### 3.2.2 CULTURA EM ALIMENTAÇÃO DE FÓSFORO

Visando estudar o efeito da manutenção de um crescimento residual limitado, durante a fase de produção sobre a produção do copolímero, foi realizada



uma cultura com alimentação em fósforo. A alimentação ocorreu da seguinte forma: acompanhou-se o consumo de fosfato da mesma maneira que na cultura em carência de fósforo, quando a concentração de fosfato atingiu valores inferiores a  $0,10 \text{ g.L}^{-1}$  seguiu-se à alimentação contínua de uma solução de fosfato de maneira a proporcionar uma concentração no meio de  $0,15 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,025 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente. Esta concentração foi baseada em estudos realizados por Oliveira (1999).

Da mesma forma que exposto para a cultura em carência de fosfato, a Figura 4.14 ilustra o momento da limitação quando o crescimento deixa de ser exponencial (17 horas) para a cultura conduzida em alimentação de fósforo. A limitação do crescimento para esta cultura ocorreu da mesma forma que ilustrado para a cultura em carência de fósforo. Esta limitação ocorreu em aproximadamente 17 horas (ponto representado pela linha pontilhada) com uma massa de fosfato igual a  $0,2 \text{ g}$  correspondendo a  $0,07 \text{ g.L}^{-1}$ . A velocidade específica máxima de crescimento celular de *Ralstonia eutropha*, calculada a partir da regressão linear do logaritmo da biomassa residual na fase de crescimento foi  $0,21 \text{ h}^{-1}$  até aproximadamente 16 h de cultura, indicando o término da fase de crescimento exponencial. A linha pontilhada representa o momento em que ocorreu a limitação do nutriente.

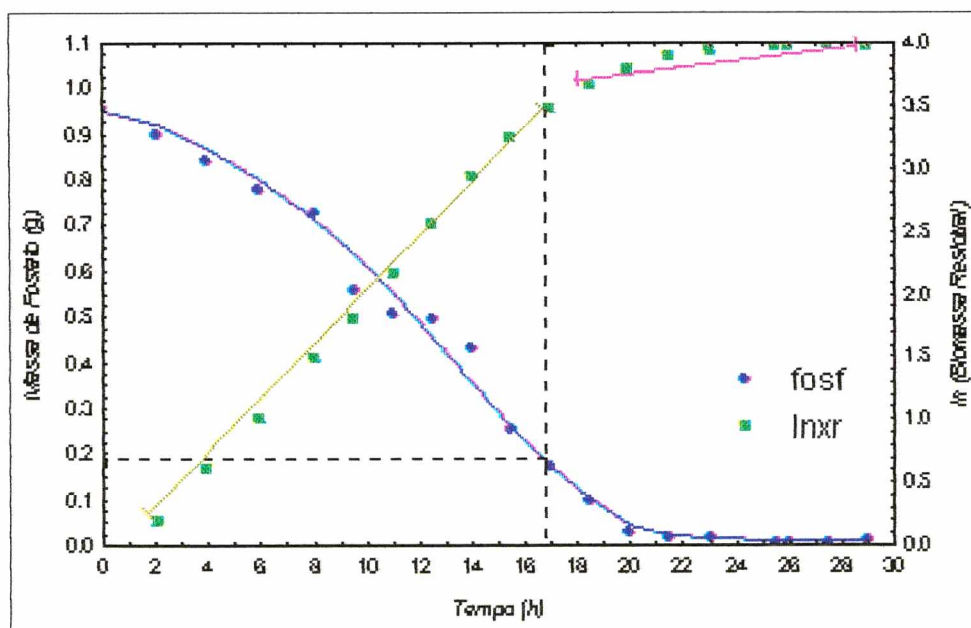


Figura 4.14: Evolução da massa de biomassa residual (expressa em ln) e da massa de fosfato na cultura conduzida com alimentação de fósforo durante a fase de produção

As características da fase de crescimento desta cultura são muito próximas às relatadas na cultura sob carência em fósforo, inclusive pelo momento em que a limitação ocorreu, a  $0,077 \text{ g.L}^{-1}$  para a cultura com carência e  $0,07 \text{ g.L}^{-1}$  para a cultura com alimentação. As curvas utilizadas para o cálculo dos fatores de conversão de açúcar invertido em biomassa residual encontram-se no Anexo V (Figura A19). Estes valores foram de  $0,40 \text{ g.g}^{-1}$  e  $0,5 \text{ g.g}^{-1}$  para a fase de crescimento e fase de produção, respectivamente. Os fatores de conversão obtidos estão de acordo com o citado na literatura que é de  $0,50 \text{ g.g}^{-1}$  (Aragão, 1996).

A Tabela 4.4 ilustra o momento em que ocorreram as alimentações em fosfato, açúcar invertido e ácido propiônico para esta cultura. O momento das alimentações de ácido propiônico e fosfato foi determinado pelo acompanhamento da evolução da concentração de fosfato durante a cultura da mesma forma que discutido anteriormente para cultura sob carência.

Tabela 4.4: Alimentações realizadas durante a cultura em alimentação de fósforo.

<b>Substrato</b>	<b>Momento</b>	<b>Conc. Final</b>	<b>Forma de Alim.</b>
Açúcar invertido	14 h	$30 \text{ g.L}^{-1}$	Pulso
	21,5 h		
Ácido propiônico	14 h	$1 \text{ g.L}^{-1}$	Pulso seguido por regulação de pH
Fosfato	14 h	$0,15 \text{ g.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ e $0,025 \text{ g.L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$	Aliment contínua vazão = $23 \text{ mL.h}^{-1}$

Na Figura 4.15 observam-se os resultados das análises de concentração da biomassa total e residual, fosfato, proteína, substrato, e polímero obtidos para a cultura em alimentação de fósforo. A linha perpendicular ao eixo das abscissas representa o momento em que ocorreu a limitação em fósforo. Durante a fase de produção, obtém-se um aumento linear da proteína e da estabilização da biomassa residual. Este é o mesmo período no qual se encontra a maior produção de P(3HB-co-3HV). A quantidade final de polímero acumulada foi de  $22,73 \text{ g}$  que correspondem a  $31,04\%$  de acúmulo intracelular com  $4,17 \text{ g}$  de 3HV correspondentes a  $17\%$  do polímero total acumulado. O fator de conversão de ácido propiônico em 3HV foi de  $0,04 \text{ g.g}^{-1}$  correspondente a  $0,03 \text{ mol.mol}^{-1}$ . Nesta cultura

as análises realizadas para determinação de ácido propiônico também demonstraram que todo o ácido foi consumido à medida que foi adicionado ao meio.

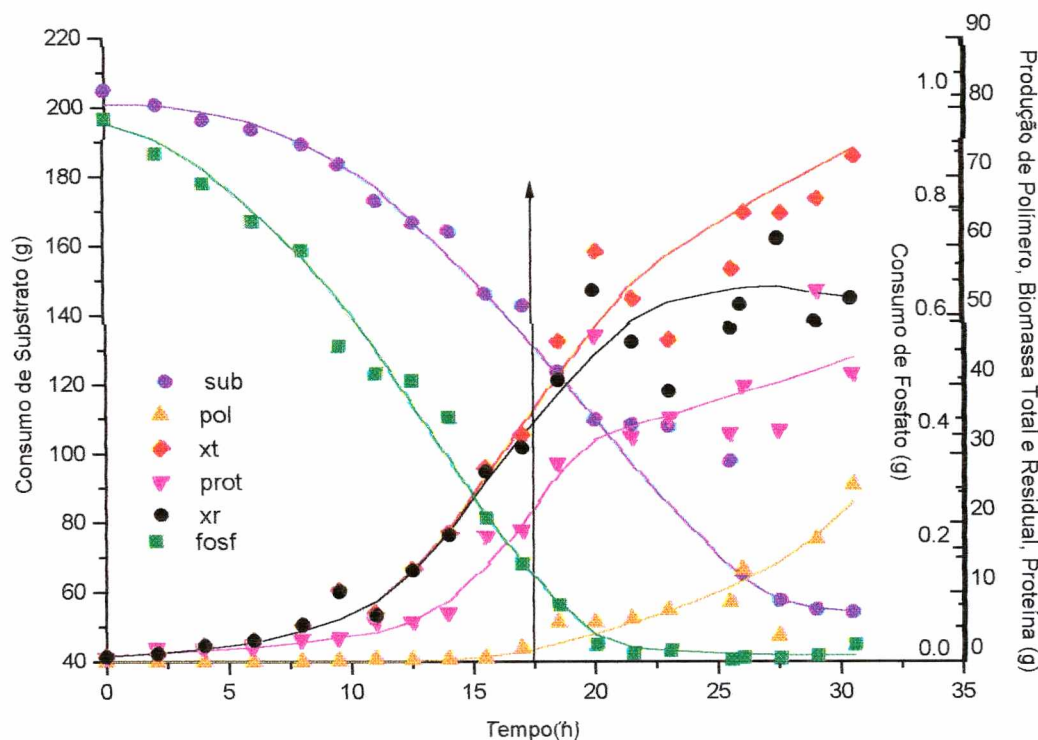


Figura 4.15: Evolução das quantidades de fosfato (fosf), biomassa total (xt) e residual (xr), proteína (prot), substrato (sub) e polímero (pol) em função tempo para a cultura conduzida em alimentação de fosfato

### 3.2.3 COMPARAÇÃO ENTRE CARÊNCIA E ALIMENTAÇÃO DE FÓSFORO DURANTE A FASE DE PRODUÇÃO

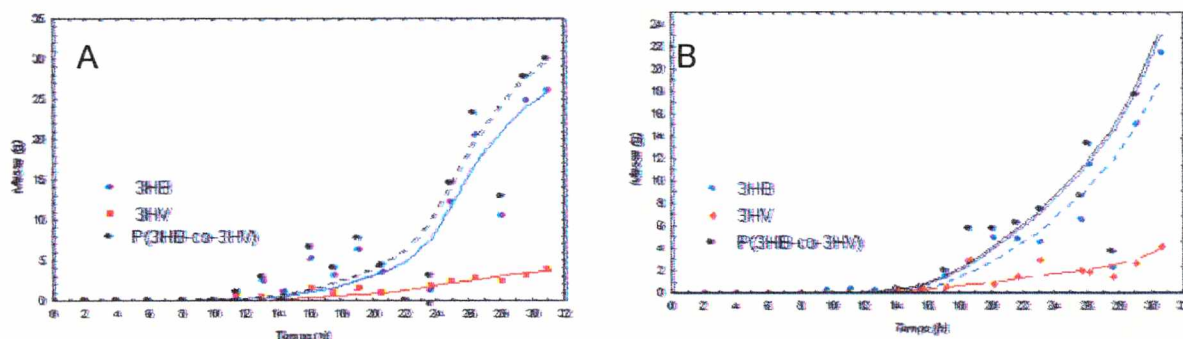
A Tabela 4.5 ilustra um resumo das massas de biomassa total e residual, produção de polímero, de proteína e tempo de cultura para as culturas estudadas.

Tabela 4.5: Resumo dos dados gerais obtidos nas duas culturas.

Estratégia	Tempo de Cultura (h)	$X_T$ (g)	$X_R$ (g)	Polímero (g)	Proteína (g)
Carência	30,9	74,5	44,7	30,0	52,1
Alimentação	30,5	74,2	49,2	22,7	43,9

O acúmulo intracelular de polímero obtido na cultura sob carência de fosfato correspondeu a 0,40 (g P(3HB-co-3HV)/g cel), superior ao obtido sob alimentação do mesmo nutriente, que correspondeu a 0,31 (g P(3HB-co-3HV)/g cel).

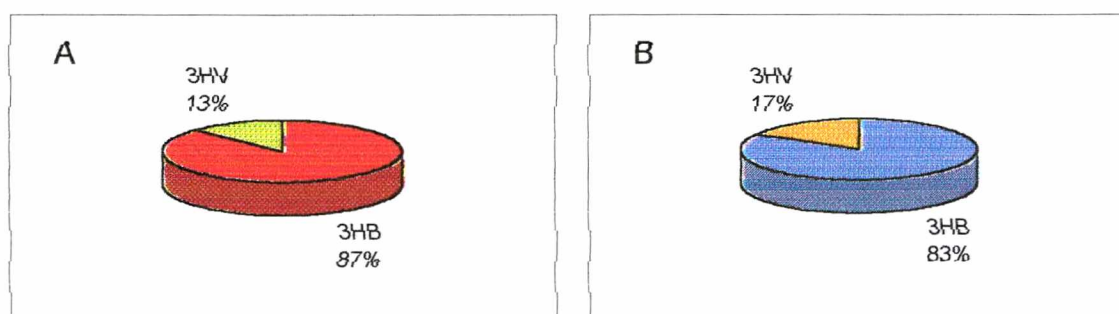
A evolução do acúmulo em massa obtido de P(3HB-co-3HV) e seus componentes (3HB e 3HV) durante a cultura é ilustrada na figura 4.16.



**Figura 4.16: Evolução do acúmulo de P(3HB-co-3HV) e dos monômeros 3HB e 3HV durante as culturas (A – carência em fosfato; B – alimentação em fosfato)**

Observa-se nestes gráficos que o acúmulo de polímero já se apresentava estável na cultura conduzida em carência, o que não é observado na cultura em alimentação com fósforo, indicando que em alimentação em fosfato pode se manter uma alta taxa de produção por mais tempo.

A Figura 4.17 ilustra a composição de 3HB e 3HV no copolímero obtida em cada uma das culturas estudadas. Observa-se que composição de ambos os polímeros obtidos em carência ou alimentação são muito similares, com uma leve melhora em alimentação de fosfato.



**Figura 4.17: Composição de P(3HB-co-3HV) nas culturas realizadas sob carência (A) e alimentação (B) de fósforo**

A produtividade média em P(3HB-co-3HV) para as culturas em carência e alimentação em fósforo é ilustrada na Figura 4.18. Obteve-se um valor de produtividade média máxima de  $0,26 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , determinado para a cultura em carência em fósforo e  $0,19 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , determinado para a cultura em alimentação. Na Figura 4.18 percebe-se que a curva da produtividade em polímero para a cultura em carência de fósforo tende a se estabilizar indicando que a produtividade já alcançou o valor máximo nesta cultura. Ao contrário, a curva da produtividade em polímero para a cultura em alimentação ainda está em ascensão, sugerindo a possibilidade de aumento deste valor.

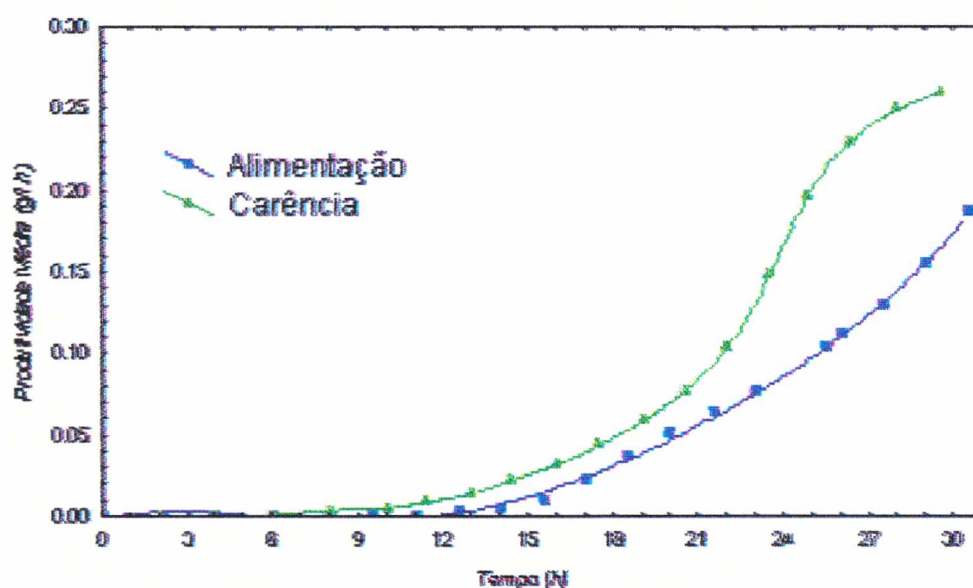


Figura 4.18: Produtividade média expressa em  $\text{gP(3HB-co-3HV)L}^{-1}\text{h}^{-1}$  para as duas culturas estudadas.

Os valores médios de produtividade obtidos durante a fase de produção para as culturas em carência e alimentação em fósforo foram respectivamente de  $0,86 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  e  $0,74 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

A Figura 4.19 ilustra a velocidade específica de produção de polímero durante as culturas estudadas. Durante a fase de produção, a velocidade específica máxima de produção de P(3HB-co-3HV) ( $q_{\text{PHBV}}$ ) foi de  $0,94 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$  para a cultura em carência e  $0,82 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$  para a cultura em alimentação. Apesar de  $q_{\text{PHBV}}$  ser maior em carência, não foi possível manter o valor máximo obtido para esta cultura ao contrário do obtido em alimentação, que não atingiu seu máximo até o final da cultura. Baseado nesta análise destes resultados, optou-se por conduzir futuros experimentos com alimentação em fósforo durante a fase de produção.

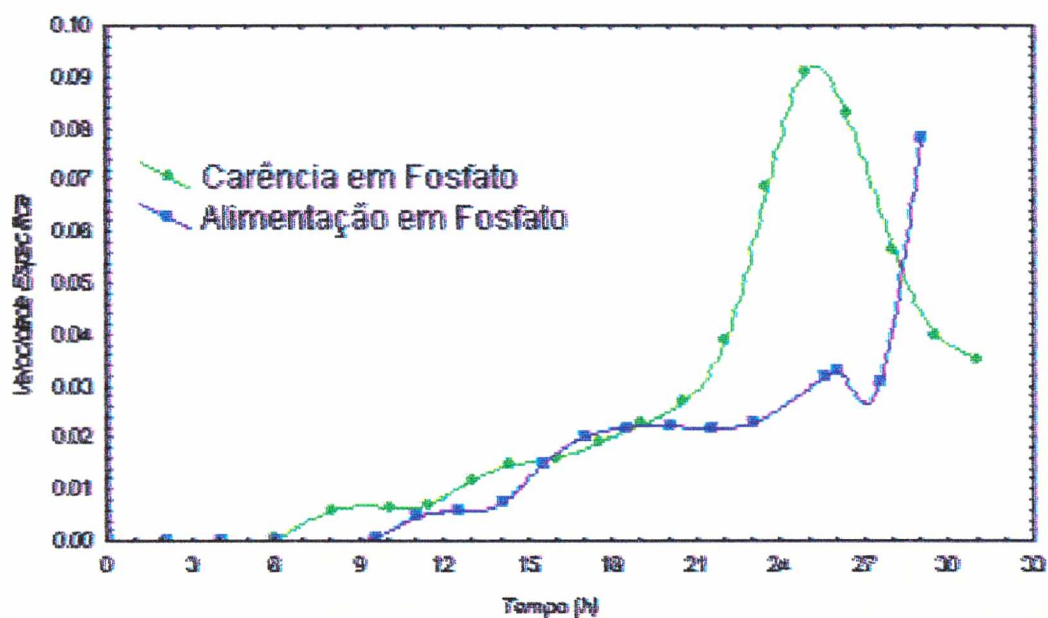


Figura 4.19: Velocidade específica para as duas culturas estudadas.

### **4.3 UTILIZAÇÃO DE SORO DE LEITE COMO FONTE DE CARBONO PARA PRODUÇÃO DE P(3HB-co-3HV): ESTUDO DE ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO QUE INTERFEREM NA INCORPORAÇÃO DE 3HV NO POLÍMERO**

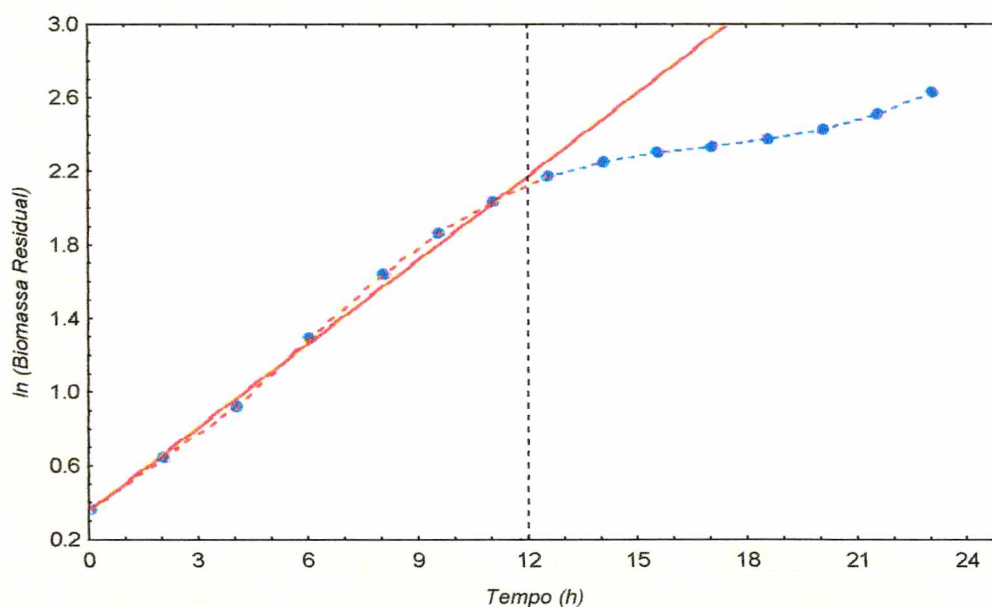
A avaliação econômica do processo de produção de P(3HB-co-3HV) indica que a fonte de substrato tem uma contribuição importante no custo do produto. Estudos já comprovaram a viabilidade da produção de P(3HB) a partir de soro de leite (Wong e Lee, 1998). Este substrato possui entre outros componentes, 5% de lactose. Uma vez hidrolisada a glicose e galactose, este substrato pode ser utilizado para o crescimento de *Ralstonia eutropha*, conforme estudos realizados, anteriormente discutidos na seção 4.1.1. Foi então estudada a produção do copolímero neste substrato, utilizando-se algumas estratégias de alimentação de ácido propiônico durante a fase de produção visando a incorporação do monômero 3HV ao polímero. Estas estratégias foram: adição de ácido pela regulação de pH e alimentação em pulsos (item 3.5.4.3).

A estratégia de adição de ácido pela regulação de pH não se demonstrou adequada à utilização neste substrato pois não foi observada variação de pH durante a cultura, não requerendo a adição de ácido. Este fato pode ser explicado pela presença de substâncias tamponantes no soro que impediriam uma variação mais pronunciada do pH, inviabilizando esta estratégia de alimentação de ácido quando soro de leite é utilizado.

A segunda estratégia aplicada foi a de adição de ácido propiônico por pulsos. Este experimento foi conduzido em biorreator de 5 L, com alimentação em fósforo. O substrato disponível durante a fase de crescimento foi soro de leite hidrolisado, com uma concentração de 30 g.L<sup>-1</sup> de glicose. Como o soro de leite possui apenas 5% de lactose, é necessário um volume grande deste substrato para que se possa trabalhar com concentrações iniciais entre 10 e 30 g.L<sup>-1</sup>, conforme definido nos estudos preliminares. Assim, as alimentações ao longo da cultura, foram realizadas com açúcar invertido devido à limitação da capacidade do volume do biorreator. No

Anexo III (Figura A11) encontra-se a curva que representa as alimentações realizadas e no Anexo IV a curva que ilustra a evolução do pH durante a cultura (Figura A16).

A Figura 4.20 ilustra a evolução da biomassa residual, expressa em  $\ln$  durante a cultura. A linha pontilhada indica o momento em que ocorreu a limitação em fósforo. Durante a cultura, a concentração de fosfato não pode ser determinada pois o soro de leite possui pequena quantidade de fosfato ( $0,82 \text{ g.L}^{-1}$ ) e a forma em que este fosfato estava presente no soro provocava interferência na dosagem deste elemento através do método colorimétrico empregado. Assim, o momento da limitação foi determinado através do valor de absorbância que indicou a limitação em fósforo em ensaios anteriormente realizados. A partir deste momento determinava-se o início da alimentação em ácido propiônico para produção do copolímero conforme exposto na Tabela 4.6.



**Figura 4.20: Evolução da massa de biomassa residual durante a cultura conduzida com pulsos de ácido propiônico utilizando-se soro de leite como fonte de carbono**

Na Figura 4.21 observa-se um crescimento exponencial com velocidade específica de crescimento de  $0,23 \text{ h}^{-1}$  até aproximadamente 12 h de cultura, seguido de uma limitação no crescimento ( $\mu_{\text{max}}$  aproximadamente igual a  $0,04 \text{ h}^{-1}$ ). Os fatores



de conversão de açúcar invertido em biomassa obtidos foram respectivamente  $0,16 \text{ g.g}^{-1}$  e  $0,40 \text{ g.g}^{-1}$  para a fase de crescimento e fase de produção, respectivamente. As curvas que ilustram o cálculo destes são apresentadas no Anexo V (Figura A18). Cabe ressaltar que o valor obtido para o fator de conversão durante a fase de crescimento é bem inferior aos valores normalmente relatados na literatura (Aragão, 1996). Uma hipótese para a obtenção de um fator de conversão tão baixo é que a análise utilizada para dosagem do substrato foi o método de DNS (item 3.6.3), que dosa açúcares redutores. Sendo a lactose um dissacarídeo redutor, pode estar havendo uma superestimação do substrato realmente disponível para utilização pelo microrganismo.

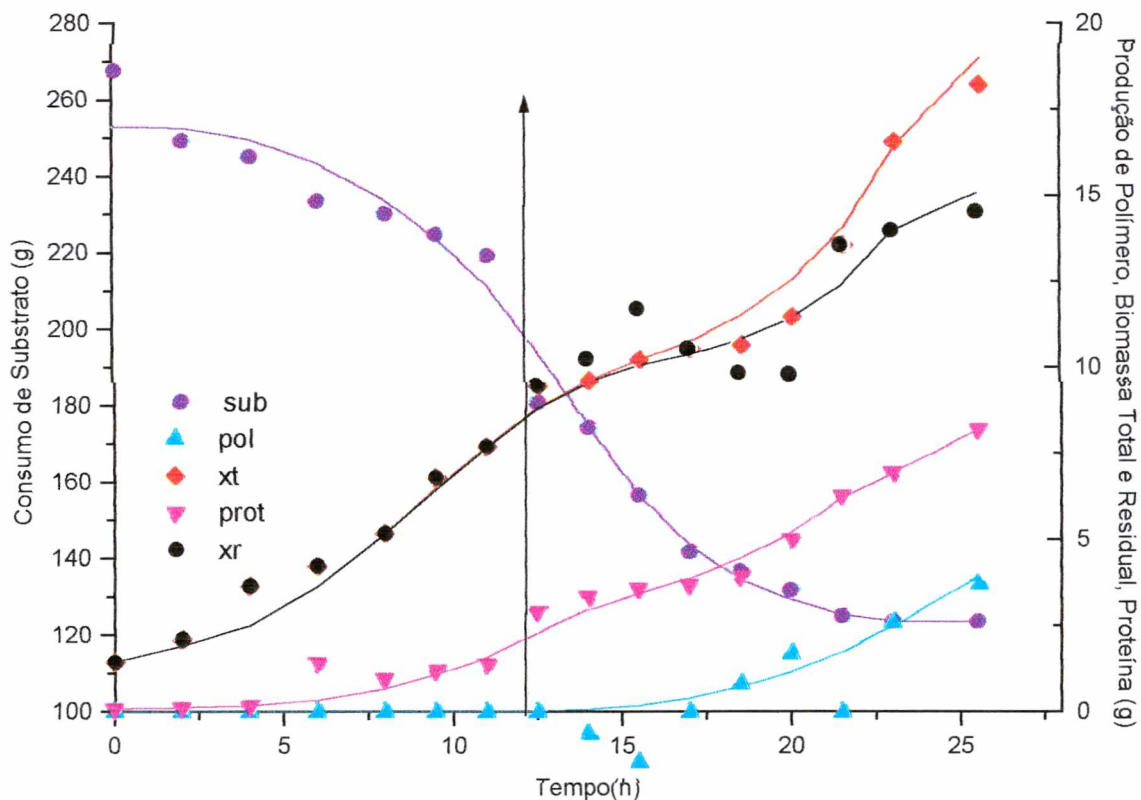
A Tabela 4.6 apresenta as alimentações realizadas durante a condução da cultura. A diferença na divisão entre propionato e ácido propiônico exposto na tabela está somente na forma de alimentação, uma vez o primeiro foi alimentado na forma de sal e o segundo, de ácido livre.

*Tabela 4.6: Alimentações realizadas durante a cultura em soro de leite.*

<b>Substrato</b>	<b>Momento</b>	<b>Conc. Final</b>	<b>Forma de Alim.</b>
Açúcar invertido	12,5 h	$30 \text{ g.L}^{-1}$	Pulso
Ácido propiônico	17 h	$1 \text{ g.L}^{-1}$	3 pulsos de seguidos de 3 pulsos de ácido intercalados por 1,5 h
Fosfato	17 h	$0,15 \text{ g.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ e $0,025 \text{ g.L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$	Aliment contínua vazão = $23 \text{ mL.h}^{-1}$

A Figura 4.21 apresenta a evolução da massa obtida de biomassa total e residual, de proteína, de polímero e a quantidade de substrato consumida. A linha perpendicular ao eixo das abscissas representa o momento em que ocorreu a limitação em fósforo. Apesar da diminuição da velocidade específica indicar claramente uma limitação do crescimento (Figura 4.20) as 12 horas, referente a esta limitação, a produção de polímero só começa a ocorrer por volta das 17 horas. É

possível que outros metabólitos tenham sido formados, principalmente entre o estágio em que a biomassa residual não cresce em fase exponencial e o início da produção de polímero. Apesar do acúmulo intracelular de polímero ter sido muito inferior ao esperado ( $0,21 \text{ gP(3HB-co-3HV).gcel}^{-1}$ ) em relação às culturas com açúcar invertido apresentadas na seção 4.2, a quantidade de 3HV incorporada foi aproximadamente 40% maior nesta cultura. Nenhuma quantidade de ácido propiônico foi encontrada nas análises, indicando que todo o ácido foi consumido assim que adicionado.



**Figura 4.21.: Evolução da formação de biomassa total (xt) e residual (xr), proteína (prot), acúmulo de polímero (pol) e consumo de substrato (sub) em função do tempo para a cultura com pulsos de ácido propiônico e soro de leite como fonte de carbono.**

A Figura 4.22 ilustra a evolução da massa do copolímero e dos monômeros obtidos e observa-se que além da produção de polímero ser mais tardia em relação ao crescimento exponencial, mais tarde ainda foi a produção de 3HV. No entanto,

este último apresentou um acúmulo exponencial, chegando a 1,46 g de 3HV em 3,93 g de polímero acumulado, correspondente a 37% do polímero. O fator de conversão (Anexo V – Figura A21) de ácido propiônico em 3-hidroxicinovelato foi 0,40  $\text{g.g}^{-1}$  correspondente a 0,22  $\text{mol.mol}^{-1}$ . Este valor está próximo ao obtido por Aragão (1996) de 0,4  $\text{mol.mol}^{-1}$  no cultivo de *Ralstonia eutropha* em glicose em carência ou alimentação de nitrogênio.

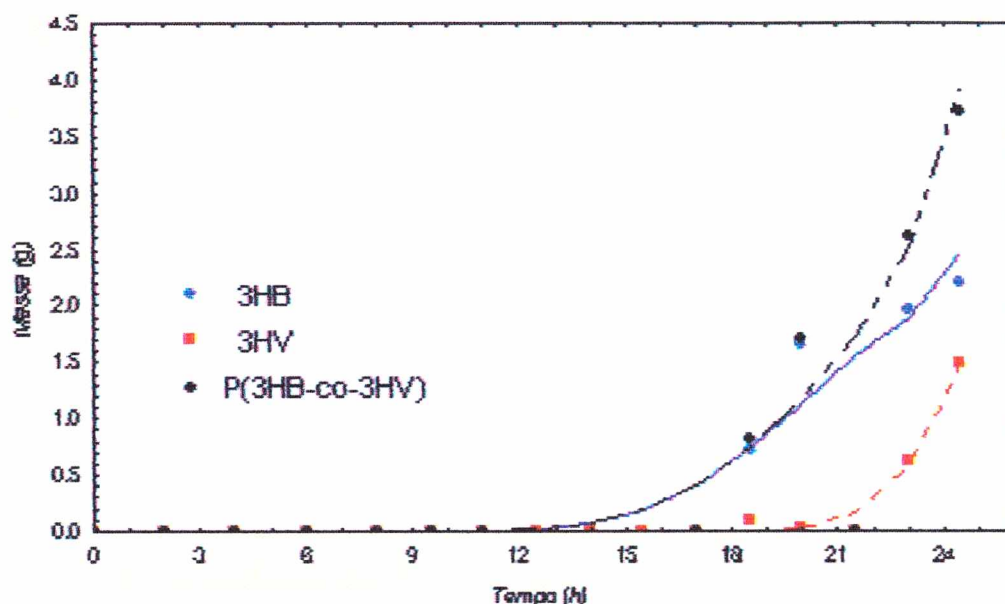
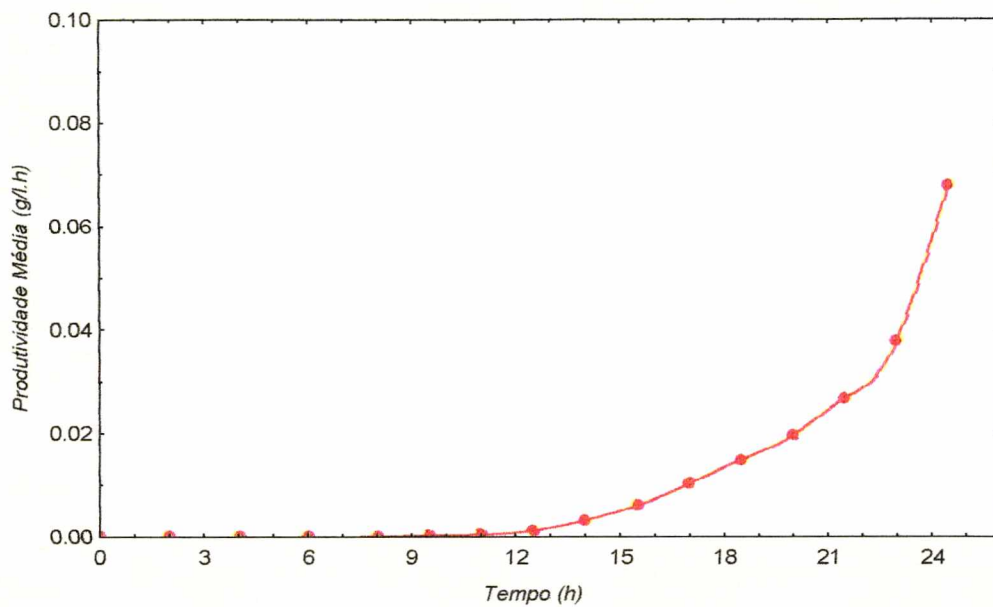


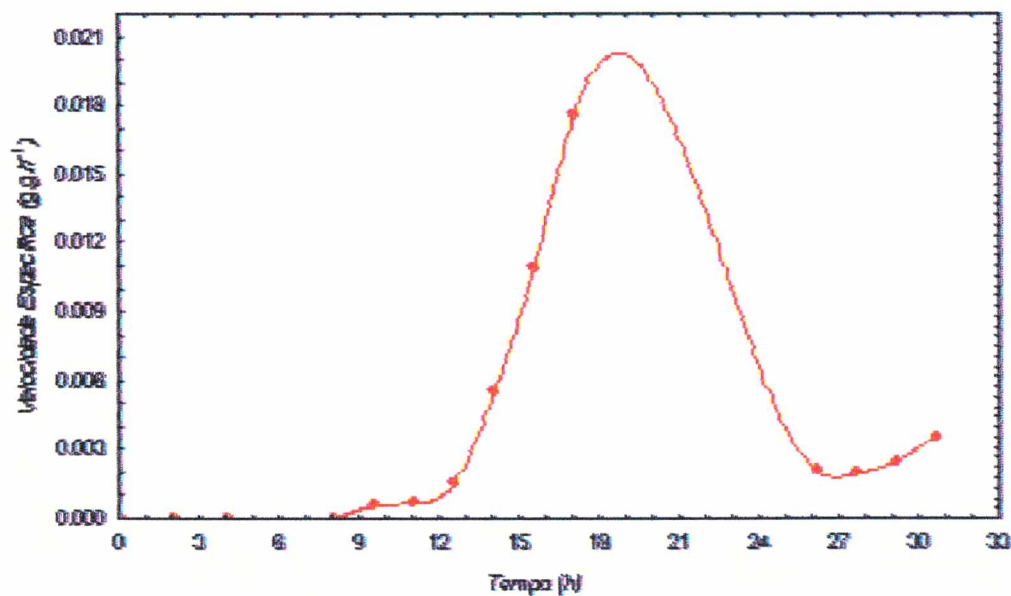
Figura 4.22: Evolução da massa do copolímero (P(3HB-co-3HV)) e dos monômeros 3HB e 3HV ao longo da cultura realizada com soro de leite

A produtividade média desta cultura é ilustrada na Figura 4.23. Esta apresentou um comportamento ascendente com o valor máximo de 0,07  $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  durante toda a cultura. Durante a fase de produção, a média deste valor foi de 0,17  $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ . O valor máximo obtido em produtividade média expressa em produção de 3HV, foi 0,014  $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Os cálculos destes parâmetros foram realizados conforme exposto nas seções 3.7.4 e 3.7.5.



**Figura 4.23: Produtividade ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) em soro de leite**

A Figura 4.24 demonstra o comportamento da velocidade específica de produção de P(3HB-co-3HV) nesta cultura conduzida com soro de leite. Observa-se um valor máximo de produção de polímero de  $0,020 \text{ g.g}^{-1}$ . Este valor é muito inferior ao obtido em culturas anteriormente relatadas.



**Figura 4.24: Velocidade específica ( $\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) de produção de P(3HB-co-3HV) obtida em soro de leite**

Os resultados apresentados demonstraram que o soro de leite é um substrato que pode ser utilizado para a produção de P(3HB-co-3HV). Entretanto, é necessário otimizar o acúmulo de polímero pois este esteve muito inferior à capacidade de acúmulo desta bactéria relatada na literatura. No entanto, os valores obtidos estão muito próximos aos obtido quando se trabalha com resíduos.

Dois estudos realizados com resíduos mostraram resultados muito próximos aos obtidos com soro de leite. *Azotobacter vinelandii* produziu  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa total com 34%(p/p) de P(3HB-co-3HV) com 7,9% mol 3HV a partir de resíduo da indústria de suínos. Suplementação em  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose aumentou para  $9,4 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa com 58,3% de P(3HB-co-3HV) e 4,3% de 3HV com produtividade de  $0,11 \text{ g.L.h}^{-1}$  (Cho et al., 1997). Lee et al., (1996) estudaram a produção de P(3HB) a partir de resíduos de destilarias alcólicas. *Actinobacillus sp* foi cultivado em meio de glicose e de resíduo não tratado, resíduo hidrolisado enzimaticamente e resíduo hidrolisado com ácido. O melhor resultado foi obtido com hidrólise enzimática produzindo  $4,83 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa com  $2,25 \text{ g.L}^{-1}$  de P(3HB). O valor obtido para a biomassa total quando cultivada com soro de leite foi  $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ , muito próximo aos dois estudos citados. Da mesma forma, a concentração de P(3HB-co-3HV) foi  $0,91 \text{ g.L}^{-1}$  com  $0,54 \text{ g.L}^{-1}$  de P(3HB) e  $0,36 \text{ g.L}^{-1}$  de P(3HV). É interessante observar que estes valores são muito próximos comparadas à utilização de outros resíduos. É possível que exista a influência da composição complexa destes resíduos na produção de polímero, estimulando a produção de 3HV e acumulando menos polímero do que em substratos simples.

#### **4.4 UTILIZAÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO COMO FONTE DE CARBONO PARA PRODUÇÃO DE P(3HB-co-3HV): ESTUDO DE ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO QUE INTERFEREM NA INCORPORAÇÃO DE 3HV NO POLÍMERO.**

Uma vez que o P(3HB) é um material rígido e quebradiço, a incorporação de unidades de 3HV é responsável pela melhoria nas características do copolímero P(3HB-co-3HV). Ocorrem alterações de parâmetros como níveis de cristalinidade e ponto de fusão, acarretando uma diminuição da rigidez do polímero e um aumento na resistência ao impacto. A incorporação de 3HV entre 17 a 20% mol permite a obtenção de um produto com propriedades termoplásticas que permitem maior aplicação do polímero (Holmes, 1985).

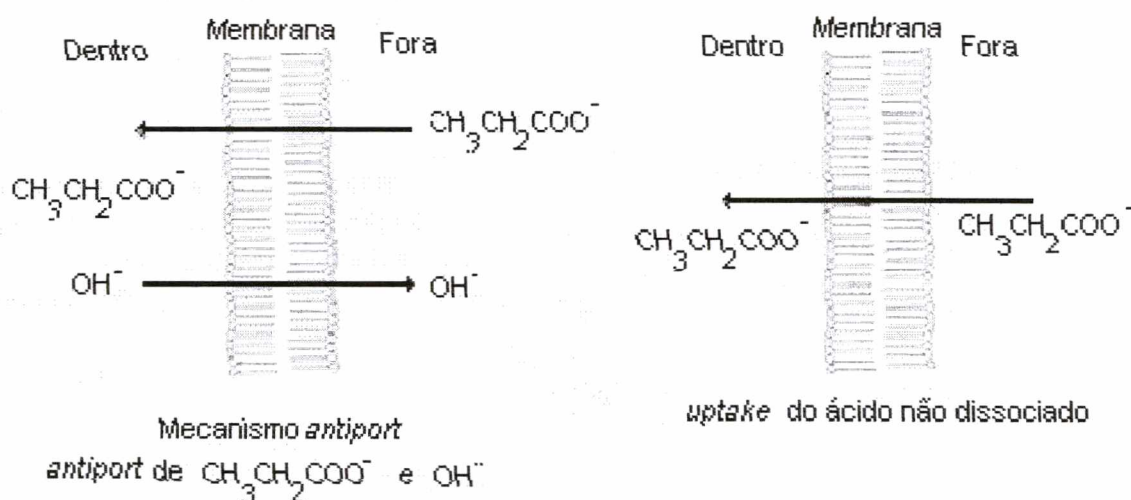
A partir de fontes de carbono como glicose e frutose, a *Ralstonia eutropha* produz apenas o homopolímero P(3HB). Para a produção do copolímero são necessários precursores que possam ser metabolizados a 3-hidroxivalerato. O ácido propiônico é um destes precursores. Entretanto, a bactéria pode também utilizá-lo para o crescimento celular, provocando a diminuição do fator de conversão de ácido propiônico em 3HV e encarecendo o processo. Este fato leva à adição deste precursor apenas durante a fase de produção. Sendo este um substrato que limita o processo em concentrações acima de 1 g.L<sup>-1</sup>, é necessário uma forma de alimentação que impeça esta inibição e, se possível, possa resultar em fatores de conversão de substrato em polímero mais altos.

Em virtude disto, três estratégias de alimentação de ácido propiônico foram propostas para o estudo da incorporação de unidades de 3HV no polímero: regulação de pH, pulsos e alimentação contínua do ácido. Em todas as culturas, o açúcar invertido foi utilizado como fonte de carbono, mantendo-se uma concentração ótima entre 10 g.L<sup>-1</sup> e 30 g.L<sup>-1</sup>. As curvas que representam as alimentações realizadas encontram-se no Anexo III (Figuras A12 e A13) e as curvas que ilustram a evolução do pH durante as culturas encontram-se no Anexo IV (Figura A15). Os ensaios foram realizados em biorreator de 5 L, com alimentação em fosfato conforme estudos anteriores.

### 3.4.1 Cultura utilizando-se Ácido Propiônico como Regulador de pH

A regulação de pH como estratégia de alimentação de ácido propiônico já foi utilizada em estudos anteriores com *Ralstonia eutropha* (Yoo et al, 1997; Kim et al, 1992) e foram baseados no trabalho de Visser e Postma (1973) que relataram detalhadamente o mecanismo de consumo de ácido propiônico e ácido acético em *Azotobacter vinelandii*.

Kim et al (1992) relataram que o pH do meio aumenta com o consumo de ácido propiônico e explanaram este mecanismo através dos estudos realizados por Visser e Postma. De acordo com o mecanismo por eles descrito, o propionato pode entrar na célula por duas maneiras: o ânion entra na célula através de um mecanismo "antiport" ou o ácido entra na célula na forma não dissociado. Não é claro qual mecanismo é o correto, mas em qualquer caso o pH do meio aumenta. Estes autores, descreveram um diagrama esquemático que representa o mecanismo sugerido por Visser e Postma (Figura 4.25).



**Figura 4.25:** Diagrama esquemático do mecanismo de consumo por *Azotobacter vinelandii* de ácido propiônico sugerido por Visser e Postma (1973) e descrito por Choi e Kim (1992).

Yoo et al (1997) acreditam que a inibição do crescimento celular de *Ralstonia eutropha* por ácido propiônico pode ser minimizada se o ácido existir na forma de ânion dissociada no caldo fermentativo. Isto pode ser explicado a partir da

equação de Henderson-Hasselbalch ( $\text{pH} = \text{pKa} + \log ([\text{A}]/[\text{AH}])$ ) na qual um aumento da forma dissociada ( $[\text{A}]$ ) em relação à concentração total de ácido ( $[\text{AH}]$ ) aumenta o pH do meio. O pKa do ácido propiônico é 4.85. Estes autores testaram diversos pHs iniciais com diferentes concentrações iniciais de ácido. No caso de pH inicial igual a 7,5, *R. eutropha* continuou a crescer em concentrações de até  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido, enquanto que em pH inicial de 6,5 nenhum crescimento ocorreu entre as concentrações iniciais de  $2 \text{ g.L}^{-1}$  e  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido propiônico.

Recentemente, esta estratégia também foi utilizada por Choi e Lee (1999b) em estudos com *Escherichia coli*, possibilitando a obtenção de altas concentrações celulares e de polímero acumulado.

Com base nesta explanação, a estratégia de regulação de pH é uma opção atrativa, uma vez que se trata de uma estratégia simples de alimentação, podendo ser facilmente aplicada industrialmente.

No início da fase de produção, foi dado um pulso com uma solução de propionato de forma a obter, naquele momento, uma concentração de ácido propiônico de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ . À medida que este ácido é consumido, o pH do meio de cultura se eleva e a através da regulação de pH adiciona-se ácido propiônico ao meio promovendo de novo a elevação do pH do meio a medida que este é consumido.

A cultura realizada com adição de ácido propiônico pela regulação de pH já foi apresentada anteriormente (item 4.2.2) quando foram comparados carência e alimentação em fósforo. Os mesmos dados serão agora utilizados para comparação das diferentes estratégias de alimentação de ácido propiônico.

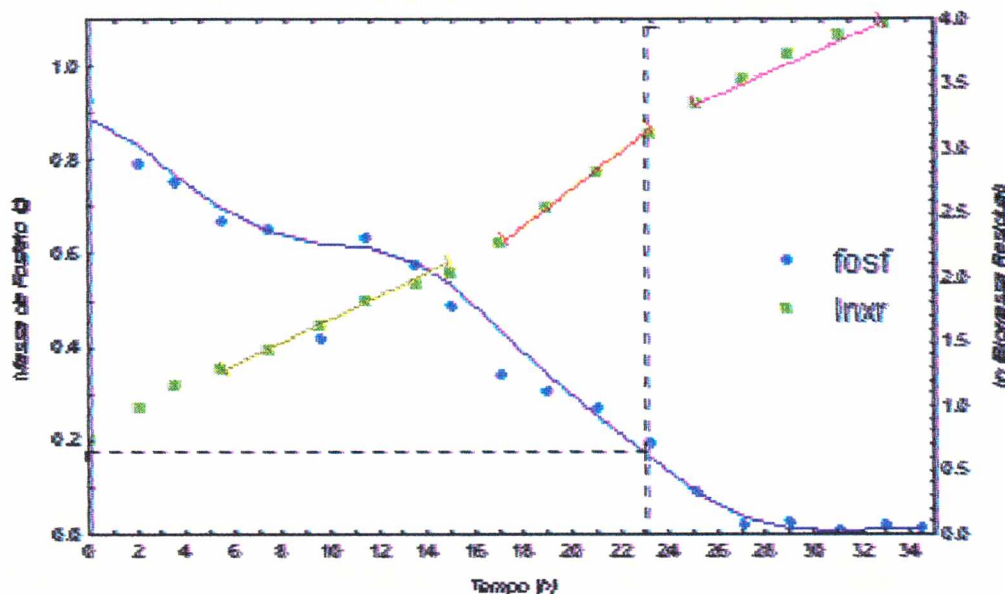
### **3.4.2 Cultura utilizando-se pulsos de Ácido Propiônico**

A segunda estratégia de alimentação de ácido propiônico utilizada foi a realização de pulsos de ácido durante a fase de produção. Estratégia semelhante foi utilizada por Anderson e Madden (1998) que trabalharam com várias estratégias de alimentação alternando alimentações de glicose e ácido propiônico para a produção de P(3HB-co-3HV). Os autores relataram que, mesmo sendo iguais as quantidades finais de alimentação destes substratos para todas as culturas, diferenças foram observadas na concentração final de biomassa e no acúmulo de



unidades de 3HV de acordo com a maneira da alimentação. A quantidade de 3HV incorporada foi maior quando se procederam a alimentações na forma de pulsos alternados do que quando glicose e ácido propiônico foram alimentados juntos.

Foi realizada uma cultura onde se fez alimentação de ácido propiônico durante a fase de produção, através de pulsos de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ , com intervalos de 1,5 h. Durante a cultura, o momento que determina o final da fase de crescimento foi determinado através da análise da concentração de fosfato no meio. Às 15 h de cultura a análise de fosfato indicava um concentração no meio de  $0,08 \text{ g.L}^{-1}$ , o que, segundo experimentos anteriores, mostrava o início da limitação do crescimento. Neste momento, foi realizado o primeiro pulso de propionato. Na cultura com regulação de pH, após o pulso do início da fase de produção, observou-se um aumento gradativo do pH do meio. Porém, o aumento rápido do pH nesta cultura indicou o consumo imediato do propionato, levando a crer que, possivelmente, a cultura ainda não estava em crescimento não limitado e que a análise de fosfato estivesse subestimando a quantidade de fosfato presente no meio naquele momento. Considerando que a concentração inicial de fosfato no meio era suficiente para produzir  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa, a limitação deveria ocorrer nesta concentração de biomassa. Assim, realizou-se a estimativa da biomassa total através de uma curva padrão ( $\text{Abs} \times \text{conc. da biomassa} - \text{g.L}^{-1}$ ) e seguiram-se os pulsos a partir do momento em que obteve-se esta concentração. Como observado na Figura 4.26, que descreve a evolução da concentração da biomassa residual (expressa em  $\ln$ ) e da massa de fosfato durante a cultura, este momento corresponde aproximadamente à mesma concentração de fosfato em que ocorreu a limitação em fósforo para a cultura conduzida com regulação de pH, ou seja,  $0,18 \text{ g}$  e  $0,05 \text{ g.L}^{-1}$  para massa e concentração de fosfato respectivamente. A fase de produção é caracterizada a partir de 23 horas, com velocidade específica de aproximadamente  $0,14 \text{ h}^{-1}$ . A linha pontilhada nesta figura indica o momento que se inicia a fase de produção, caracterizada pela limitação em fósforo.



**Figura 4.26: Evolução da concentração de biomassa residual (expressa em ln) e massa de fosfato em função do tempo para cultura alimentada com pulsos de ácido propiônico**

Observam-se duas inclinações diferentes durante a fase de crescimento na Figura 4.26. A primeira com uma velocidade específica de  $0,18 \text{ h}^{-1}$  até aproximadamente 15 horas e a segunda com velocidade específica de  $0,29 \text{ h}^{-1}$  até a fase de produção. Acredita-se então que esta segunda fase corresponda ao consumo do ácido propiônico para o crescimento, já que o primeiro pulso foi dado às 15 h. Aragão (1996) obteve um  $\mu_{\text{max}} = 0,25 \text{ h}^{-1}$  para *Ralstonia eutropha* utilizando ácido acético. Uma vez que estes dois ácidos têm mecanismos de assimilação semelhantes, acredita-se que o valor obtido para a segunda fase de crescimento seja atribuído ao consumo de ácido propiônico nesta etapa da cultura.

Ainda nesta figura é possível observar que a biomassa residual apresenta um crescimento durante a fase de produção, cujos cálculos correspondem a uma velocidade específica de crescimento igual  $0,14 \text{ h}^{-1}$ . Este valor está muito elevado comparando-se com a mesma velocidade para cultura com regulação de pH ( $0,05 \text{ h}^{-1}$ ), sugerindo que houve crescimento em função da forma de alimentação do ácido durante a fase de produção. A Tabela 4.7 apresenta o momento em que as alimentações foram realizadas para esta cultura. A diferença na divisão entre propionato e ácido propiônico exposto na tabela está somente na forma de

alimentação, uma vez o primeiro foi alimentado na forma de sal e o segundo, de ácido livre.

Tabela 4.7: Alimentações realizadas durante a cultura com pulsos .

<b>Substrato</b>	<b>Momento</b>	<b>Conc. Final</b>	<b>Forma de Alim.</b>
Açúcar invertido	15 h	30 g.L <sup>-1</sup>	Pulsos
	25,1 h		
Propionato	15 h , 25,1 h e 27,0 h	1 g.L <sup>-1</sup>	Pulsos
Ácido propiônico	29,2 h, 30,9 h e 32,8 h	1 g.L <sup>-1</sup>	Pulsos
Fosfato	15 h	0,15 g.L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .12 H <sub>2</sub> O e 0,025 g.L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Aliment contínua vazão = 23 mL.h <sup>-1</sup>

A Figura 4.27 apresenta a evolução das quantidades de biomassa total e residual, açúcar invertido, fosfato, proteína e polímero para esta cultura. A linha perpendicular ao eixo das abscissas indica o momento em que ocorre a limitação. Na fase de produção observa-se o crescimento linear da proteína e o crescimento não linear da biomassa residual, como exposto anteriormente. Este fato confirma o comportamento diferenciado em relação à cultura anterior, sugerindo o consumo de ácido propiônico para o crescimento durante a fase de produção. De fato, os valores obtidos para os fatores de conversão de substrato em biomassa total (Anexo V – Figura A19 e A20) obtidos foram 0,15 g.g<sup>-1</sup> para a primeira fase de crescimento, 0,61 g.g<sup>-1</sup> para a segunda fase de crescimento e 0,91 g.g<sup>-1</sup> para a fase de produção. Nenhuma quantidade de ácido propiônico foi detectada nas análises indicando que não houve acúmulo de ácido durante a cultura, ou seja, este foi totalmente consumido assim que adicionado. A massa de polímero acumulada durante a cultura foi de 13,92 g sendo 0,74 g de 3HV correspondente a 5% de polímero acumulado. O fator de conversão de ácido propiônico a 3-hidroxicvalerato (Anexo V – Figura A21) foi de 0,05 g.g<sup>-1</sup> correspondente a 0,037 mol.mol<sup>-1</sup>.

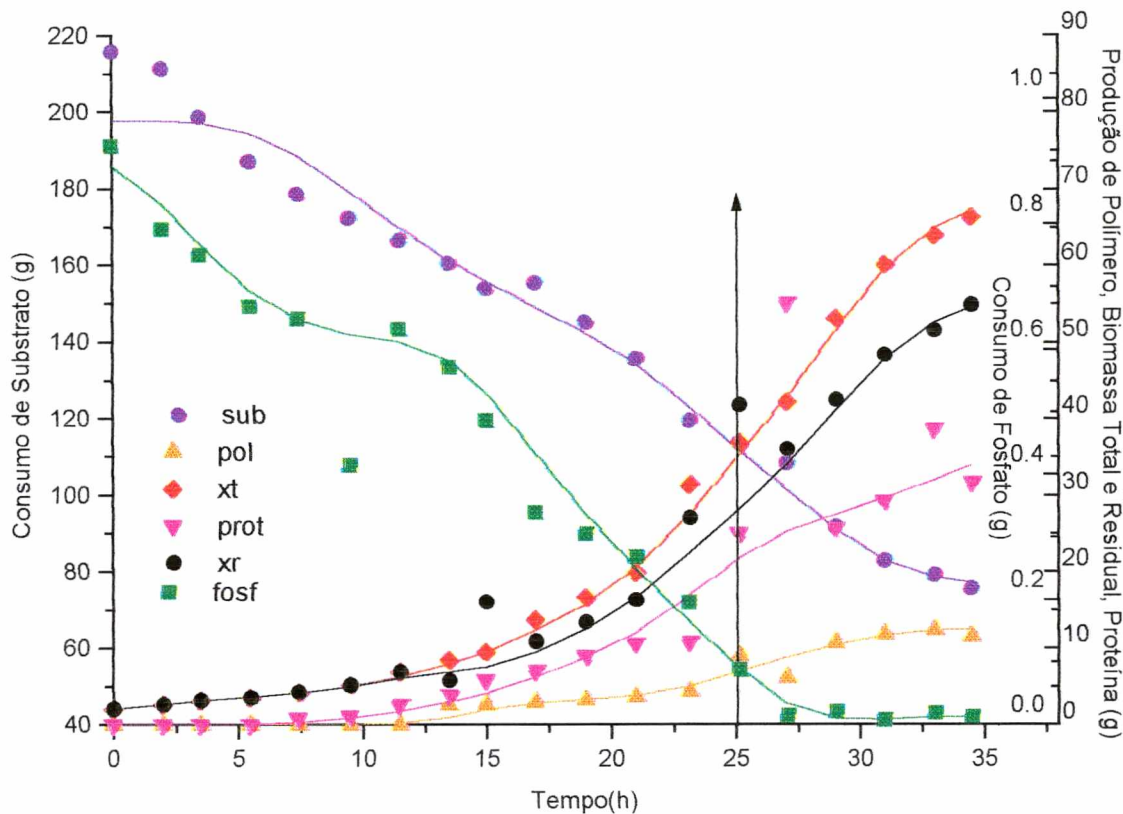


Figura 4.27: Evolução das quantidades de biomassa total (xt) e residual (xr), proteína (prot), fosfato (fosf), açúcar invertido (sub) e polímero (pol) em função do tempo para a cultura utilizando pulsos de ácido propiônico

### 3.4.3 Cultura utilizando-se alimentação contínua de Ácido Propiônico

Propôs-se uma alimentação contínua de ácido propiônico, baseada em estudos anteriores por Anderson e Madden (1998). Estuda-se a possibilidade de uma vazão pequena de ácido propiônico fornecida constantemente, induzir a bactéria a uma maior produção de 3HV. A alimentação foi realizada através de uma bomba peristáltica com uma vazão de 15 mL/h de uma solução 80 g.L<sup>-1</sup> a partir do instante em que iniciou-se a fase de produção., com uma concentração aproximada no meio de 0,4 g.L<sup>-1</sup>.

A alimentação contínua iniciou-se em 15 horas em virtude do resultado da análise de fosfato indicar a concentração correspondente à limitação. Devido a um problema inicial na alimentação pela bomba, uma quantidade excessiva de ácido foi

adicionada. A Figura 4.28 ilustra a evolução da biomassa residual e da massa de fósforo em função do tempo. Observa-se o momento da limitação de fósforo em 0,32 g correspondente a 0,08 g.L<sup>-1</sup> (caracterizado pela linha pontilhada). Da mesma forma que apresentado para a cultura com pulsos de ácido propiônico, na fase de crescimento pode ser visualizado duas fases distintas. A primeira fase, com uma velocidade específica de crescimento de 0,21 h<sup>-1</sup>, corresponde ao crescimento em açúcar invertido. Em 14 horas - momento em que se inicia a segunda fase - a velocidade específica de crescimento é de 0,34 h<sup>-1</sup>, indicando a preferência de consumo de ácido propiônico pelo microrganismo. Ambos os valores são mais elevados do que os obtidos na cultura em pulsos, mas, indicam o consumo de açúcar invertido, seguido do consumo de ácido propiônico. A fase de produção iniciou-se em 19,5 horas com uma velocidade específica de crescimento de aproximadamente 0,05 h<sup>-1</sup>.

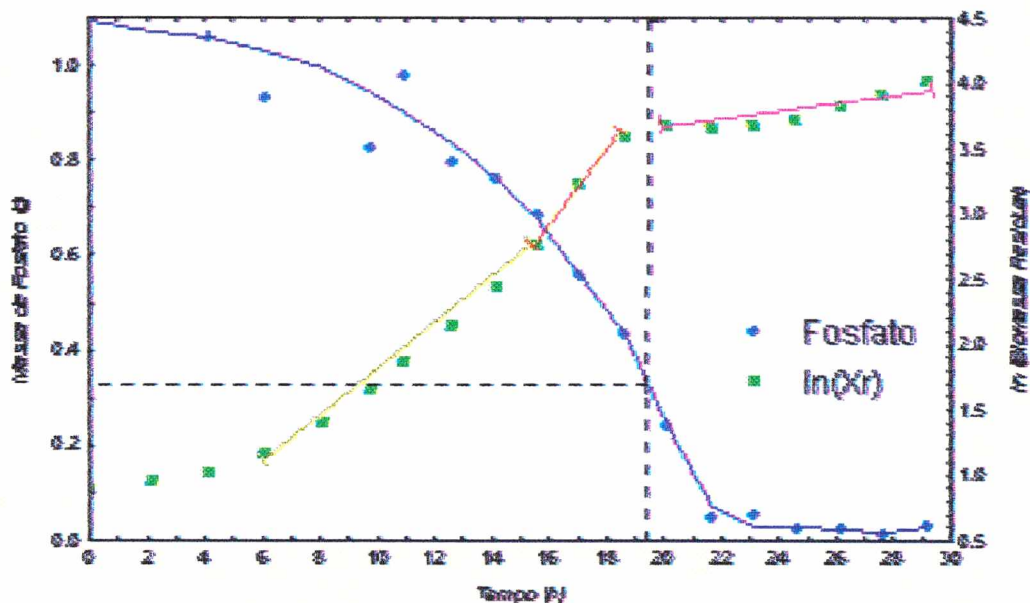


Figura 4.28: Evolução da biomassa residual e da massa de fósforo em função do tempo para a cultura conduzida com alimentação contínua de fósforo

A Tabela 4.8 apresenta as alimentações realizadas durante esta cultura.

Tabela 4.8: Alimentações realizadas durante a cultura com alimentação contínua.

<b>Substrato</b>	<b>Momento</b>	<b>Conc. Final</b>	<b>Forma de Alim.</b>
Açúcar invertido	15,5 h	30 g.L <sup>-1</sup>	Pulso
	23,0 h		
Ácido propiônico	15,5 h	1 g.L <sup>-1</sup>	Aliment contínua vazão – 15 mL.h <sup>-1</sup>
Fosfato	15,5 h	0,15 g.L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .12 H <sub>2</sub> O e 0,025 g.L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Aliment contínua vazão = 23 mL.h <sup>-1</sup>

Os fatores de conversão de açúcar invertido em biomassa total para a primeira e a segunda fase de crescimento foram respectivamente 0,19 g.g<sup>-1</sup> e 0,43 g.g<sup>-1</sup>. Para a fase de produção foi 0,44 g.g<sup>-1</sup>. As curvas que ilustram estes cálculos encontram-se no Anexo V (Figura A20).

Na Figura 4.29 visualiza-se a evolução das quantidades de biomassa total e residual, proteína, polímero, fosfato e açúcar invertido para esta cultura. As curvas da biomassa (total e residual) e da proteína crescem exponencialmente até o início da fase de produção (19,5 horas - indicado pela linha perpendicular ao eixo das abscissas). Observa-se então um comportamento entre 19,5 h e 22 horas que pode ser resultado da alimentação excessiva de ácido propiônico provocando inibição ao crescimento celular e da produção de P(3HB-co-3HV), apesar de não ser detectada nenhuma concentração de ácido nas análises realizadas. A partir de 22 h, a curva de biomassa residual apresenta um comportamento praticamente exponencial, e a produção de P(3HB-co-3HV) apresenta uma tendência linear e não exponencial a partir deste momento.

A produção de polímero foi de 13,95 g com 2,42 g de 3-hidroxicincomato, que correspondem a 26% do acúmulo de P(3HB-co-3HV). O fator de conversão de ácido propiônico a 3HV foi de 0,18 g.g<sup>-1</sup> que correspondem a 0,13 mol.mol<sup>-1</sup> (Anexo V – Figura A21).

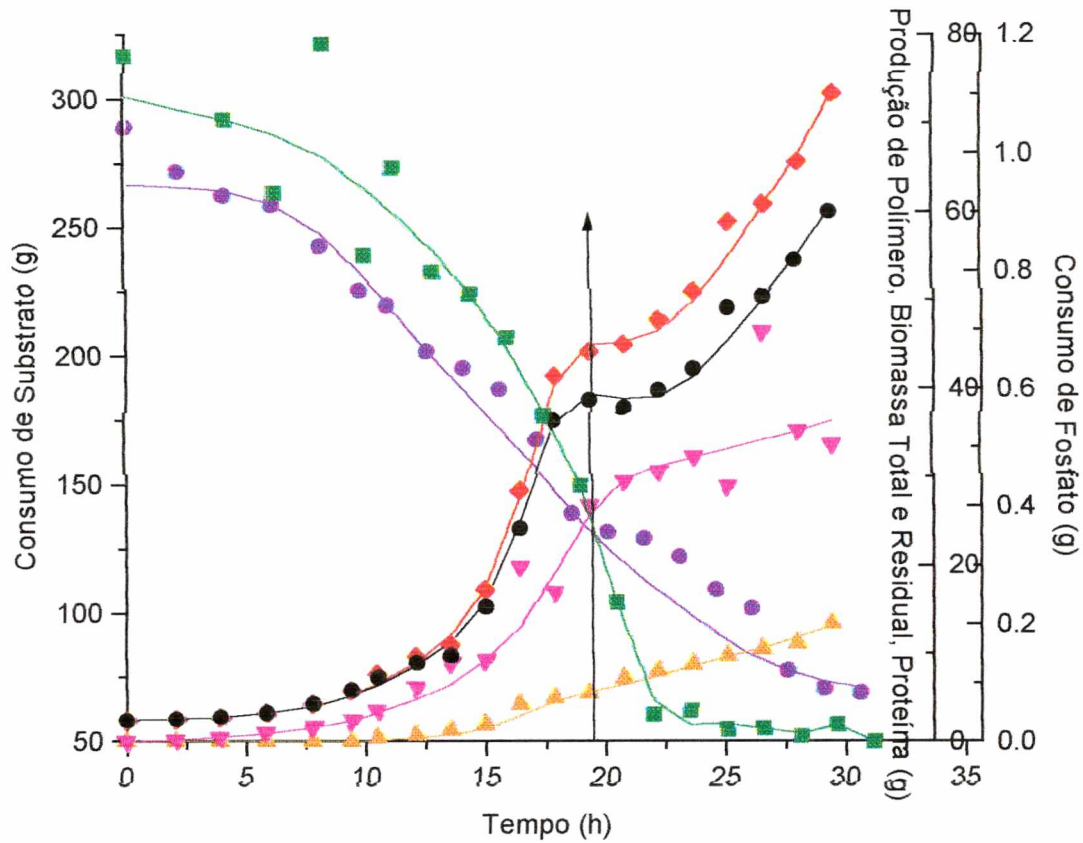


Figura 4.29: Evolução das quantidades de biomassa total ( $x_t$ ) e residual ( $x_r$ ), proteína (prot), fosfato (fosf), açúcar invertido (sub) e polímero (pol) em função do tempo para a cultura utilizando alimentação contínua de ácido propiônico

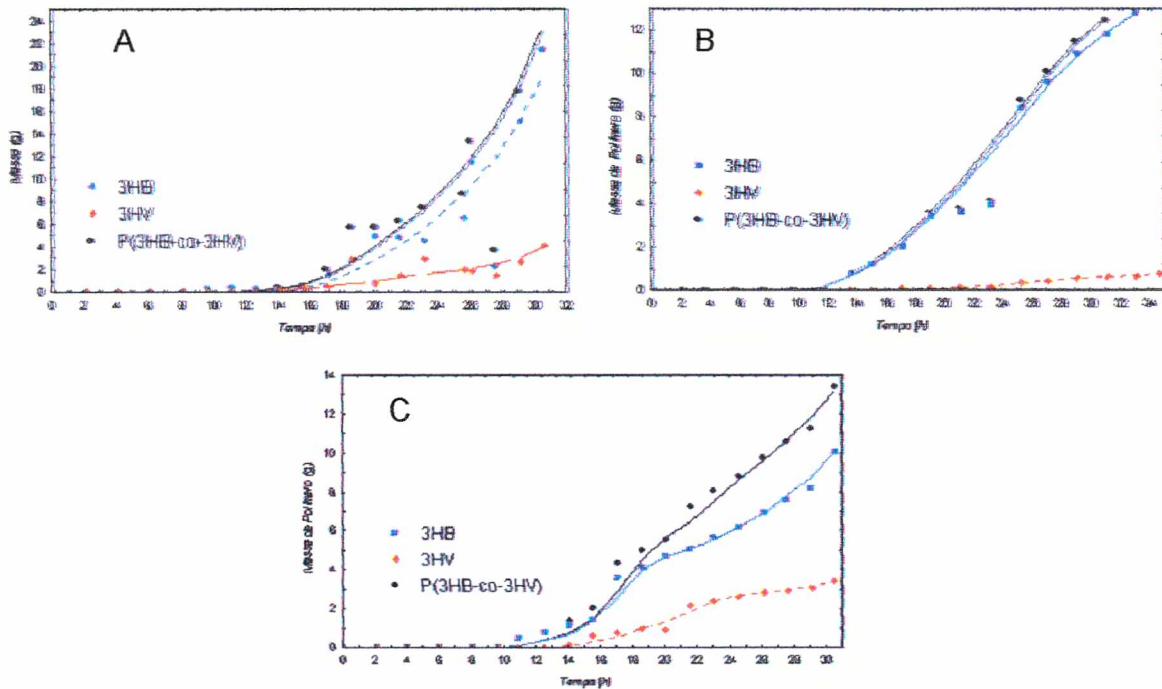
#### 4.4.4 Comparação entre as estratégias utilizadas

A Tabela 4.9 resume os resultados finais obtidos para as estratégias apresentadas.

Tabela 4.9.: Resumo dos resultados obtidos nas três estratégias empregadas

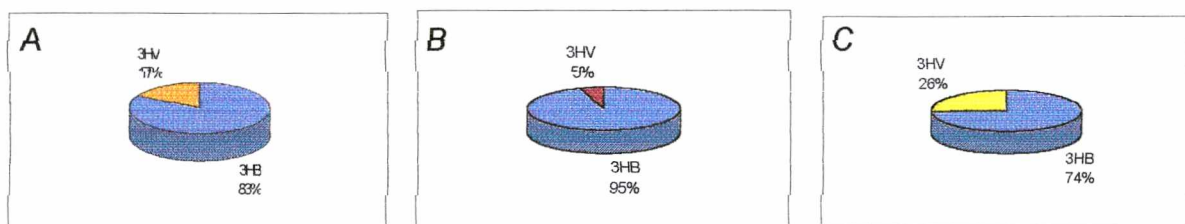
<b>Estratégia</b>	<b>Tempo de Cultura (h)</b>	<b><math>X_T</math> (g)</b>	<b><math>X_R</math> (g)</b>	<b>Polímero (g)</b>	<b>Proteína (g)</b>
Regulação de pH	30,5	74,2	49,2	22,7	43,9
Pulsos	34,4	67,1	53,2	13,9	33,9
Aliment. Contínua	30,5	73,5	60,1	13,4	33,7

Observa-se que a estratégia que apresentou maior acúmulo de polímero foi a de regulação de pH. A Figura 4.30 ilustra os acúmulo de polímero e a composição deste nas três culturas.



**Figura 4.30: Evolução do acúmulo de P(3HB-co-3HV) e dos monômeros 3HB e 3HV em função do tempo para as culturas com regulação de pH (A), pulsos (B) e alimentação contínua(C)**

A Figura 4.31 ilustra a quantidade de 3HV presente na molécula de cada polímero no final das culturas. Esta figura ilustra que a estratégia de pulsos foi a que obteve menor incorporação de 3HV na molécula de polímero. Os resultados obtidos indicaram a estratégia de alimentação contínua como a que proporcionou mais acúmulo de 3HV (26%).



**Figura 4.31: Composição final de P(3HB-co-3HV) em termos de 3HB e 3HV para as culturas com regulação de pH (A), pulsos(B) e alimentação contínua(C)**



É importante ressaltar que em nenhuma cultura foi detectado acúmulo de ácido propiônico no meio. De acordo com as análises cromatográficas, todo o ácido introduzido no meio foi prontamente consumido.

A Tabela 4.10 resume os fatores de conversão obtidos para as culturas realizadas. A primeira e a segunda fase expostas para os valores do fator de conversão de substrato em biomassa correspondem às fases de crescimento discutidas na Figuras 3.26 e 3.28 para as culturas com pulsos e alimentação contínua, respectivamente.

Tabela 4.10 Fatores de Conversão de Açúcar invertido em biomassa total na fase de crescimento ( $Y_{Xt/S \text{ cresc}}$ ) e produção ( $Y_{Xt/S \text{ prod}}$ ) e de ácido propiônico em 3-hidroxicinovelato ( $Y_{3HV/\text{ácido}}$ ) em massa e em mol para as culturas realizadas

	$Y_{Xt/S\text{-cresc}}$ ( $g \cdot g^{-1}$ )		$Y_{Xt/S\text{-prod}}$ ( $g \cdot g^{-1}$ )	$Y_{3HV/\text{ácido}}$ ( $g \cdot g^{-1}$ )	$Y_{3HV/\text{ácido}}$ ( $mol \cdot mol^{-1}$ )
	1ª fase	2ª fase			
Reg. PH	0,40		0,50	0,04	0,03
Pulsos	0,15	0,61	0,91	0,05	0,03
Contínua	0,19	0,43	0,44	0,18	0,13

Pelos elevados valores obtidos para os fatores de conversão durante a cultura com pulsos, nota-se que houve o consumo de ácido propiônico concomitante ao consumo de açúcar invertido para a produção de biomassa. Quanto aos fatores de conversão de ácido propiônico em 3-hidroxicinovelato, os valores obtidos foram inferiores aos relatados na literatura (Aragão, 1996). Uma explicação para este fato é que a quantidade de ácido propiônico utilizada nestes cálculos foi estimada pela avaliação da quantidade adicionada ao meio, considerando-se que a análise de ácido propiônico indicava o total consumo deste substrato. Esta forma de cálculo pode ter levado a erros nestes valores.

Para uma análise mais detalhada, analisou-se a produtividade em polímero e em 3HV das três culturas estudadas. As Figuras 4.32 e 4.33 ilustram a evolução destas produtividades em função do tempo. Obtiveram-se valores de produtividade média de  $0,19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,  $0,04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  e  $0,14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para as culturas realizadas com regulação de pH, pulsos e alimentação contínua, respectivamente.

De fato, a cultura com regulação de pH acumulou quantidades maiores de polímero. A produtividade média durante a fase de produção foi de  $0,74 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para a cultura de regulação de pH,  $0,54 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para a cultura de pulsos  $0,20 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para a cultura com alimentação contínua. Os cálculos destes parâmetros foram realizados conforme exposto nos itens 3.7.4 e 3.7.5.

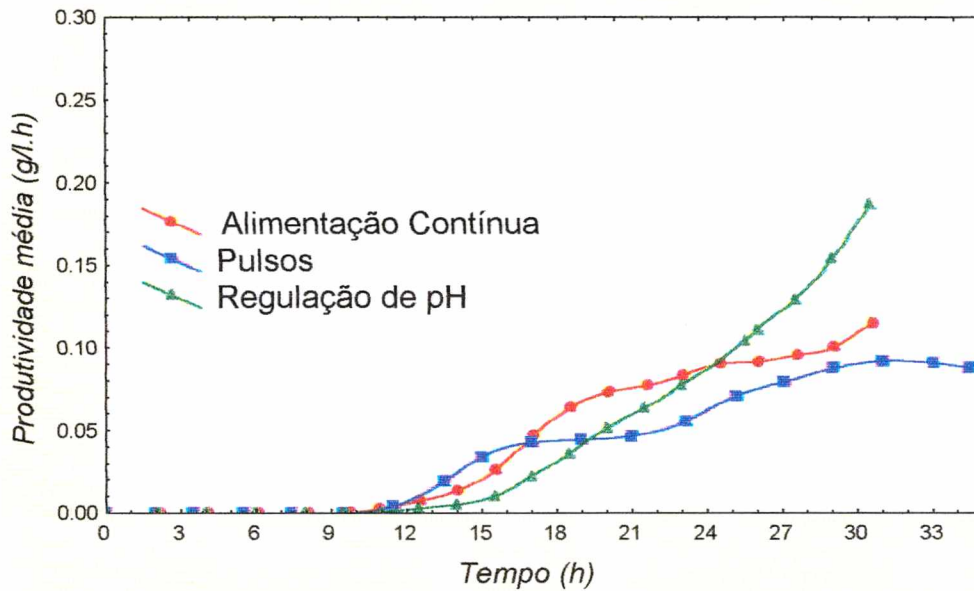


Figura 4.32.: Produtividade em polímero expressa em  $(\text{g. L}^{-1}\text{h}^{-1})$  durante as culturas as quais se utiliza as três estratégias estudadas.

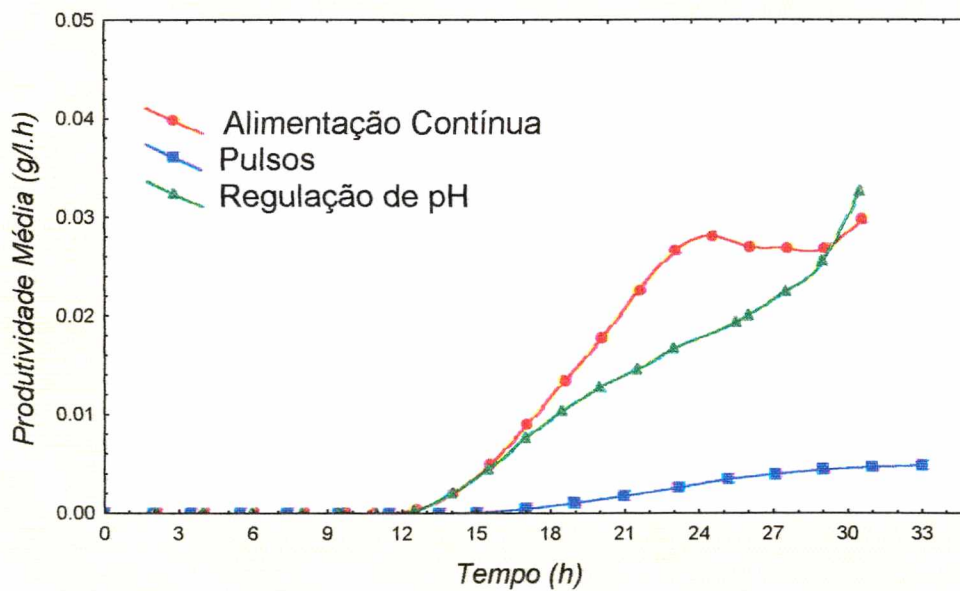


Figura 4.33: Produtividade em 3HV ( $\text{g 3HV.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) para as três estratégias analisadas.

A produtividade em 3HV foi praticamente a mesma para as culturas com alimentação contínua ( $0.003 \text{ g3HV}, \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) e regulação de pH ( $0.0032 \text{ g3HV}, \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) superiores à cultura com alimentação em forma de pulsos ( $0.0004 \text{ g3HV}, \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

A Figura 4.34 ilustra o comportamento da velocidade específica de produção de P(3HB-co-3HV) e a Figura 4.35 apresenta o comportamento da velocidade específica de produção de P(3HV) durante as culturas estudadas. Observa-se em ambas as figuras que a cultura com regulação de pH apresenta um comportamento ascendente, apresentando o valor final mais alto. A cultura em alimentação contínua apresenta valores de velocidade altos, porém estes não se mantêm até o fim da cultura.

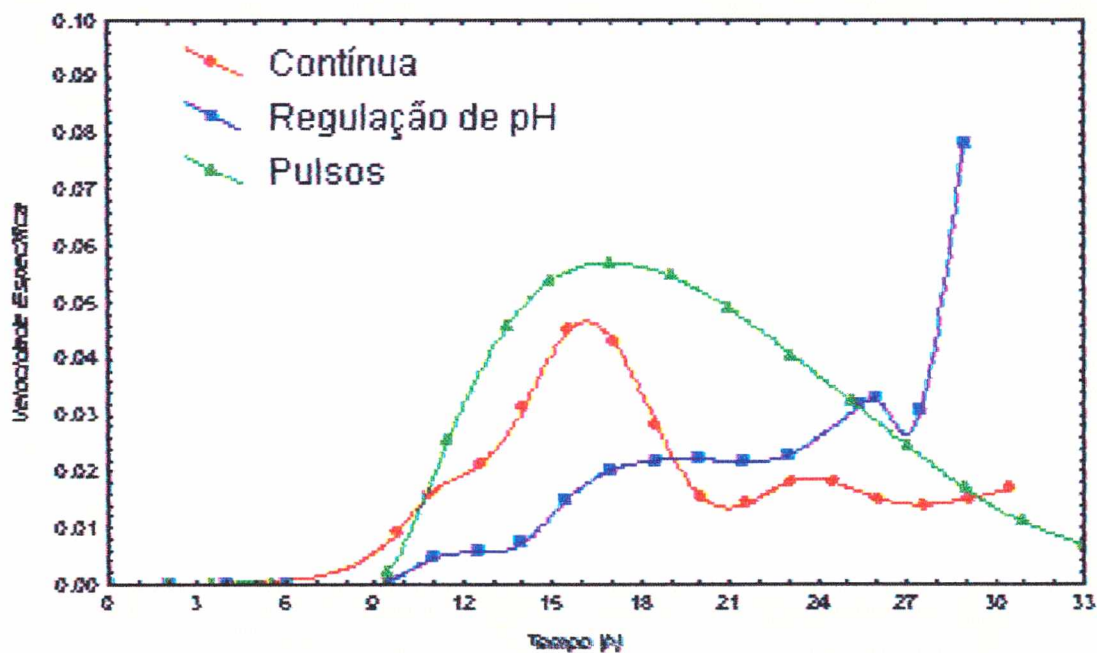


Figura 4.34: Velocidade específica de produção de P(3HB-co-3HV) durante as culturas estudadas

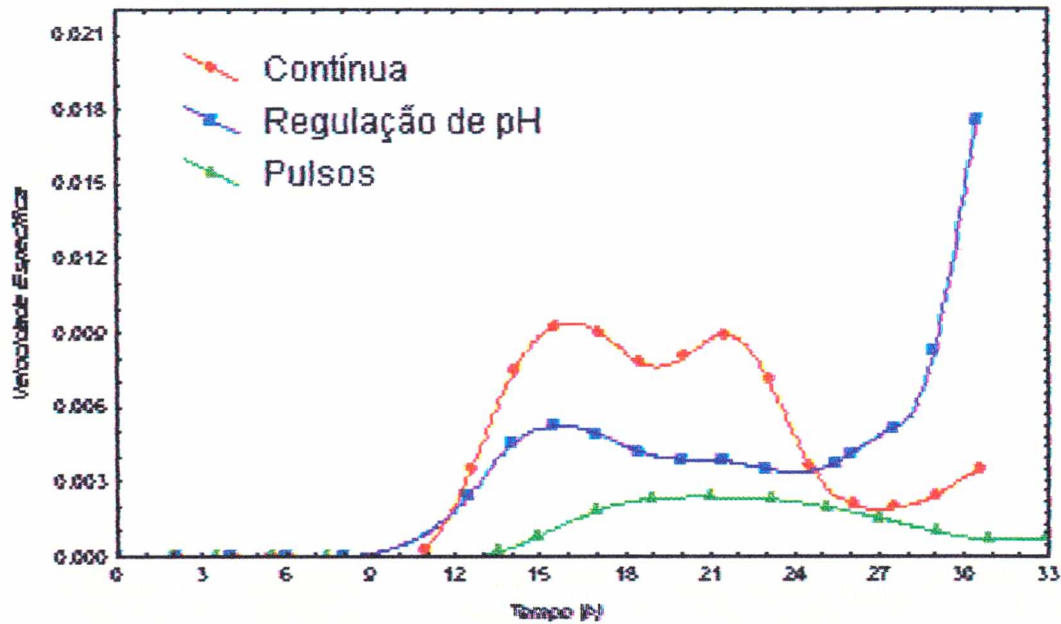


Figura 4.35: Velocidade específica de produção de 3HV durante as culturas estudadas

A cultura realizada com pulsos de ácido propiônico foi a que apresentou os menores valores para todos os parâmetros estudados. Anderson e Madden (1998) trabalharam com esta estratégia e observaram que mesmo com o decréscimo da produtividade decaindo, a incorporação final de 3HV é maior comparada com outras culturas. Este fato não foi observado neste experimento. A cultura que apresentou maior acúmulo de polímero foi aquela na qual se usou a de regulação de pH. Os valores de produtividade e de velocidade específica de produção apresentaram uma curva ascendente sem quedas em seu comportamento. O mesmo comportamento não foi observado na cultura com alimentação contínua, na qual há quedas nas curvas de produtividade e velocidade específica de produção. No entanto, esta cultura foi a que proporcionou maior acúmulo de 3-hidroxicinamato, e este ponto é interessante do ponto de vista comercial. Assim, buscaram-se alternativas para otimizar a produção com alimentação contínua de ácido propiônico durante a fase de produção.

## 4.5 ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO COMO INDUTOR AO ACÚMULO DE POLÍMERO

Estudos recentes (Lee et al., 1999) mostraram a influência de utilização de suplementos à cultura que visa a produção do copolímero P(3HB-co-3HV) para favorecer a conversão de ácido propiônico em 3HV. O ácido oleico foi usado como suplemento no cultivo de *Escherichia coli* e observaram o aumento no acúmulo de P(3HB-co-3HV). Uma das explicações para o uso deste suplemento é que se acredita-se que, se o ácido oleico for preferencialmente utilizado pela bactéria para o crescimento durante a fase de produção, o ácido propiônico será desviado para a produção de 3HV, melhorando o fator de conversão do precursor em 3HV e diminuindo o custo de produção, já que o ácido propiônico é um substrato de custo elevado.

Baseado nos experimentos descritos na seção 4.4, foi realizada uma cultura com alimentação contínua de ácido propiônico durante a fase de produção pois esta estratégia foi a que proporcionou maior incorporação de 3HV na molécula de polímero.

### ***4.5.1 Cultura utilizando-se alimentação contínua de Ácido Propiônico com suplementação em ácido oleico***

Mantiveram-se as mesmas condições descritas para a cultura com alimentação contínua de ácido propiônico adicionando-se somente um suplemento durante a fase de produção. O ácido oleico foi adicionado no início da fase de produção. A concentração utilizada por Lee et al. (1999), foi de 1 g.L<sup>-1</sup> em produção de P(3HB-co-3HV) a partir de *Escherichia coli*. Para garantir que nenhum tipo de limitação ocorreria em *Ralstonia eutropha*, decidiu-se utilizar apenas um terço desta concentração, ou seja, 0,3 g.L<sup>-1</sup>. A Tabela 4.11 apresenta as alimentações realizadas durante a cultura com alimentação contínua de ácido propiônico e suplementação em ácido oleico.

Tabela 4.11: Alimentações realizadas durante a cultura com ácido oleico.

<b>Substrato</b>	<b>Momento</b>	<b>Conc. Final</b>	<b>Forma de Alim.</b>
Açúcar invertido	13,2 h	30 g.L <sup>-1</sup>	Pulso
	20,5 h		
Ácido propiônico	16 h	1 g.L <sup>-1</sup>	Aliment contínua Vazão = 15 mL.h <sup>-1</sup>
Ácido oleico	16 h	0,3 g.L <sup>-1</sup>	Pulso
Fosfato	16 h	0,15 g.L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .12 H <sub>2</sub> O e 0,025 g.L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Aliment contínua vazão = 23 mL.h <sup>-1</sup>

A Figura 4.36 apresenta a evolução da massa de biomassa residual (expressa em ln) e massa de fosfato em função do tempo. A velocidade específica máxima de crescimento foi de 0,20h<sup>-1</sup> até aproximadamente 19 horas de fase de crescimento. A velocidade específica máxima na fase de produção foi de aproximadamente 0,05 h<sup>-1</sup>. Pela análise desta figura, nota-se que neste momento (indicado pela linha pontilhada) correspondente a 0,08 g de fosfato equivalente a 0,03 g.L<sup>-1</sup>. A concentração de fosfato a partir da qual é observada a limitação do crescimento para esta cultura (indicado pela linha pontilhada) é bem menor do que a concentração observada na cultura onde não houve suplementação (0,08 g.L<sup>-1</sup>). Uma das hipóteses para esta mudança pode ser que o ácido oleico tenha estimulado o crescimento durante esta fase, induzindo a limitação do nutriente a acontecer a menores concentrações de fosfato. Durante a cultura, as alimentações de ácido oleico e ácido propiônico foram realizadas em 16 h, baseado na análise de fosfato que indicava a limitação deste nutriente.

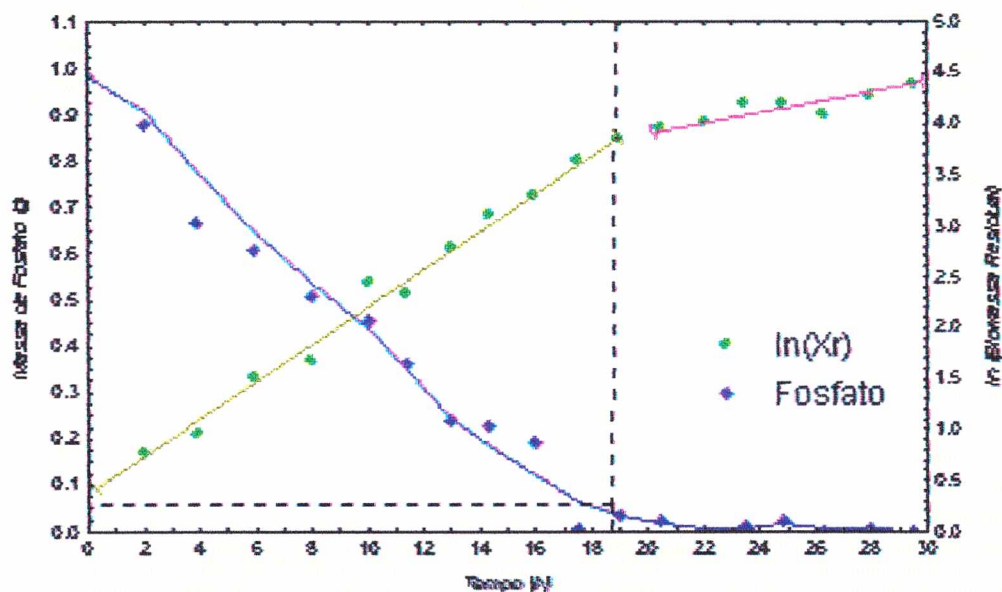


Figura 4.36: Evolução da biomassa residual e da massa de fosfato para a cultura alimentada com pulsos de ácido propiônico e suplementada com ácido oleico

A Figura 4.37 ilustra a evolução das quantidades da biomassa total e residual, proteína, fosfato, polímero e açúcar invertido na cultura quando ácido oleico foi utilizado como suplemento com o ácido propiônico fornecido em alimentação constante. Observa-se um comportamento exponencial na curva de produção de P(3HB-co-3HV) no início da fase de produção seguido de um período no qual a produção torna-se linear. A linha perpendicular ao eixo das abscissas representa o momento em que ocorreu a limitação em fósforo.

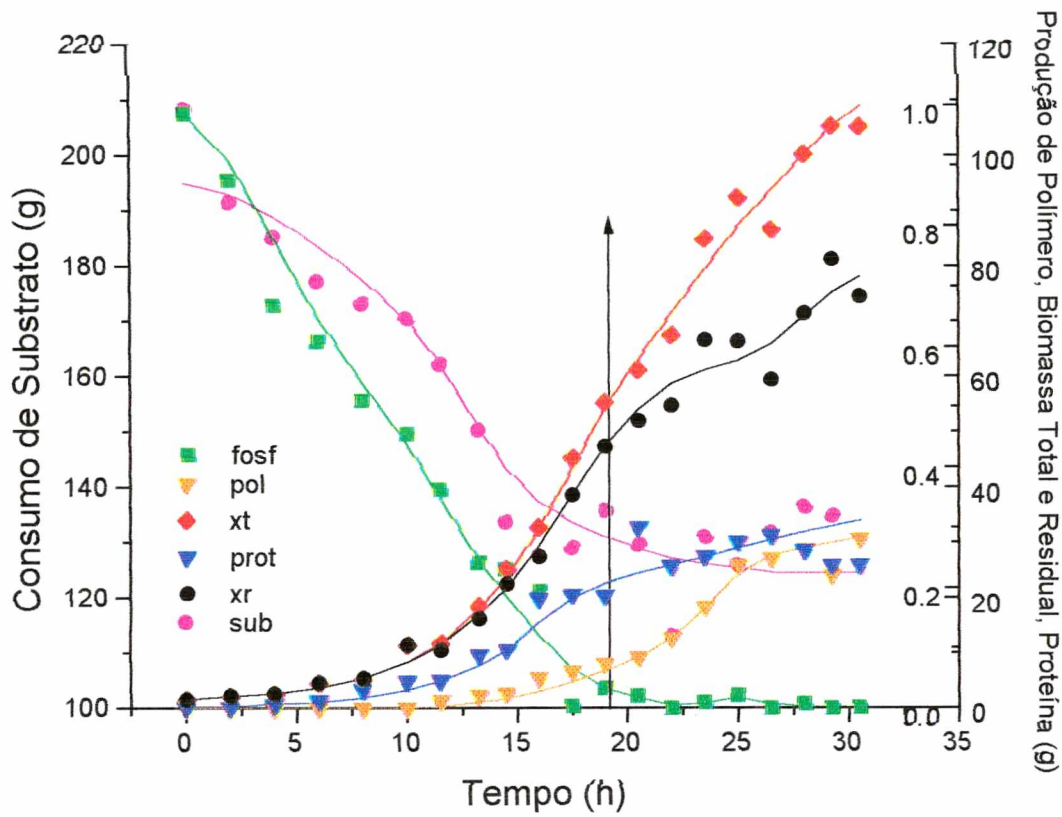


Figura 4.37: Evolução das quantidades de biomassa total (xt) e residual (xr), proteína (prot), fosfato (fosf), polímero (pol) e açúcar invertido (sub) em função do tempo para a cultura com alimentação contínua de ácido propiônico e suplementada com ácido oleico

### 4.5.2 Comparação entre as culturas

A Tabela 4.12 apresenta um resumo dos resultados finais obtidos para as duas culturas com e sem suplementação de ácido oleico. São apresentados o tempo de cultura, quantidades de biomassa total ( $X_T$ ), biomassa residual ( $X_R$ ), polímero e proteína acumulados até o final da cultura. Percebe-se que a produção de biomassa foi muito maior na cultura com suplementação, havendo igualmente uma maior produção de polímero que representa 18,3 e 28,3% nas culturas sem suplementação e com suplementação, respectivamente.



Tabela 4.12.: Resultados obtidos para as culturas com e sem suplementação de ácido oleico

<b>Estratégia</b>	<b>Tempo de Cultura (h)</b>	<b><math>X_T</math> (g)</b>	<b><math>X_R</math> (g)</b>	<b>Polímero (g)</b>	<b>Proteína (g)</b>
Sem suplement	30,5	73,5	60,1	13,4	56,2
Com suplement	30,5	109,0	78,7	30,9	43,4

A produção de P(3HB-co-3HV) e a sua composição em 3HB e 3HV é apresentada na Figura 4.38, para as duas culturas estudadas. A produção de P(3HB-co-3HV) foi de 30,9 g de polímero comparado com 13,4 g para a cultura sem suplementação.

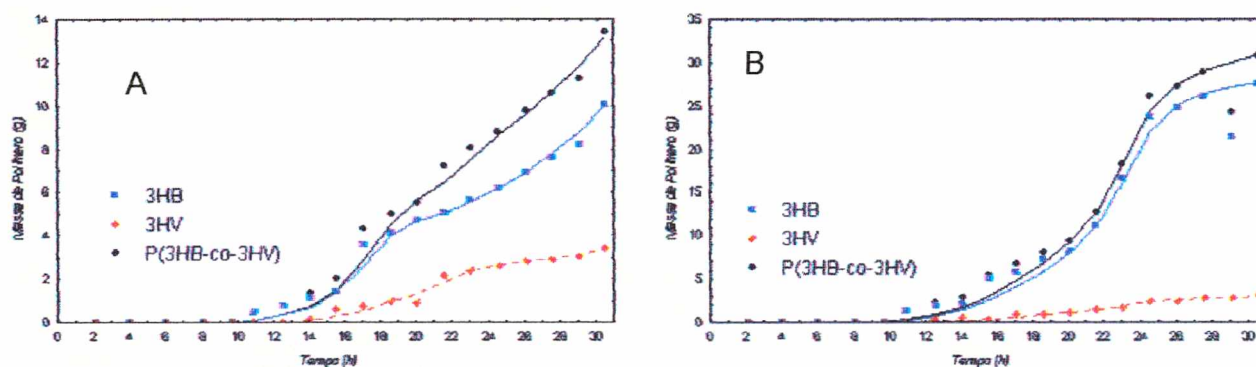
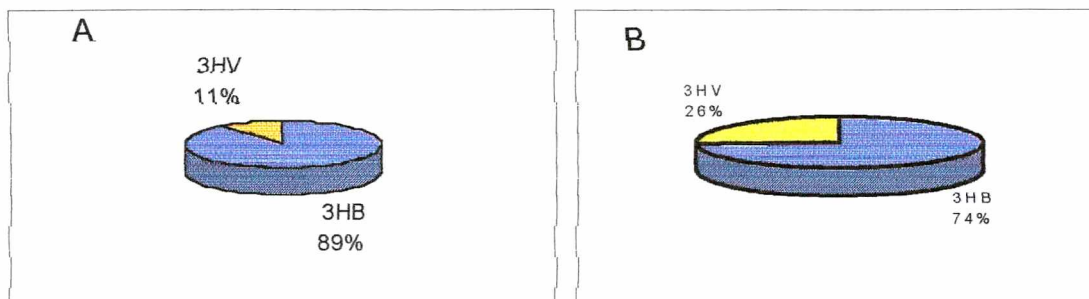


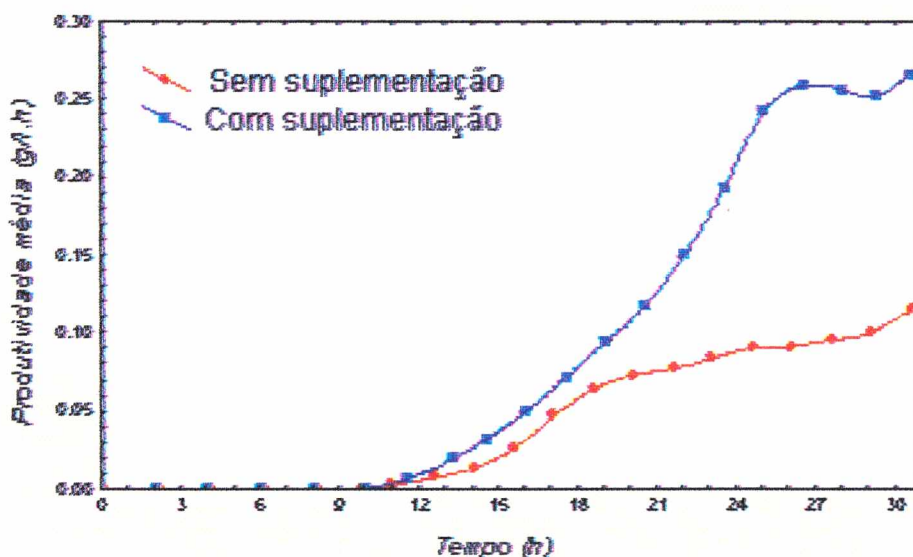
Figura 4.38: Evolução do acúmulo de P(3HB-co-3HV) em culturas com alimentação contínua de ácido propiônico sem suplementação (A) e com suplementação (B) de ácido oleico durante a fase de produção

A cultura com suplementação de ácido oleico demonstrou um acréscimo no acúmulo do polímero e um decréscimo na proporção de 3HV. A Figura 4.39 ilustra a proporção de 3HV nas culturas com e sem suplementação de ácido oleico.



**Figura 4.39** Proporção de 3HV nas culturas com ácido oleico: com suplementação (A) e sem suplementação (B)

As Figuras 4.40 e 4.41 ilustram a análise da produtividade em polímero (P(3HB-co-3HV)) e em 3HV das duas culturas estudadas. O valor máximo obtido foi de  $0.11 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  na cultura em que não foi aplicado ácido oleico enquanto que se obteve  $0.28 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  ao aplicar-se uma alimentação contínua de ácido propiônico com ácido oleico.



**Figura 4.40:** Produtividade média em P(3HB-co-3HV) para as culturas realizadas com alimentação contínua e ácido propiônico com e sem suplementação de ácido oleico

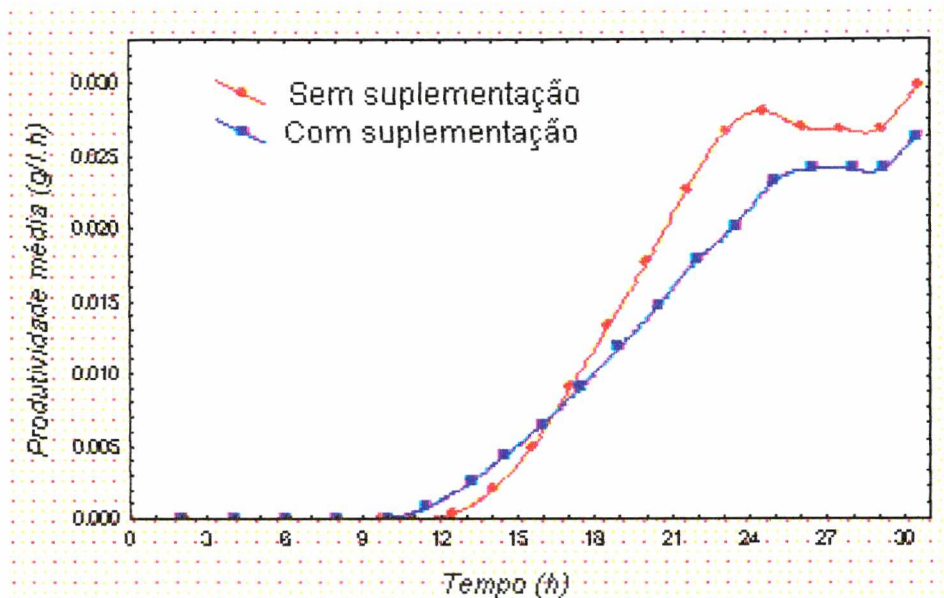


Figura 4.41: Produtividade média em 3HV ( $\text{gP(3HV).L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) para as culturas realizadas com alimentação contínua de ácido propiônico com e sem suplementação de ácido oleico.

A Figura 4.42 apresenta as curvas da velocidade específica de produção do copolímero. Observa-se que a velocidade específica máxima é maior para a cultura com suplementação ( $0,068 \text{ g.h}^{-1}$ ) em relação à cultura não suplementada ( $0,045 \text{ g.h}^{-1}$ ).

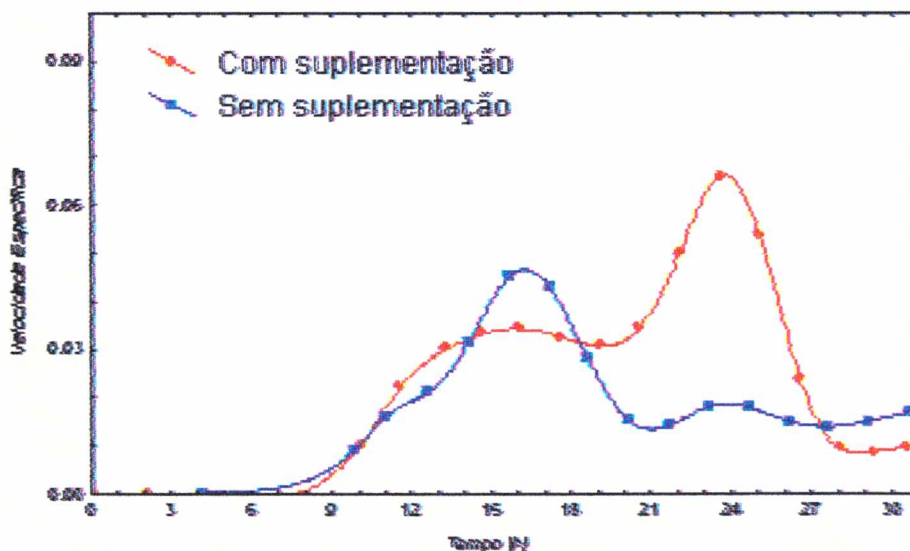
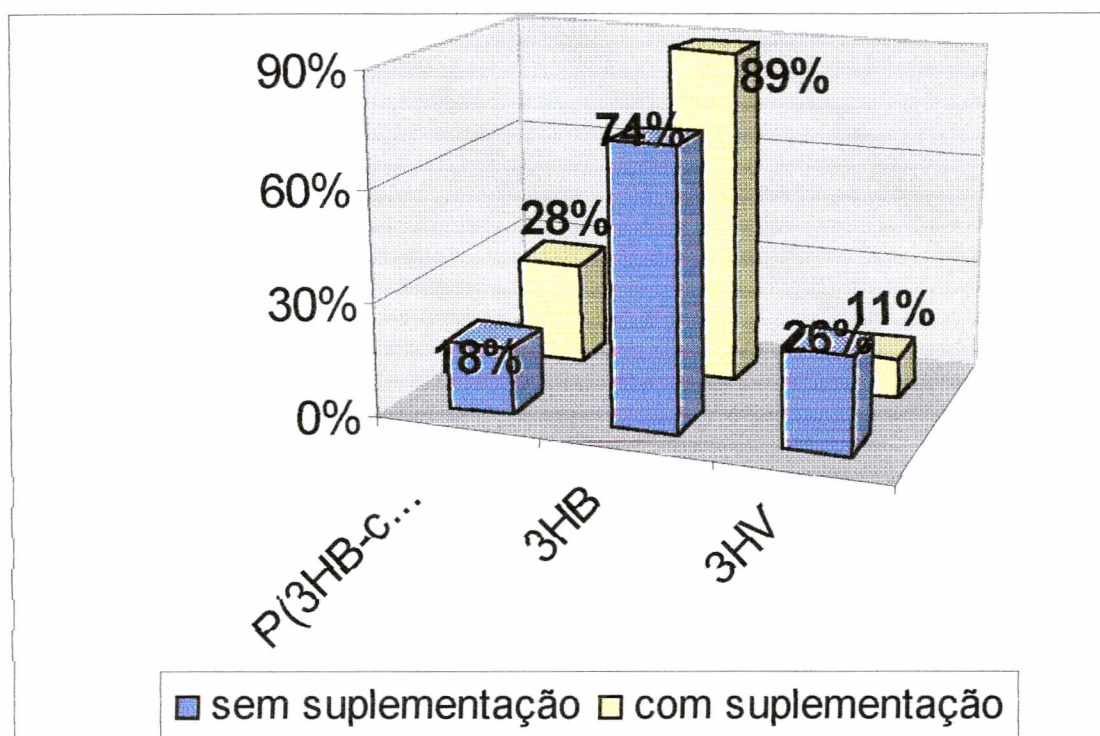


Figura 4.42: Velocidade específica de produção de copolímero para as culturas realizadas com alimentação contínua de ácido propiônico com e sem suplementação de ácido oleico

A comparação entre o acúmulo intracelular de polímero com e sem suplementação de ácido oleico é ilustrada na figura 4.43.



**Figura 4.43: Comparação entre o acúmulo de polímero para as culturas com e sem suplementação de ácido oleico aplicadas e ácido propiônico adicionado por alimentação contínua**

Através dos resultados apresentados, observa-se que a suplementação com ácido oleico é benéfica ao acúmulo de polímero, mas que não houve aumento na incorporação de unidades de 3-hidroxicaproato ao copolímero, ao menos nas condições estudadas. É possível que outras formas de alimentação ou a utilização de outros suplementos beneficiem mais a incorporação de 3HV bem como o acúmulo de polímero.

## 4.6 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE P(3HB-co-3HV)

PHA's despertam grande atenção devido às suas características, muito próximas às de plásticos petroquímicos e sua completa biodegradabilidade. Inúmeros estudos são realizados sobre a caracterização destes polímeros. Em estudos realizados por Anderson e Madden (1998) perceberam-se diferenças no ponto de fusão do polímero de acordo com a fração molar de 3HV. Também, alimentações prolongadas de ácido propiônico afetaram a cristalização, aproximando-se do valor obtido em P(3HB). Em outros estudos realizados por Zhang e Wang (1994) foi observado que 3% de conteúdo de 3HV diminuem de 13 a 14 graus Celsius no ponto de fusão do polímero em relação ao P(3HB).

Assim, após realizada a extração do polímero com 11% em peso de 3HV, conforme mostra a Figura 4.44, buscou-se caracterizar o polímero produzido em uma das culturas realizadas e compará-lo com o padrão produzido pela da SIGMA, com 12% em mol de 3HV. As propriedades pesquisadas foram temperatura de fusão e de degradação. A comparação dos resultados obtidos com os dados do polímero comercial é apresentada na Tabela 4.12. As curvas obtidas nas análises encontram-se no Anexo VI.

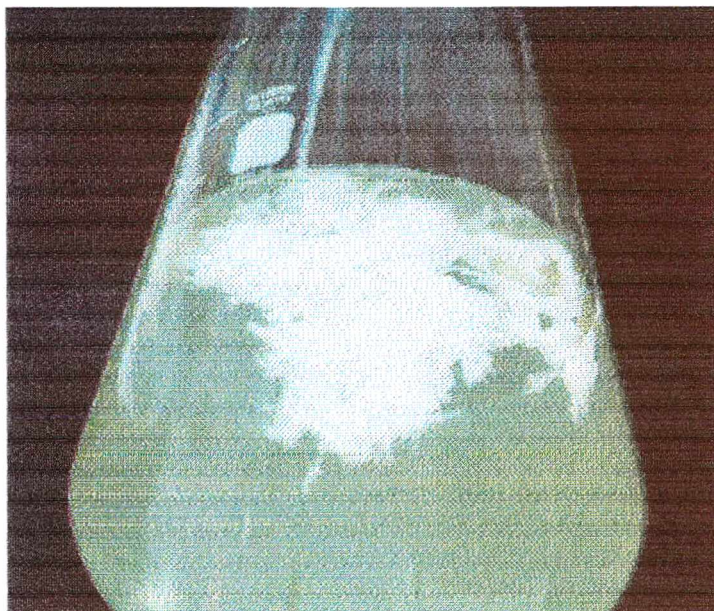


Figura 3.44: P(3HB-co-3HV) precipitado em metanol e água (7:3) após a extração

Tabela 4.12: Características estudadas para a comparação entre *P(3HB-co-3HV)* produzido experimentalmente e *P(3HB-co-3HV)* comercial

<i>P(3HB-co-3HV)</i>	<i>Temperatura de Fusão</i>	<i>Temperatura de Degradação</i>
Experimental	170,54°C	313,12°C
Comercial	161,01°C	300,46°C

Os valores obtidos estão muito próximos entre si, indicando que o polímero obtido em laboratório se assemelha ao comercial, principalmente na temperatura de fusão. O valor mais alto do ponto de fusão para o polímero obtido experimentalmente está de acordo com os dados relatados por Lee (1996b) em que observou-se que a temperatura de fusão é menor quanto maior o número de unidades de 3HV são incorporadas ao polímero. De fato, o polímero comercial possui maior quantidade de 3HV em relação ao polímero obtido experimentalmente.

É interessante ressaltar que a temperatura de degradação para o polímero comercial é mais baixa em relação ao polímero obtido no laboratório. Este é um fator muito atrativo comercialmente uma vez que esta característica favorece a sua aplicação nos processos de transformação.

Observa-se que a diferença entre as temperaturas de fusão e de degradação entre os dois polímeros é muito parecida, permitindo que opere-se na mesma faixa de trabalho para ambos.

# ***CAPÍTULO V - CONCLUSÃO***



## CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os objetivos deste trabalho foram estudar a utilização de diferentes substratos para o crescimento de *Ralstonia eutropha*, analisar a diferença entre a alimentação ou carência do elemento limitante durante a fase de produção, verificar qual das três estratégias propostas de alimentação de ácido propiônico apresentou melhor incorporação de 3HV em substrato de soro de leite e açúcar invertido, estudar a influência de ácido oleico no acúmulo de polímero e por fim, recuperar e caracterizar P(3HB-co-3HV).

I. Em relação aos **diferentes substratos** estudados concluiu-se que:

► Fonte de carbono: Os experimentos realizados com glicose, frutose, galactose, lactose hidrolisada e açúcar invertido mostraram que *Ralstonia eutropha* é capaz de desenvolver-se em açúcar invertido da mesma forma que em glicose e frutose, porém com velocidade específica (baseada na biomassa total) ligeiramente superior ( $0,26 \text{ h}^{-1}$ ). As velocidades específicas de crescimento obtidas em glicose, frutose e galactose foram de  $0,23 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,21 \text{ h}^{-1}$  e  $0,13 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. O crescimento em galactose não havia sido relatado na literatura a não ser por técnicas de recombinação genética. O consumo de galactose mesmo que com velocidade de crescimento baixa é interessante pois permite a assimilação de ambos os açúcares provenientes da hidrólise da lactose. Todos estes valores estão de acordo com os resultados apresentados na literatura (Kim e Lee, 1993; Luong et al., 1989; Pries et al., 1990).



Ensaio realizados com lactose hidrolisada demonstraram que a melhor técnica para a hidrólise da lactose visando a utilização por *Ralstonia eutropha*, é através de processo enzimático uma vez que o processo ácido gerou uma grande quantidade de sais no meio inibindo o crescimento. Observaram-se duas fases distintas de crescimento com velocidades de crescimento em lactose hidrolisada de  $0,21 \text{ h}^{-1}$  e  $0,13 \text{ h}^{-1}$ , correspondentes respectivamente ao consumo de glicose e de galactose. Os ensaios conduzidos com soro de leite demonstraram a viabilidade do uso deste resíduo para o crescimento como única fonte de carbono ou associado ao açúcar invertido. Os estudos realizados com misturas de substratos demonstraram que a concentração de substrato ideal para trabalhar-se é em torno de  $40 \text{ g.L}^{-1}$  conforme os estudos realizados no IPT (1993). Glicose e Frutose misturadas não produziram o mesmo  $\mu_{\text{max}}$  que o açúcar invertido indiciando a existência de um efeito potencializador na velocidade específica de crescimento em virtude da composição do açúcar invertido. Quando os substratos foram utilizados em misturas com diferentes concentrações e proporções os valores de velocidade específica de crescimento obtidos foram similares aos obtidos quando os mesmos substratos foram utilizados como única fonte de carbono, demonstrando não haver nenhum efeito sinérgico.

⇒ Fonte de nitrogênio: A milhocina mostrou-se capaz de substituir a fonte de nitrogênio utilizada (sulfato de amônia). Em todos os ensaios com milhocina a velocidade específica de crescimento foi similar aos ensaios com sulfato de amônia. Entretanto, vale ressaltar que este substrato necessita de um tratamento prévio à sua utilização.

⇒ Temperaturas: não se observaram diferenças significativas nos ensaios em que se aplicaram-se as temperaturas de  $30^{\circ}\text{C}$  e  $34^{\circ}\text{C}$ . A possibilidade de operação a temperatura altas em níveis industriais é interessante em virtude de economia em algumas etapas de troca de calor.

II. A comparação entre **alimentação ou carência de fósforo durante a fase de produção** em açúcar invertido, mostrou que:

⇒ O valor da produtividade média máxima de P(3HB-co-3HV) obtido para a cultura alimentada em fósforo foi de  $0,19 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  inferior ao obtido em carência de fósforo com  $0,26 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  porém a com velocidade específica máxima de produção deste polímero foi superior para a cultura em carência ( $0,94 \text{ g.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) em relação a cultura em alimentação de fósforo ( $0,82 \text{ g.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ ). Entretanto, nota-se um aumento constante da velocidade específica de produção de polímero na cultura alimentada, o que não ocorre na cultura sob carência, levando-se a crer que a alimentação do fósforo durante a fase de produção pode levar a melhores resultados na produção de polímero.

III. O uso de **diferentes estratégias de alimentação de ácido propiônico** com soro de leite como substrato permitiu observar que:

⇒ A alimentação de ácido propiônico por regulação de pH não foi possível devido à característica tamponante do substrato. Assim, a estratégia de alimentação de ácido propiônico por pulsos forneceu resultados mais satisfatórios. Obteve-se nesta cultura uma produtividade média máxima de  $0,07 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , valor muito inferior ao encontrado em outros substratos. Porém outros estudos com resíduos (resíduo da indústria de suínos e de destilarias) apresentaram valores muito próximos tanto aos de produtividade quanto aos de outros parâmetros obtidos. Vale ressaltar que apesar da baixa produtividade, a composição do polímero foi de 38% de 3HV, valor este muito interessante do ponto de vista comercial. Este resultado sugere a possibilidade da existência de precursores de 3HV no soro. Conclui-se que a produção de P(3HB-co-3HV) é possível neste substrato, necessitando-se de outros estudos para melhorar as condições da cultura.

III. Quanto ao uso de **diferentes estratégias de alimentação de ácido propiônico** com açúcar invertido como substrato concluiu-se que:

➡ A cultura conduzida com regulação de pH proporcionou um acúmulo de polímero de 44% em peso com 17% de 3HV. A produtividade média máxima obtida foi de  $0,19 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  e a velocidade específica máxima de produção foi de  $0,08 \text{ g.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ . A produtividade em 3HV foi de  $0,003 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

➡ Na cultura conduzida com pulsos obteve-se  $0,04 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  como produtividade média máxima e uma velocidade específica de produção de  $0,058 \text{ g.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ . A produtividade em 3HV foi de  $0,0004 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ . O acúmulo de polímero foi de 21% em peso com 5% de 3HV.

➡ Quando ácido propiônico foi alimentado com uma vazão contínua obtiveram-se 18% em peso com 26% de 3HV. A produtividade média máxima foi de  $0,14 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  e a velocidade específica de produção de  $0,049 \text{ g.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ . A produtividade em 3HV foi de  $0,003 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

A cultura realizada com pulsos de ácido propiônico foi a que apresentou os menores valores para todos os parâmetros estudados, possivelmente em virtude de problemas durante a fase de crescimento. A cultura que apresentou o maior acúmulo em polímero foi com regulação de pH. Esta estratégia apresentou-se como uma alternativa simples e eficaz à inibição provocada por altas concentrações de ácido propiônico. Os valores de produtividade e de velocidade específica de produção apresentaram um comportamento ascendente e sem quedas ao contrário do observado em cultura com alimentação contínua de ácido propiônico. No entanto esta cultura foi a que proporcionou maior acúmulo de 3HV, parâmetro que buscava-se otimizar.

Nas culturas conduzidas com pulsos e alimentação contínua de ácido propiônico foi observado crescimento residual na fase de produção, uma vez que os valores dos fatores de conversão de açúcar invertido em biomassa total foram elevados durante esta fase.

IV. A adição de **ácido oleico como indutor ao polímero** permitiu observar que:

⇒ Obteve-se produtividade média máxima de  $0,28 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  maior do que a obtida sem a adição de ácido oleico que foi de  $0,14 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Esta cultura proporcionou um acúmulo de 28% de polímero com 18% de 3HV. Este valor de 3HV diminuiu em relação à cultura sem suplementação, porém o acúmulo de polímero foi maior.

Cabe ressaltar que os valores obtidos (produtividade, conteúdo em polímero entre outros) estão abaixo dos relatados na literatura, mas que as conclusões foram tiradas para comparação entre as estratégias utilizadas nas mesmas condições experimentais. Uma hipótese para estes resultados inferiores à literatura é a ausência de controle de oxigênio dissolvido no biorreator.

V. A **recuperação e extração** de P(3HB-co-3HV) mostrou que:

⇒ As características térmicas obtidas foram muito próximas às obtidas com o polímero comercial.

Com base nos resultados apresentados é possível sugerir alguns propostas de estudo como:

⇒ Controlar as condições de agitação e aeração, através de medidas de oxigênio dissolvido, visando a melhoria da produtividade do sistema. Este controle permitirá ainda determinar com maior precisão o momento da limitação do crescimento.

⇒ Desenvolver novos estudos de produção de P(3HB-co-3HV) sob alimentação em fósforo para determinar a concentração e a vazão de fósforo mais eficazes para a produção deste polímero.

⇒ Trabalhar com soluções de soro de leite hidrolisado concentradas, através de técnicas como evaporação, para permitir a alimentação em soro de leite. Também

estudar a possibilidade da condução da cultura em regime contínuo para alcançar o mesmo objetivo.

- ⇒ Estudar a utilização de outros suplementos que permitam maiores concentrações de biomassa e conseqüentemente de polímero, bem como formas de suplementação.
- ⇒ Testar a utilização de algum ácido orgânico em associação aos açúcares utilizados na fase de crescimento.
- ⇒ Estudar a influência de temperatura e pH juntos, uma vez a literatura apresenta ensaios onde associa-se pH 6.8 e temperatura 34°C.
- ⇒ Trabalhar com valores diferentes de pH que permitam menores inibições de ácido propiônico no crescimento de *Ralstonia eutropha* e produção de polímero.

## ***CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



## **CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AMPE, F. **Métabolism du benzoate chez *Alcaligenes eutrophus*: quels mécanismes physiologiques régulent la biodégradation des composés aromatiques?** Toulouse L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE. 1995. 237p. These (Doctorat spécialité: Microbiologie – Biotechnologie) França - 1995
- ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. **Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates.** Microbiological Review. 54: 450-472, 1990.
- ANDERSON A.J; MADDEN L.A. **Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) polymer mixtures produced in high density fed-batch cultures of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*).** Macromol. 31:5660-5667, 1998
- ARAGÃO, G.M.F. **Production de polyhydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures.** Toulouse: L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE, 1996. 162p. These (Doctorat spécialité: Biologie et genetique Moleculaires et Cellulaires – Biotechnologie), França, 1996.

- ASENJO, J.A.; SCHMIDT, A.S.; ANDERSON, P.R.; ANDREWS, B.A. **Effect of single nutrient limitation on Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligenes eutrophus*.** Biotechnol. and Bioeng. 46: 497-502, 1995.
- ASHBY, R.D.; FOGLIA, T.A. **Poly(hydroxyalkanoate) biosynthesis from triglyceride substrates.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 431-437, 1998.
- BEAR, M.M.; LÉBOUCHERDURAND; M.A., LANGLOIS; V., LENZ, R.W.; GOODWIN, S.; GUERIN, P. **Bacterial poly-3-hydroxyalkanoates with epoxy groups in the side-chains.** React. Funct. Polymers. 34:65-77, 1997 apud BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K.F. **Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects.** J. Biotech. 65: 127-161, 1998.
- BEAULIEU, M.; GOULET, J. BEAULIEU, Y.; MÉLINARD, J.; PANDIAN, S.; **Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate.** Appl. Environ. Microbiol. 61: 165-169, 1995.
- BERGER, E.; RAMSAY, B.A.; RAMSAY, J.A.; CHAVARIE, C.; BRAUNEGG, G. **PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass.** Biotechnol. Tech. 3: 227-232, 1989.
- BITAR, A.; UNDERHILL, S. **Effect of Ammonium supplementation on production of poly-3-hydroxybutiric acid by *Alcaligenes eutrophus* in batch culture.** Biotechnol Lett, 12: 563-568, 1990
- BOATMAN, E.S. **Observation on the fine structure of spheroplasts of *Rhodospirillum rubrum*.** J. Cell Biol. 20: 297-311, 1964.



- BORMANN, E.J.; LEIBNER, M.; ROTH, M.; BEER, B.; METZNER, K. **Production of polyhydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* from protein hydrolysates** Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 604-607, 1998
- BORZANI, W; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Engenharia Bioquímica**. Ed. Edgard Blücher Ltda. Vol. 3, São Paulo, 1975.
- BOURQUE, D.; OUELLETE, B.; ANDRÉ, G.; GROLEAU, D. **Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from methanol: characterization of a new isolate of *Methylobacterium extorquens***. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 7-12, 1992.
- BRANDL, H., GROSS, R.A., LENZ, R.W., FULLER, R.C. ***Pseudomonas oleovorans* as a source of poly-( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters**. Appl. Environ. Microbiol. 54 (8):1977-1982, 1988.
- BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B; LAFFERTY, R.M. **A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass**. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 6:29-37, 1978.
- BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; RENNER, G.; ZEISER, A.; HAAGE, G.; LOIDL-LANTHALER, K. **Kinetics as a tool for polyhydroxyalkanoate production optimization**. Can. J. Microbiol. 41: 239-248, 1995.
- BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K.F. **Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects**. J. Biotech. 65: 127-161, 1998.
- BRIESE, B.H.; JENDROSSEK, D.; SCHLEGEL, H.G. **Degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by aerobic sewage sludge**. FEMS Microbiol. Lett. 117: 107-112, 1994.

- BYROM, D. **Polymer synthesis by microorganisms; technology and economics.** Trends Biotechnol. 5:246-250, 1987.
- BYROM, D. **Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate: poly- $\beta$ -hydroxyvalerate copolymers.** FEMS Microb. Reviews. 103: 247-250, 1992.
- CHANG, Y.K.; KIM, B.S.; LEE, S.C.; LEE, S. Y.; CHANG, M.N.; WOO, S.I. **Production of Poly(3-hydroxybutiric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control.** Biotechnol and Bioeng. 43:892-898, 1994
- CHOI, J.; LEE, S.Y. **Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation.** Bioprocess Eng. 17: 335-342, 1997.
- CHOI, J.; LEE, S.Y. **Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 13-21, 1999a.
- CHOI, J.; LEE, S.Y. **Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals.** Biotechnol. Bioeng. 62(5): 546-553, 1999b.
- CHOI, K-S; RYU, H.W.; PARK, C.H.; GOODRICH, P.R. **Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from swine waste liquor by *Azotobacter vinelandii* UWD** Biotechnol lett. 19:7-10,1997
- CHOI, H.H.; SONG, J.J.; YOON, S.C. **Biosynthesis of copolyesters by *Hydrogenophaga pseudoflava* from varios lactones.** Canadian J Microbiol. 41:60-67,1995

- COMEAU, Y.; HALL, K.J.; OLDHAM, W.K. **Determination of Poly- $\beta$ -hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography.** *App and Environ Microbiol.* 54:2325-2327, 1988
- CRUEGER, W.; CRUEGER, A.; **Biotechnology: a textbook of industrial microbiology.** Sinauer Associates Inc., Science Tech, Inc., Madiso, Wis **apud** BEAULIEU, M.; GOULET, J BEAULIEU, Y.; MÉLINARD, J.; PANDIAN, S.; **Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate.** *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 165-169, 1995.
- DANIEL, M.; CHOI, J.H.; KIM, J.H.; LEBEAULT, J.M. **Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by methylotrophic bacterium, *Pseudomonas*.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:702-706, 1992.
- DAWES, E.A.; SENIOR, P.J. **The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms.** *Adv. Microbiol. Physiol.* 10:135-266, 1973.
- De SMET, M.J.; EGGINK, G.; WITHOLT B.; DAWES E.A. **Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane.** *J. Bacteriol.* 56: 3354-3359, 1983.
- DENNIS, D; SLATER, S; GALLAHER T. **Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain.** *Appl and Environ Microbiol* 58:1089-1094, 1992.
- DOELLE, H.W. **Bacterial Metabolism.** Academic Press, New York, 1975.
- DOI, Y. **Microbial Polyesters.** VCH Publishers, Inc., New York, 1990.

- DOI, Y.; KANESAWA, Y.; KUNIOKA, M.; SAITO T. **Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate).** *Macromol*, 23: 26-31, 1990.
- DOI, Y.; KAWAGUCHI, Y.; KIM, J.H.; LEBEAULT, J.M. **Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*.** *FEMS Microbiol. Reviews*. 103:103-108, 1992.
- DOI Y.; KOYAMA, N.; **Continuous production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Alcaligenes eutrophus*.** *Biotech. Lett.* 17:281-284, 1995
- DOI, Y.; KUNIOKA, M.; NAKARUMA, Y.; SOGA, K. **Biosynthesis of Polyesters by *Alcaligenes eutrophus*: Incorporation of <sup>13</sup>C-labelled acetate and propionate.** *J. Chem. Soc*, 1696-1697, 1987
- DOI, Y.; TAMAKI, A.; KUNIOKA, M.; SOGA, K. **Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids.** *Appl Microb. Biotechnol.* 28: 330-334, 1988.
- DUNLOP, W.F.; ROBARDS, A.W. **Ultrastructural study of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*.** *J. Bacteriol.* 114: 1271-1280, 1973.
- FIDLER, S.; DENNIS, D. **Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli*.** *FEMS Microbiol. Ver.* 103: 231-236, 1992.
- FULLER, C.R.; BRANDL, H; GROSS, R.A; LENZ R.W. ***Pseudomonas oleovorans* as a source of Poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters.** *Appl and Environ microbiol.* 54:1977-1982, 1988
- GILMORE, D.F.; ANTOUN, S.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. **Degradation of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) and polyolefin blends in a municipal wastewater treatment facility.** *J. Environ. Polym. Degrad.* 1: 269-274, 1993.

- GOMEZ, J.G.C.; RODRIGUES, M.F.A.; ALLI, RCP; TORRES, B.B.; BUENO NETTO, C.L.; OLIVEIRA, M.S.; SILVA, L.F. **Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid.** Appl Microbiol and Biotechnol. 45: 785-791, 1996.
- GOMEZ, J.G.C.; BUENO NETTO, C.L. **Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias.** Revista Brasileira de Engenharia Química. 17: 24-29, 1997.
- GOMEZ, J.G.C.; SILVA L.M.B; OLIVEIRA, M.S. TACIRO; M.K. PRADELLA; J.G.C. SILVA L.F; TORRES, B.B. **Utilização dos ácido acético ou propiônico como co-substratos para a produção de PHA's contendo monômeros de cadeia média.** Anais de Congresso Brasileiro de Eng. Química, 1998
- GOSTOMSKI, P.A.; BUNGAY H.R; **Effect of glucose and  $\text{NH}_4^+$  levels on Poly(3-hydroxybutyrate) production and growth in a continuous culture of *Alcaligenes eutrophus*.** Biotechnol. Prog. 12:234-239, 1996
- GU, T; LIU, F; LI, W; RIDGWAY, D. **Production of poly-3-hydroxybutyrate on molasses by recombinant *E. coli*.** Biotechnol. Lett 20:345-348, 1998
- HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A.J.; CHU L.; DAWES, E.A. **Characterization of two 3-ketothiolases processing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*.** FEMS Microbiol. Lett 52: 91-96, 1988a.
- HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A.J.; CHU, L.; DAWES, E.A. **The role of NADH and NaDPH linked acetoacetyl-COA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*.** FEMS Microbiol. Lett 52:91-96, 1988b.
- HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. **The importance of PHB-synthase substrate specificity in poly-hydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*.** FEMS Microb. Lett. 57: 1-6, 1989.

- HENDERSON, R.A.; JONES, C.W. **Poly-3-hydroxybutyrate production by washed cells of *Alcaligenes eutrophus* – purification, characterization and potential regulatory role of citrate synthase.** Arch. Microbiol, 198, 486-492. 1997 **apud** BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K.F. **Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects.** J. Biotech. 65: 127-161, 1998.
- HIGGINS, D; BEST, J.; JONES, J. **Biotechnology – Principles and Applications** Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1995
- HOCH, I. E., **Avaliação da substituição do extrato de levedura por milhocina no cultivo de *Zymomonas mobilis* para a produção da glicose-frutose oxidoreductase.** Joinville, 1997. Monografia apresentada ao Curso de Química Industrial - Univille
- HOLMES, P.A. **Applications of PHB - A microbially produced biodegradable thermoplastic.** Phys. Technol. 16: 32-36, 1985.
- HUANG, Y.L.; MANN, K.; NOVAK, J.M.; YANG, S.T. **Acetic acid production from fructose by *Clostridium formicoaceticum* immobilized in a fibrous-bed bioreactor.** Biotechnol Prog. 14: 800-806, 1998
- HUGUES, L.; RICHARDSON, K.R.; **Fermentation process.** European patent nº46, 344 **apud** BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K.F. **Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects.** J. Biotech. 65: 127-161, 1998.
- HUISMAN, G.W.; LEEUW, O.; EGGINK, G.; WITHOLT, B. **Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads.** Appl. Environ. Microb. 55: 1949-1954, 1989.

- INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS-IPT. **Produção de plásticos biodegradáveis a partir de cana-de-açúcar por via biotecnológica.** Relatório No 31478/93, volume II. 103p. 1993
- JENDROSSEK D.; SCHIRMER A.; SCHLEGEL, H.G **Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 46:451-463, 1996
- KANG, C.K.; KUSAKA, S.; DOI, Y. **Structure and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Alcaligenes eutrophus*.** Biotechnol. Lett. 17: 583-588, 1995.
- KIM, B.H. **Physiology in Microorganisms.** Academy Books, Seoul, 1988 apud SEO, J.K.; YOON, J.Y.; OH J.T.; KIM W.S. **Optimum growth conditions and pH control solution for PHB biosynthesis in *A. eutrophus*.** J. Ind. Eng. Chem. 4 (3): 215-220, 1998.
- KIM, B.S.; CHANG, H.N. **Production of poly(3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*.** Biotechnol. Lett. 20 (2): 109-112, 1998.
- KIM, J.H.; KIM, B.G.; CHOI, C.Y. **Effect of propionic acid on poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acid production by *Alcaligenes eutrophus*.** Biotech Lett. 14:903-906, 1992
- KIM, S.W.; KIM, P.; LEE, H.S.; KIM, J.H. **High production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate under potassium limitation.** Biotechnol. Lett. 18 (1): 25-30, 1996.
- KIM, B.S.; LEE, S.C.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N.; CHANG, Y.K.; WOO, S.I. **Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control.** Biotechnol. Bioeng. 43: 892-898, 1994.

- KUNIOKA, M.; NAKAMURA, Y., DOI, Y. **New bacterial copolyesters produced in *Alcaligenes eutrophus* from organic acids.** Polym. Commun. 29: 569-573, 1989 **apud** BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K.F. **Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects.** J. Biotech. 65: 127-161, 1998.
- LAUZIER, C.A; MARCHESSALULT, R.H. **Polyhydroxyalkanoates: Morphology of tender morsels for microbes** Physiology, Kinetics, Production and Use of Biopolymers (Proceedings) p 59-69, Austria, 1994.
- LEE, S.Y. **Suppression of filamentation in recombinant *E. coli* by amplified *ftsZ* activity.** Biotechnol. Lett. 16: 1247-1252, 1994.
- LEE, S.Y. **Plastic bacteria – progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria.** Trends Biotechnol. 14: 431-438, 1996a.
- LEE, S.Y. **Bacterial polyhydroxyalkanoate.** Biotech. Bioeng. 49:1-14, 1996b.
- LEE, S.Y. **High cell density cultivation of *Escherichia coli*.** Trends Biotechnol 14: 90-105, 1996c.
- LEE, S.Y. ***E. coli* moves into the plastic age.** Nat. Biotechnol 15: 17-18, 1997.
- LEE, S.Y.; CHANG, H.N. **High cell density cultivation of *Escherichia coli* using sucrose as a carbon source.** Biotechnol. Lett. 15: 971-974, 1993
- LEE, S.Y.; CHANG, H.N. **Production of poly(hydroxyalkanoic acid).** Adv. in Bioch Eng/Biotechnol, 52: 27-58, 1995.
- LEE, S.Y.; CHOI, J. **Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*.** Polymer Degrad. Stabil 59: 387-393, 1998.



- LEE, S.Y.; CHOI, J.I. **High level production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *E. coli*.** Appl and Environ. Microbiol. 65: 4363-4368, 1999.
- LEE, S.Y. CHOI, J.; **Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals.** Biotechnol. Bioeng. 62(5): 546-553, 1999b.
- LEE, S.Y.; KIM, K.S.; CHANG, H.N.; **Synthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *E. coli*.** Biotechnol e Bioeng. 49:495-503, 1996e.
- LEE, I.Y.; KIM, M.K.; PARK, Y.H.; LEE, S.Y. **Regulatory effects of cellular nicotinamide nucleotides and enzyme-activities on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in recombinant *Escherichia coli*.** Biotechnol. Bioeng. 52: 707-712, 1996.
- LEE, S.Y.; LEE, K.M., CHANG, H.N., STEINBÜCHEL, A. **Comparison of *Escherichia coli* strains for the synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid), and morphological changes.** Biotechnol. Bioeng. 44: 1337-1347, 1994.
- LEE, S.Y.; MIDDELBERG, A.P.J.; LEE, Y.K. **Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey using recombinant *Escherichia coli*.** Biotechnol. Lett. 19: 1033-1035, 1997 apud CHOI, J.; LEE, S.Y. **Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals.** Biotechnol. Bioeng. 62(5): 546-553, 1999b.
- LEE, S.; SON, H; PARK, G. **Growth associated production of poly-3-hydroxybutyrate from glucose or alcoholic distillery wastewater by *Actinobacillus sp* EL-9.** Biotech Lett. 18:1229-1234, 1996d.

- LEMOS, P.C.; VIANA, C.; SALGUEIRO, E.N; RAMOS, A.M; CRESPO, J.P.S.G, REIS, M.A.M; **Effect of carbon source on the formation of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a phosphate-accumulating mixed culture.** *Enzyme and Microbiol Technol.* 22:662-671
- LIM, H.C.; HONG, J.; LEE, J.H. **Experimental optimization of fed-batch culture for Poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid production.** *Biotechnol and Bioeng.* 56:697-705, 1997
- LINKO, S; VAHERI, H; SEPPÄ L.A **Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* on different carbon sources.** *Appl. Microbiol Biotechnol*, 39:11-15, 1993
- LUND, B.; NORDDAHL, B.; AHRING, B. **Production of lactic acid from whey using hydrolysed whey protein as nitrogen source.** *Biotech Lett.* 14:851-856, 1992.
- LUONG, J.H.T.; MULCHANDANI, A.; LEDUY, A. **Batch kinetics of microbial polysaccharide biosynthesis.** *Biotechnol e Bioeng.* 31:639-646, 1988.
- LUNDGREN, D.G.; PFISTER, R.M.; MERRICK, J.M. **Structure of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid granules.** *J. Gen. Microbiol.* 34: 441-446, 1964.
- LUZIER, W.D. **Materials derived from biomass biodegradable materials.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 839-842, 1992.
- MACRAE, R.M.; WILKINSON, J.F. **The influence of cultural conditions on poly-3-hydroxybutyrate extracted from different bacteria.** *J. Bacteriol.* 89: 245-251. 1958 **apud** BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K.F. **Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects.** *J. Biotech.* 65: 127-161, 1998.

MILLER, G.L. **Analytical Chemistry**, 31(3): 426-428, 1959.

MOORE, G.F.; SAUNDERS, S.M.; **Advances in Biodegradable Polymers**. Rapra Review Report n° 98, 1997.

MORRISON, R.T; BOYD, R.N. **Química Orgânica**. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1983.

NAKAMURA, S.; KUNIOKA, M.; DOI, Y. **Biosynthesis and characterization of bacterial poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate)**. *Macromol. Rep. A* 28: 15-24, 1991.

NAKAMURA, S.; DOI, Y.; SCANDOLA, M. **Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)**. *Macromol* 25: 4237-4241, 1992.

NISHIDA, H.; TOKIWA, Y. **Effects of higher-order structure of poly(3-hydroxybutyrate) on its biodegradation. II. Effects of crystal structure on microbial degradation**. *J. Environ. Polym. Degrad.* 1: 65-80, 1993.

NUTI, M.P.; de BERTOLDI, M.; LEPIDI, A.A. **Influence of phenylacetic acid on poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) polymerization and cell elongation in *Azotobacter chroococcum***. *Can. J. Microbiol.* 18: 1257-1261, 1972.

OEDING, V.; SCHLEGEL, H.G.  **$\beta$ -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism**. *Biochem. J.* 134: 239-248, 1973.

OLIVEIRA, R.P. **Produção de Poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)) por *Ralstonia eutropha* em substrato de baixo custo: estudo de diferentes estratégias de limitação de crescimento**. Florianópolis. 1999. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Santa Catarina.

OSTLE, A.; HOLT, J.G.; Nile blue A as a fluorescent stain for poly-3-hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol.* 44 :238-241. 1982

PADGETTE, R.S.; MITSKY, T.A.; GRUYS, K.J.; TRAN, M.; TAYLOR, N.B.; SHAH, D.T.; SLATER, S.C.; COLBURN, S.M.; KISHORE, G.M. **Strategies for PHA production in plants vs microorganisms.** International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Davos – Switzerland, 1996.

PAGE, W.L. **Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* in media containing sugars and complex nitrogen sources.** *Appl. Microbiol Biotechnol.* 38:117-121, 1992

PAGE, W.J.; KNOSP, O. **Hyperproduction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azobacter vinelandii* UWD.** *Appl. Environ. Microbiol.* 55(6):1334-1339, 1989.

PARK, C-X.; DAMODARAN, V.K.; **Effect of Alcohol feeding mode on the biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)** *Biotechnol and Bioeng.* 44:1306-1314, 1994

PARK, Y.H.; LEE, I.Y.L.; KIM, M.K.; CHANG, H.N. **Effects of propionate on accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate and excretion of pyruvate in *Alcaligenes eutrophus*.** *Biotechnol Lett.* 16:611-616, 1994

PARK, E.Y.; KOIKE, Y.; HIGASHIYAMA, K.; FUJIKAWA, S.; OKABE, M. **Effect of nitrogen source on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina*.** *J. of Biosc. and Bioeng.* 88:61-67, 1999

PARK, J.; SEO, B.; KIM, J.; PARK, Y. **Production of erythritol in fed-batch cultures of *Trichosporon* sp.** *J. of Ferment. and Bioeng.* 86:577-580, 1998

- PEOPLES, O.P.; SINSKEY, A.J. **Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding  $\beta$ -ketothiolase and acetyl-CoA reductase.** J. Biol. Chem. 264: 15293-15297, 1989a.
- PEOPLES, O.P.; SINSKEY, A.J. **Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*).** J. Biol. Chem. 264: 15298-15303, 1989b.
- PESSOA, A.; VITOLO, M. **Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: Culture medium composition and enzyme extraction** Brazilian Journal of Chemical Engineering. 16:237-245, 1999
- POIRIER, Y.; DENNIS, D.E.; KLOMPARENS, K.; SOMEVILLE, C. **Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants.** Science 256: 520-523, 1992.
- POIRIER, Y.; NAWRATH, C.; SOMERVILLE C. **Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers in bacteria and plants.** Biotechnol 13:142-150, 1995.
- POWELL, K.A.; COLLINSON, B.A.; RICHARDSON, K.R.; **Microbiological process for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) and micro-organism for use therein.** European patent n°15, 669 apud BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K.F. **Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects.** J. Biotech. 65: 127-161, 1998.
- PREUSTING H., KINGMA J., WITHOLT B., **Physiology and polyester formation of *Pseudomonas oleovorans* in continuous two-liquid-phase cultures.** Enzyme Microbiol. Technol., 13:770-780, 1991.

PRIES, A.; STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H.G. **Lactose and galactose utilizing strains of poly(hydroxyalkanoic acid) accumulating *A. eutrophus* and *P. saccharophila* obtained by recombinant DNA technology.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 33:410-417, 1990

QUESADA-CHANTO, A.; DA COSTA, J.P.C.L.; SILVEIRA, M.M.; SCHROEDER, A.G.; SCHID-MEYER, A.C.; JONAS, R. **Influence of different vitamin-nitrogen sources on cell growth and propionic acid production from sucrose by *Propionibacterium shermanii*.** Acta Biotechnologica. 19: 267-274, 1998

RAMSAY, B.A. **Physiological factors affecting PHA production.** Physiology, kinetics, production and use of biopolymers (Proceedings), p.9-17, Austria, 1994a.

RAMSAY, J.A. **PHA: Its separation from microbial biomass and its biodegradation.** Physiology, kinetics, production and use of biopolymers (Proceedings), p. 49-58, Austria, 1994b.

RAMSAY, B.A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE C.; DUBÉ B.; BATAILLE P., RAMSAY J.A. **Production of poly-( $\beta$ -hydroxybutyric-co- $\beta$ -hydroxyvaleric) acids.** Appl. Environ. Microbiol. 56:2093-2098, 1990a.

RAMSAY, J.A.; BERGER, E.; RAMSAY B.A.; CHAVARIE, C. **Recovery of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment.** Biotechnol. Tech. 4: 221-226, 1990b.

RAMSAY, B.A.; SARACOVAN, I.; RAMSAY, J.A.; MARCHESSAULT, R.H.; **Continuous production of long-side-chain poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates by *Pseudomonas oleovorans*.** Appl. Environ. Microbiol. 58(2):744-746, 1991.

REPASKE, R. **Nutritional requirements for *Hydrogenomonas eutropha*.** J. Bacteriol. 83: 418-422, 1962

REPASKE, R.; REPASKE, A.C. **Quantitative requirements for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus***. Appl. Environ. Microbiol. 32 (4): 585-591, 1976.

**REDIFF HOME PAGE:** <http://members.rediff.com>

REUTZ, I.; SCHOBERT, P.; BOWIEN, B. **Effect of phosphoglycerate mutase deficiency metabolism of *Alcaligenes eutrophus***. J. Bacteriol. 151: 8-14, 1982.

RHEE, Y.H.; KIM, G.J.; YUN, K.Y.; BAE, K.S. **Accumulation of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes* sp SH-69 in batch culture**. Biotechnol Lett. 14:27-32, 1992

RICHARDSON, K.R. **Production of 3-hydroxybutyrate**. European patent n°114.086 apud BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K.F. **Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects**. J. Biotech. 65: 127-161, 1998.

RIIS, V; MAI, W. **Gas chromatographic determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis**. J Chromatog. 445:285-289, 1988

RYU, H.W.; HAHN, S.K.; CHANG, Y.K.; CHANG, H.N. **Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation**. Biotechnol. Bioeng. 55: 28-32, 1997.

SAITO, Y.; NAKAMURA, S.; HIRAMITSU, M.; DOI, Y. **Microbial synthesis and properties of Poli-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate**. Polym., Int. 39: 169-174. 1996

SASIKALA, C.; RAMANA, C.V. **Biodegradable polyesters**. Adv App Microbiol. 42: 97-218, 1996

- SCHLEGEL, H.G.; GOTTSCHALK, G.; VON BARTHA, R. **Formation and utilisation of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by *knallgas* bacteria (*Hydrogenomonas*).** Nature 191: 463-465, 1961.
- SCHOBERT, P.; BOWIEN, B. **Unusual C3 and C4 metabolism in the chemoautotroph *Alcaligenes eutrophus*.** J. Bacteriol. 159 (1): 162-172, 1984.
- SCHUBERT, P.; STEINBÜCHEL, A.; SCHELEGEL, H.Y. **Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*.** J. Bacteriol. 170: 5837-5847, 1988.
- SHIOYA, S; SHIMIZU, H. KOZAKI, Y.; KODAMA, H. **Maximum production strategy for biodegradable copolymer P(3HB-co-3HV) in fed-batch culture of *A. eutrophus*.** Biotechnol e Bioeng. 62:518-525, 1988
- SHIRAI, Y.; HASSAN, M.A.; KARIM, M.I.A.; INAGAKI, M.; NAKANISHI, K.; HASHIMOTO, K. **Economic analysis on production of bacterial polyhydroxyalkanoates from palm oil mill effluent.** J Chem Eng Japan. 30:751-755, 1997
- SIM, S.J.; SNELL, K.D.; HOGAN, S.A.; STUBBE, J.; RHA, C.K.; SINSKEY, A.J. **PHA synthase activity controls the molecular-weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo.** Nature biotechnol. 15: 63-67, 1997.
- SLATER, S.C.; VOIGE, W.H.; DENNIS, D.E. **Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- $\beta$ -droxybutyrate biosynthetic pathway.** J. Bacteriol. 170: 4431-4436, 1988.



- SONNLEITNER, B.; HEINZLE, E.; BRAUNEGG, G.; LAFFERTY, R.M. **Formal kinetics of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) in *Alcaligenes eutrophus* H16 and *mycoplana rubra* R14 with respect to the dissolved oxygen tension in ammonium limited batch cultures.** Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 7: 1-10, 1979.
- STEINBÜCHEL, A.; LEE, S.Y.; JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, A.; CHOI, C.Y. **Biosynthesis of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acid from 1-3 butanediol or from 3-hydroxybutyrate by *Pseudomonas sp* A33.** Appl Microbiol, Biotechnol. 42: 901-909, 1995<sup>a</sup>.
- STEINBÜCHEL, A.; PIEPER, U. **Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of *A. eutrophus*.** Appl. Microbiol Biotechnol. 37: 1-6, 1992
- STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H.G. **Excretion of pyruvate by mutants of *Alcaligenes eutrophus* which are impaired in the accumulation of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) (PHB), under conditions permitting synthesis of PHB.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 168-175, 1989.
- STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H.G. **Physiology and molecular genetics of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoic acids) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*.** Molec Microbiol. 5(3): 535-542, 1991.
- STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H.E. **Diversity of bacterial poly-hydroxyalkanoic acid.** FEMS Microbiol. Lett. 128: 219-228, 1995.
- STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. **Bacterial and other biological systems for polyester production.** Trends Biotechnol. 16: 419-427, 1998.

- STICKLAND, L.H. **The determination of small quantities of bacteria by means of the Biuret reaction.** J. Gen. Microbiol. 5: 689-703, 1951.
- SUZUKI, T.; YAMANE, T.; SHIMIZU S. **Kinetics and effect of nitrogen source feeding on production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fed-batch culture.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 24:366-369, 1986.
- TANAKA, K.; KATAMUNE K.; ISHIZAKI, A. **Fermentative production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid from xylose by two-stage culture method employing *Lactococcus lactis* IO-1 and *Alcaligenes eutrophus*.** Biotechnol. Lett. 15 (12): 1217-1222, 1993.
- TANAKA, K.; ISHIZAKI, A.; KANAMARU, T.; KAWANO, T. **Production of poly-(D-3-hydroxybutyrate) from CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*.** Biotechnol. Bioeng. 45:268-275, 1994.
- TIM A.; STEINBÜCHEL A. **Formation of polyester consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent *Pseudomonas*.** Appl. Environ. Microbiol. 56 (11): 3360-3367, 1990.
- VALENTIN, H.E.; SCHÖNEBAUM, A.; STEINBÜCHEL, A. **Identification of 4-hydroxyvaleric acid as a constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoates acids from bacteria.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 507-514, 1992.
- VISSER, A. S.; POSTMA, P.W. **Biochim, Biophys. Acta.** 298: 333. 1973
- WALLEN, L.L.; ROHWEDDER, W.K. **Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate from activated sludge.** Environ. Sci. Technol. 8: 576-579, 1974.
- WANG, W.S.; LUNDGREN, D.G. **Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in the chemolithotrophic bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*.** J. Bacteriol. 97: 947-950, 1969.

- WANG, F.; LEE, S.Y. **Poly (3-hydroxybutyrate) production with high polymer content by fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation.** Appl. Environ. Microbiol. 63: 3703-3706, 1997a.
- WANG, F.; LEE, S.Y. **Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*.** Appl. Environ. Microbiol. 63: 4765-4769, 1997b.
- WANG, F.; LEE, S.Y. **High cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli* for the production of poly(3-hydroxybutyrate) in a defined medium.** Biotechnol. Bioeng. 58 (2-3): 325-328, 1998.
- WEST, T.P.; STROHFUS, B. **Effect of nitrogen source on pullulan production by *Aureobasidium pullulans* grown in a batch bioreactor.** Microbios, 99:147-159, 1999
- WONG, H.H.; LEE, S.Y. **Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 30-33, 1998.
- YAMANE, T. **Cultivation engineering of microbial bioplastics production.** FEMS Microbiol. Reviews. 103:257-264, 1992.
- YAMANE, T. **Yield of poly-(D)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study.** Biotechnol. Bioeng. 41:165-170, 1993.
- YAMANE, T.; FUKUNAGE, M.; LEE, Y.W. **Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer.** Biotechnol. Bioeng. 50: 197-202, 1996.
- YASIN, M. TIGHE, B.J. **Polymers for biodegradable medical devices.** Biomaterials. 13:9-16, 1992

- YOO, Y.J. CHUNG, Y.J.; CHA, H.J.; YEO, J.S. **Production of Poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acid using propionic acid by pH regulation.** J. Ferment and Bioeng. 83:492-495, 1997
- ZHANG, Q.; WANG. C. **Polyhydroxybutyrate produced from cheap resources: Crystallization and melting behavior.** J. of Appl. Polymer Science. 54:515-518, 1994
- ZHANG, H.; BIAS, V.O.; GONYER, K.; DENNIS, D. **Production of Polyhydroxialkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains.** Appl. Environ. Microbiol. 60: 1198-1205. 1994

# ***ANEXOS***



# **ANEXO I**

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **CURVAS DE CALIBRAÇÃO**

Estão apresentados a seguir as curvas padrão citadas no capítulo de Material e métodos.

A Figura A1 apresenta a curva de calibração entre absorbância e biomassa para *Ralstonia eutropha* em açúcar invertido. A Figura A2 apresenta a curva de calibração de determinação da concentração de açúcares redutores pelo método do ácido 3-5-dinitrosalicílico (DNS). A Figura A3 ilustra a curva de calibração de determinação da concentração de proteínas e a A4, da determinação da concentração de ácido propiônico. Por fim as Figuras A5 e A6 ilustram a curva padrão de P(3HB-co-3HV) e um cromatograma, respectivamente.

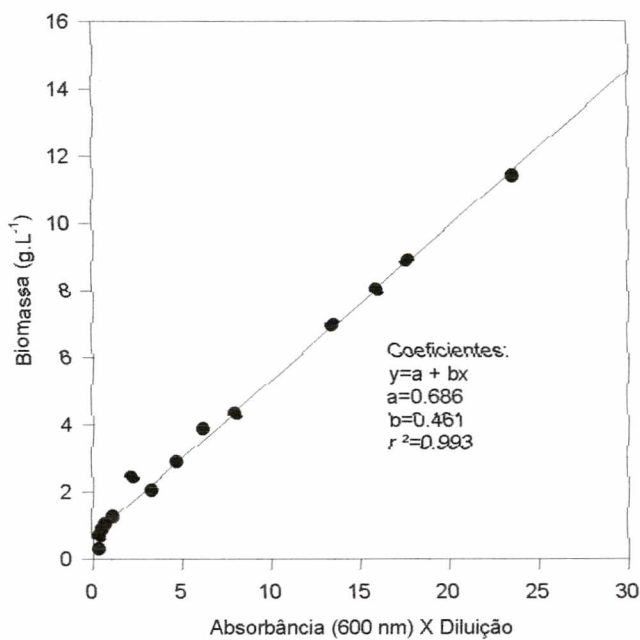


Figura A1: Curva de calibração para determinação da concentração celular

Curva de calibração: padrão glicose

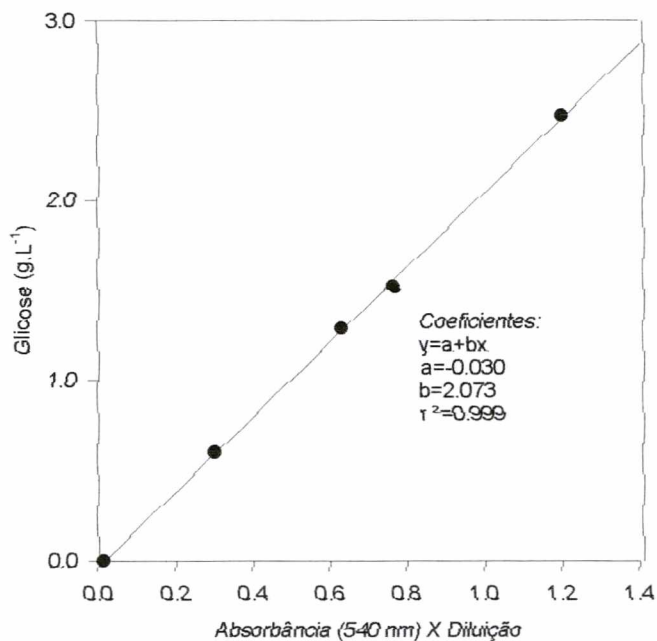
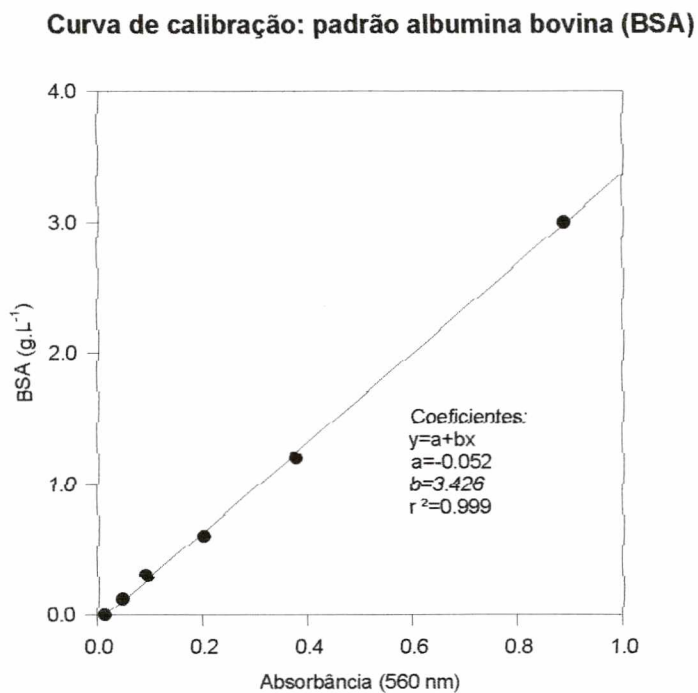
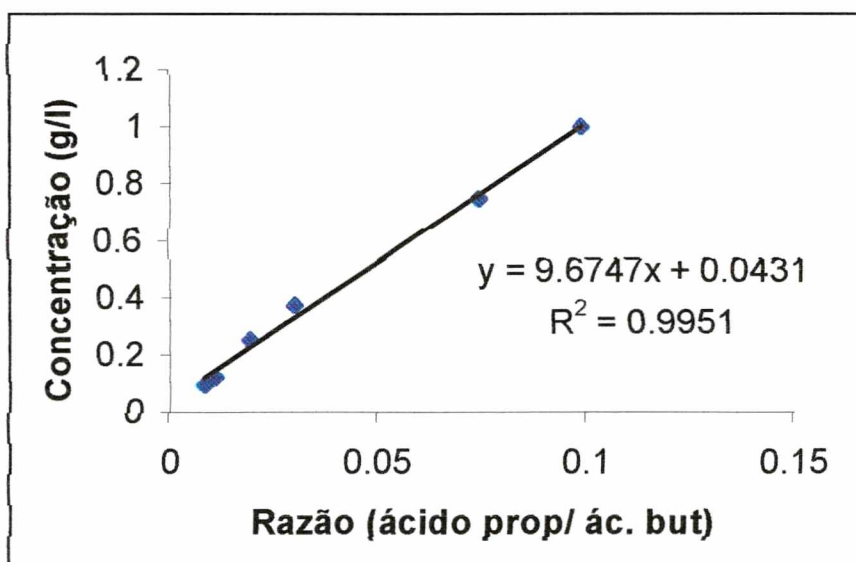


Figura A2: Curva de calibração de determinação da concentração de açúcares redutores pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS).





**Figura A3: Curva de calibração de determinação da concentração de proteínas pelo método de Biureto.**



**Figura A4: Curva de calibração de determinação da concentração de ácido propiônico pelo método sugerido por Anderson e Madden (1998)**

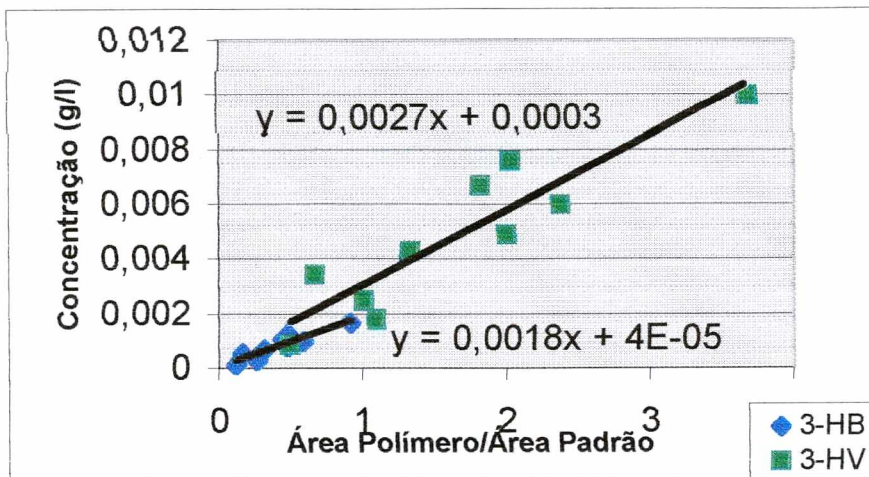


Figura A5: Curva de calibração de determinação de P(3HB-co-3HV)

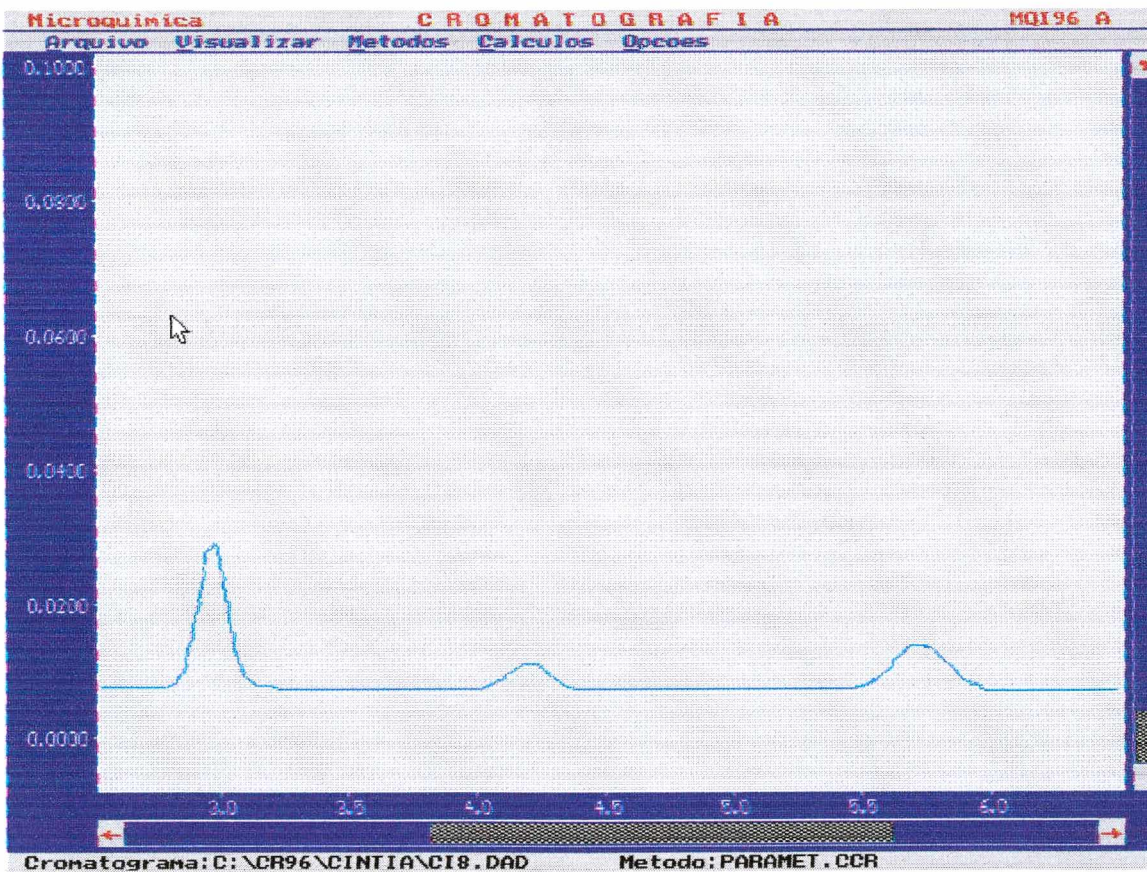


Figura A6: Apresentação de um cromatograma típico de análise de P(3HB-co-3HV)

## **ANEXO II**

**RESULTADOS EXPERIMENTAIS**

**ENSAIOS PRELIMINARES**

Estão apresentados a seguir os resultados dos ensaios preliminares referentes ao estudo da influência da fonte de carbono, da fonte de nitrogênio e da temperatura.

Apresentam-se as curvas de crescimento celular dos ensaios realizados de acordo com a disposição dos dados no capítulo de Resultados e Discussão.

A Figura A6 apresenta os resultados quando foi utilizada somente uma fonte de carbono, a Figura A7 ilustra os mesmos dados quando substratos misturados foram utilizados. Da mesma forma, as Figuras A8 e A9 apresentam os resultados para a influência da fonte de nitrogênio e da temperatura.

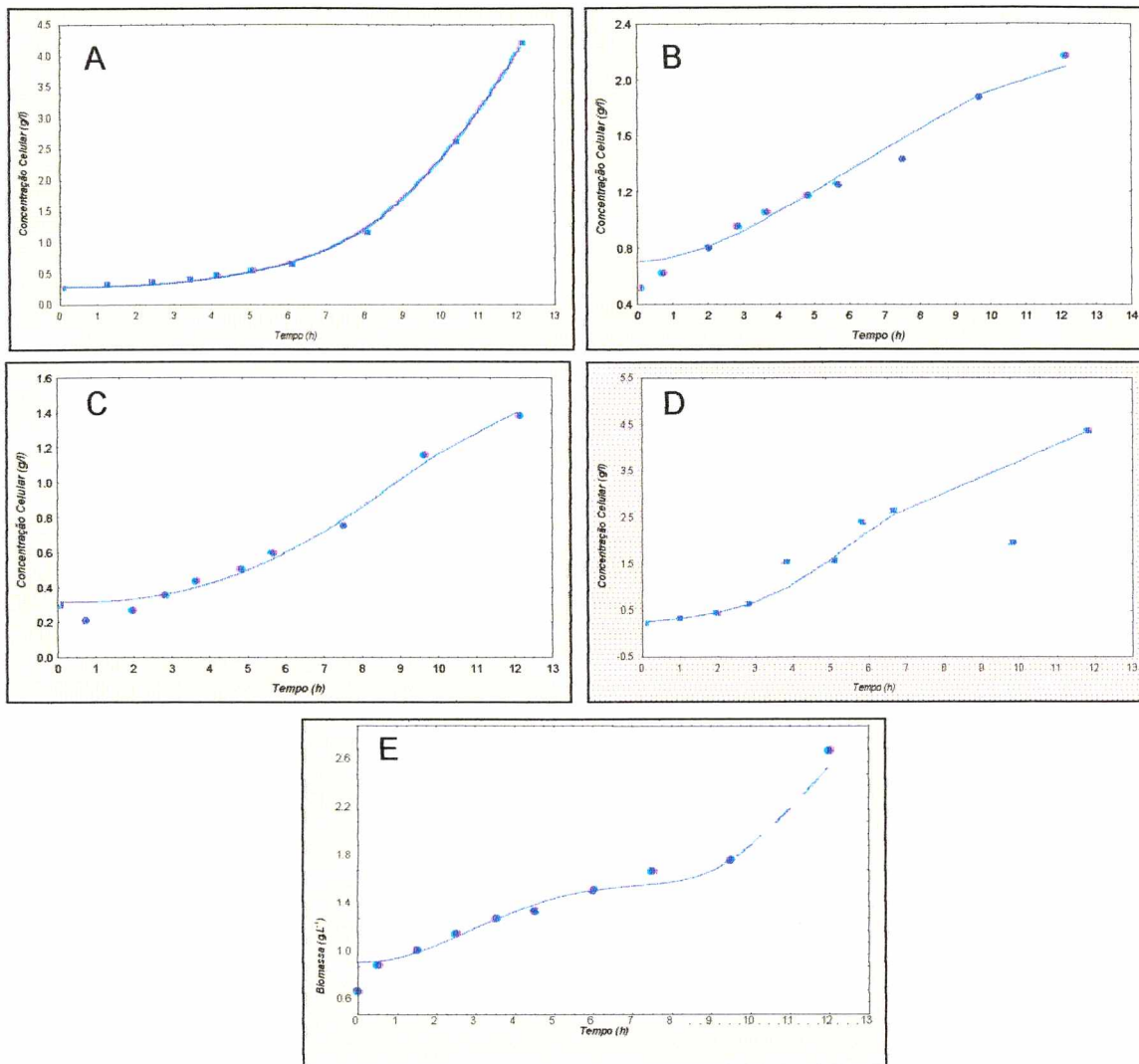
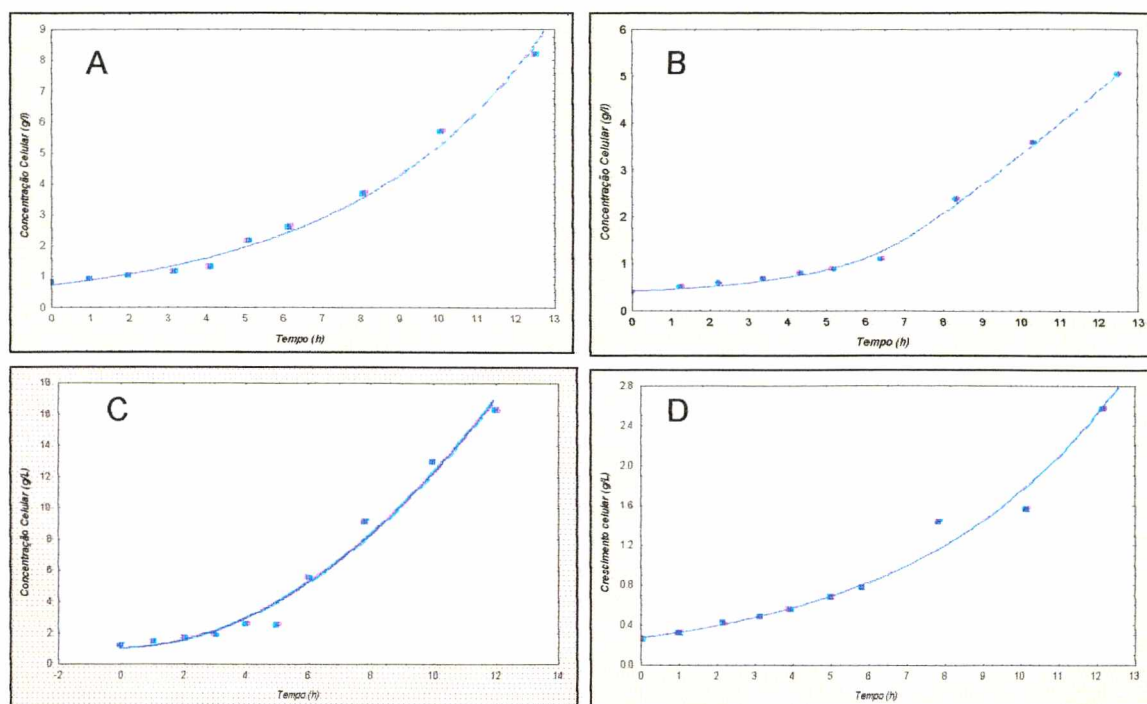
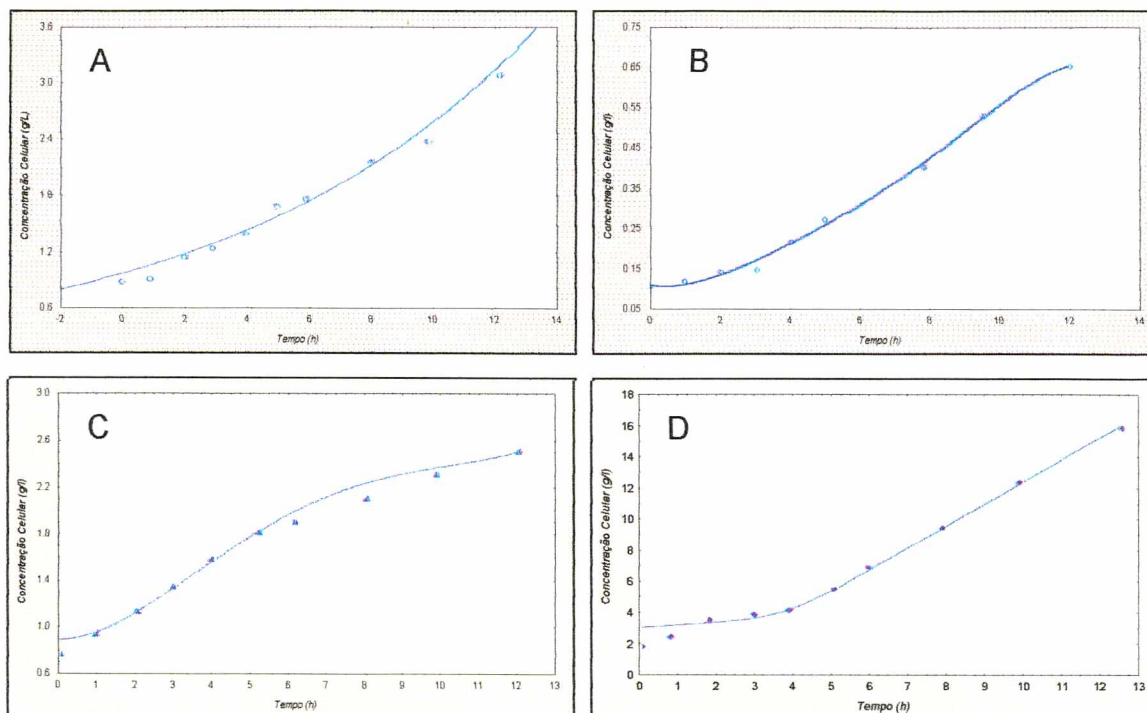


Figura A6: Gráficos de crescimento celular para diferentes fontes de carbono utilizadas como único substrato a 20 g.L<sup>-1</sup> (A – açúcar invertido; B – galactose, C – frutose; D – glicose; E – lactose hidrolisada)

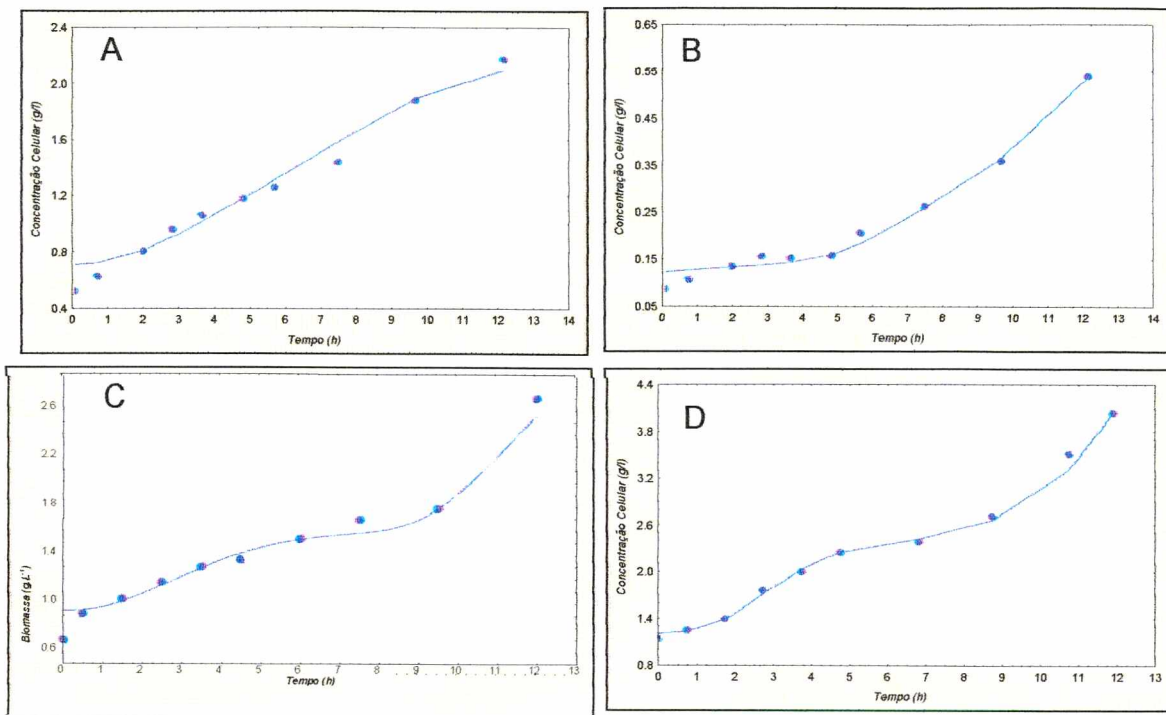


**Figura A7: Gráficos de crescimento celular para diferentes fontes de carbono associadas (A – açúcar invertido(25%), frutose (25%), glicose (25%) e lactose hidrolisada (25%) a  $30 \text{ g.L}^{-1}$ ; B – açúcar invertido(25%), frutose (25%), glicose (25%) e lactose hidrolisada (25%) a  $40 \text{ g.L}^{-1}$ , C – açúcar invertido (50%) e frutose (50%) a  $40 \text{ g.L}^{-1}$ ; D – glicose (50%) e frutose (50%) a  $40 \text{ g.L}^{-1}$ )**



**Figura A8: Gráficos de crescimento celular para diferentes fontes de carbono associadas com adição de milhocina**

(A – açúcar invertido(50%) e glicose (50%); B – açúcar invertido (50%) e lactose hidrolisada (50%) a  $40 \text{ g.L}^{-1}$ ; C – frutose a  $20 \text{ g.L}^{-1}$ ; D – açúcar invertido(25%), frutose (25%), glicose (25%) e lactose hidrolisada (25%) a  $40 \text{ g.L}^{-1}$ )



**Figura A9: Gráficos de crescimento celular para diferentes temperaturas**  
 (A – galactose a 20 g.L<sup>-1</sup> a 30°C; B – galactose a 20 g.L<sup>-1</sup> a 34°C, C – lactose hidrolisada a 20 g.L<sup>-1</sup> a 30°C, D – lactose hidrolisada a 20 g.L<sup>-1</sup> a 34°C)



## **ANEXO III**

### **RESULTADOS EXPERIMENTAIS CURVAS DE CONSUMO DE SUBSTRATO**

Estão apresentados a seguir os resultados referentes às alimentações de açúcar invertido durante as culturas para as culturas realizadas.

Apresenta-se as curvas de consumo de substrato dos ensaios realizados de acordo com a disposição dos dados no capítulo de Resultados e Discussão. As curvas são apresentadas em  $\text{g.L}^{-1}$  de substrato e os picos representam o momento em que as alimentações foram realizadas.

A Figura A10 apresenta resultados para as culturas conduzidas com carência e alimentação de fosfato. A Figura A11, para o ensaio com pulsos de ácido propiônico e soro de leite como substrato. A Figura A12 apresenta as curvas de consumo de substrato para os ensaios em que foram aplicadas as técnicas de regulação de pH e pulsos de ácido propiônico. Por fim, a Figura A13 mostra os ensaios com alimentação contínua de ácido propiônico, com e sem suplementação de ácido oleico.

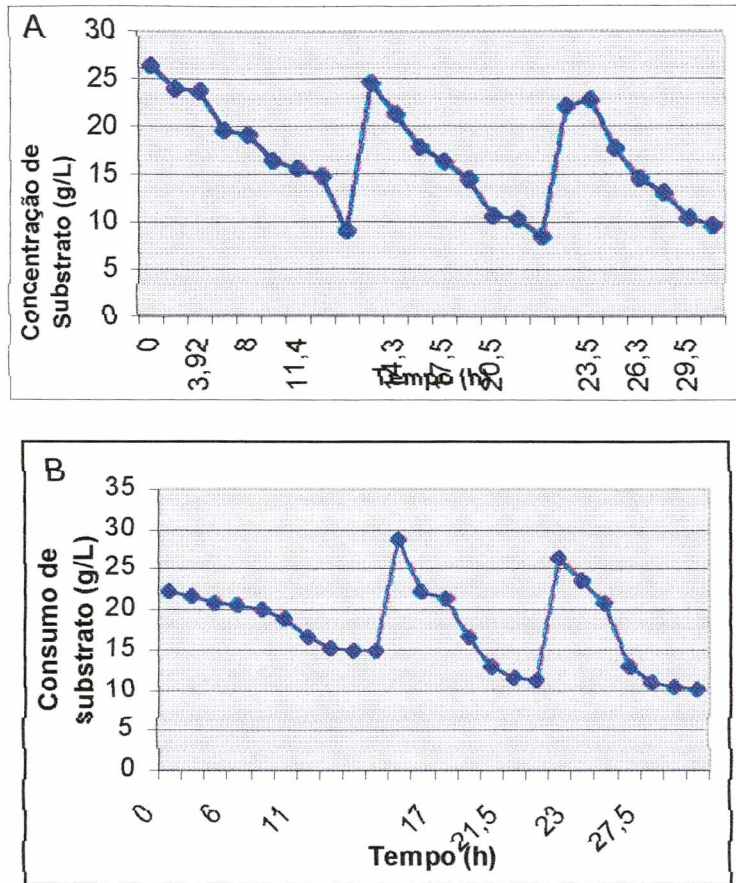


Figura A10: Curvas de consumo substrato expressas em concentração representando as alimentações realizadas para as culturas em carência (A) e alimentação (B) em fosfato.

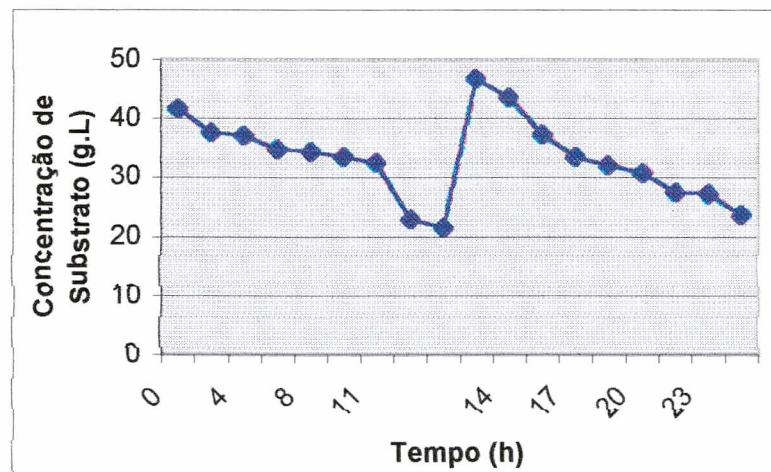


Figura A11: Curva de consumo substrato expressa em concentração representando as alimentações realizadas durante a cultura com soro de leite e pulsos de ácido propiônico.

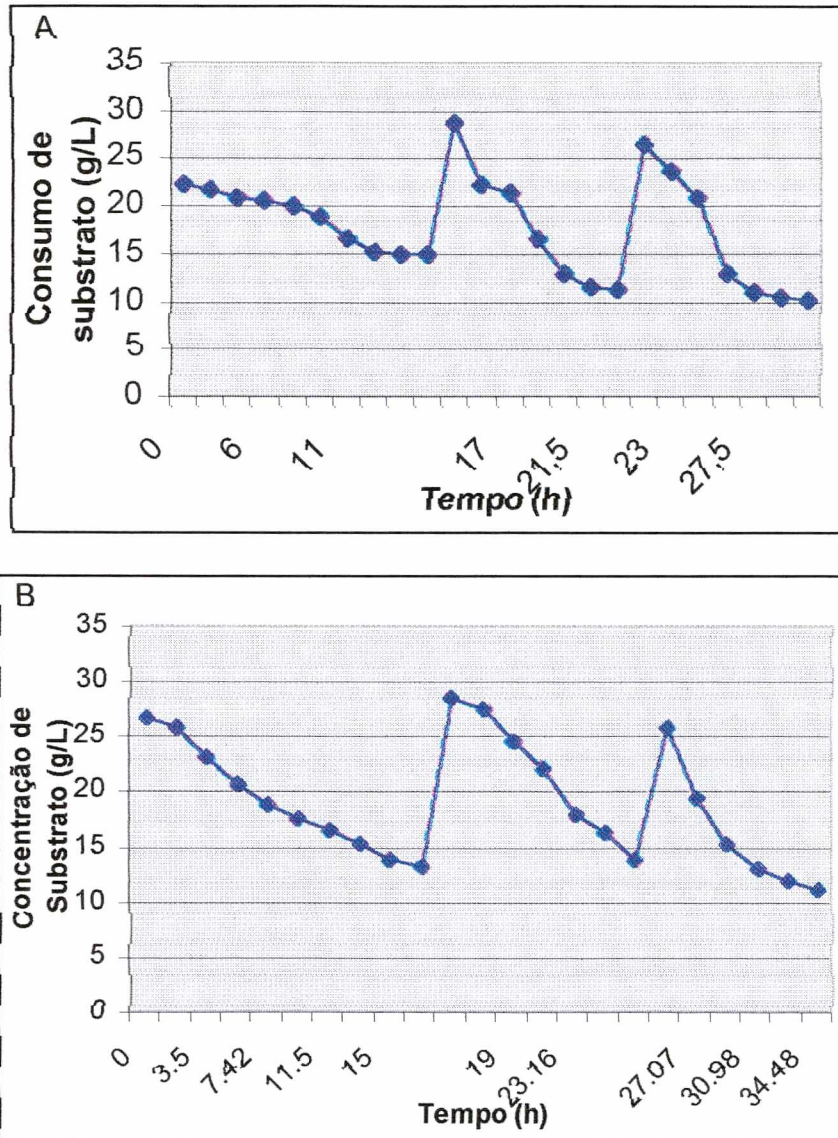


Figura A12: Curvas de consumo substrato expressas em concentração representando as alimentações realizadas para as culturas com alimentação de ácido propiônico por regulação de pH (A) e pulsos (B).

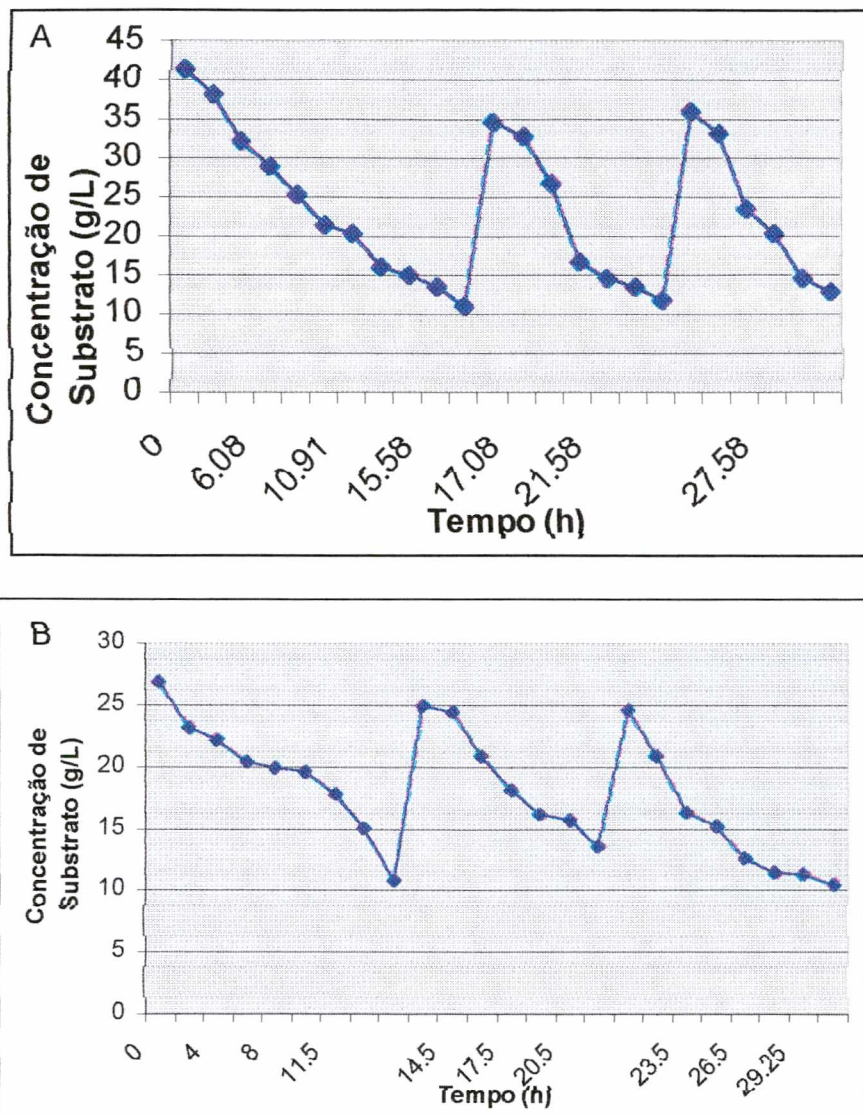


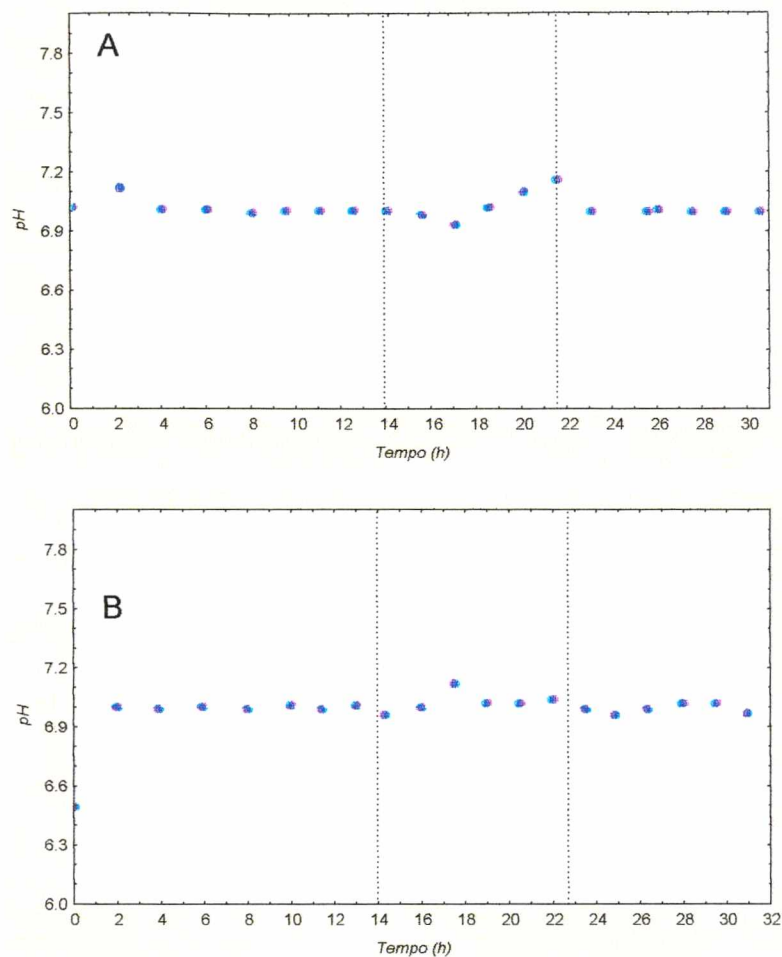
Figura A13: Curvas de consumo substrato expressas em concentração representando as alimentações realizadas para as culturas com alimentação contínua de ácido propiônico, sem suplementação de ácido oleico (A) e com ácido oleico (B).

## **ANEXO IV**

### **CULTURAS REALIZADAS GRÁFICOS DA EVOLUÇÃO DO PH**

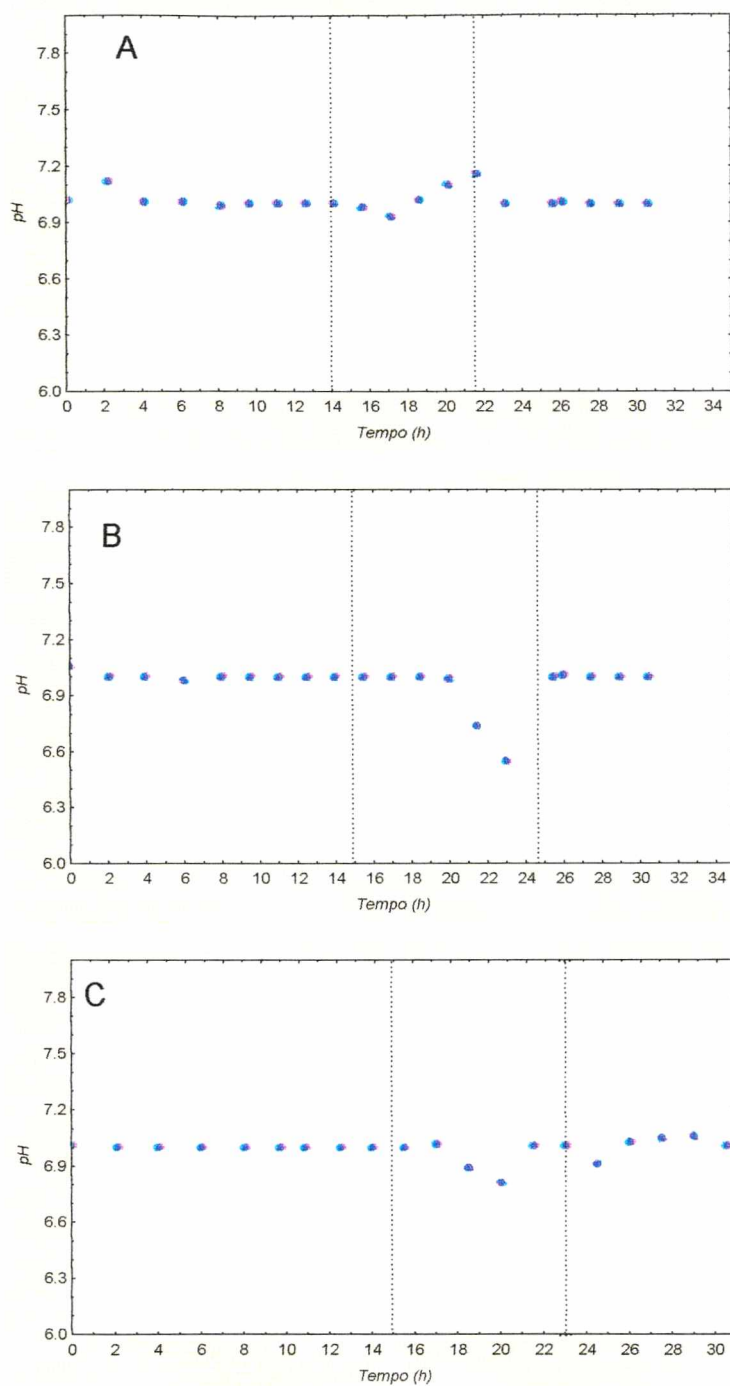
Estão apresentados a seguir os gráficos de pH em função do tempo para as culturas realizadas. As linhas pontilhadas correspondem aos momentos em que foram realizadas alimentações em açúcar invertido.

Apresenta-se as curvas dos ensaios realizados de acordo com a disposição dos dados no capítulo de Resultados e Discussão. A Figura A14 ilustra a evolução do pH para as culturas em carência e alimentação em fosfato. A Figura A15 ilustra a evolução do pH para as culturas com açúcar invertido e as três estratégias utilizadas para incorporação de 3HV. Também apresenta-se o ensaio conduzido com soro de leite (Figura A16) e com alimentação contínua suplementado com ácido oleico (Figura A17).



**Figura A14: Evolução do pH em função do tempo para as culturas realizadas (A - sob carência em fósforo)**





**Figura A15: Evolução do pH em função do tempo para as culturas realizadas com estratégias para melhorar a incorporação de unidades de 3-hidroxicincomato na molécula de polímero (A – regulação de pH; B – pulsos; C – alimentação contínua)**

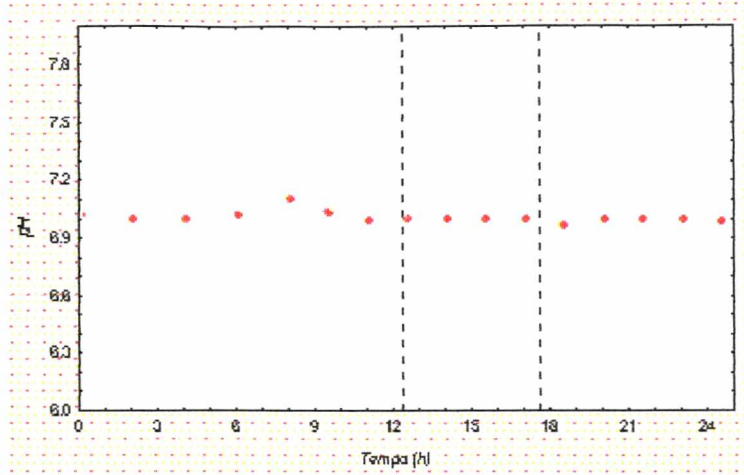


Figura A16: Evolução do pH em função do tempo para a cultura realizada com soro de leite e pulsos de ácido propiônico

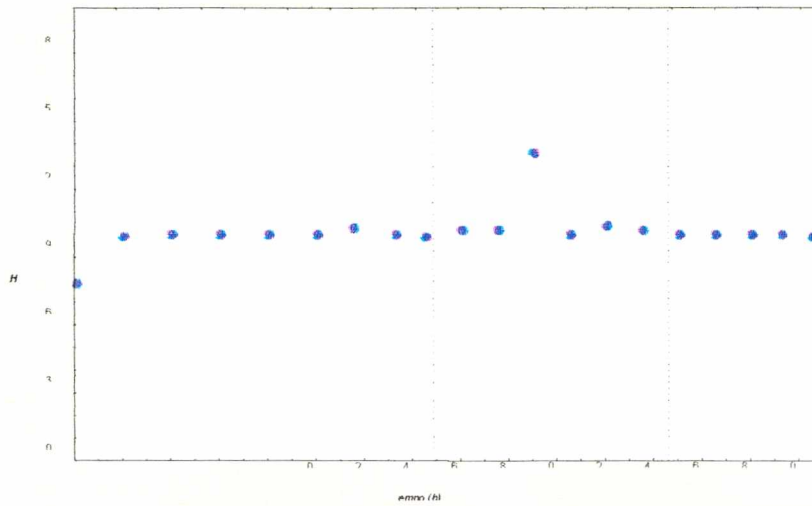


Figura A17: Evolução do pH em função do tempo para a cultura realizada com alimentação contínua de ácido propiônico e suplementada com ácido oleico

## **ANEXO V**

**CULTURAS REALIZADAS**  
**FATORES DE CONVERSÃO**

Estão apresentados a seguir os resultados aos fatores de conversão obtidos para as culturas realizadas.

Apresentam-se primeiramente as curvas que representam os fatores de conversão de substrato em biomassa total para alguns ensaios de acordo com o exposto no Capítulo de Resultados e Discussão. Os fatores de conversão são apresentados para a fase de crescimento e para a fase de produção. Nos casos em que ocorreram duas fases de crescimento, as curvas estão dispostas de acordo com os resultados. Por fim, apresentam-se as curvas que representam os fatores de conversão de ácido propiônico a 3-hidroxivalerato.

A Figura A18 apresenta resultados para o ensaio com pulsos de ácido propiônico e soro de leite como substrato. A Figura A19 apresenta as curvas de consumo de substrato para os ensaios em que foram aplicadas as técnicas de regulação de pH e pulsos de ácido propiônico. Por fim, a Figura A20 mostra o ensaio com alimentação contínua de ácido propiônico. A Figura A21 mostra os fatores de conversão de ácido propiônico em 3-hidroxivalerato para todos os ensaios.

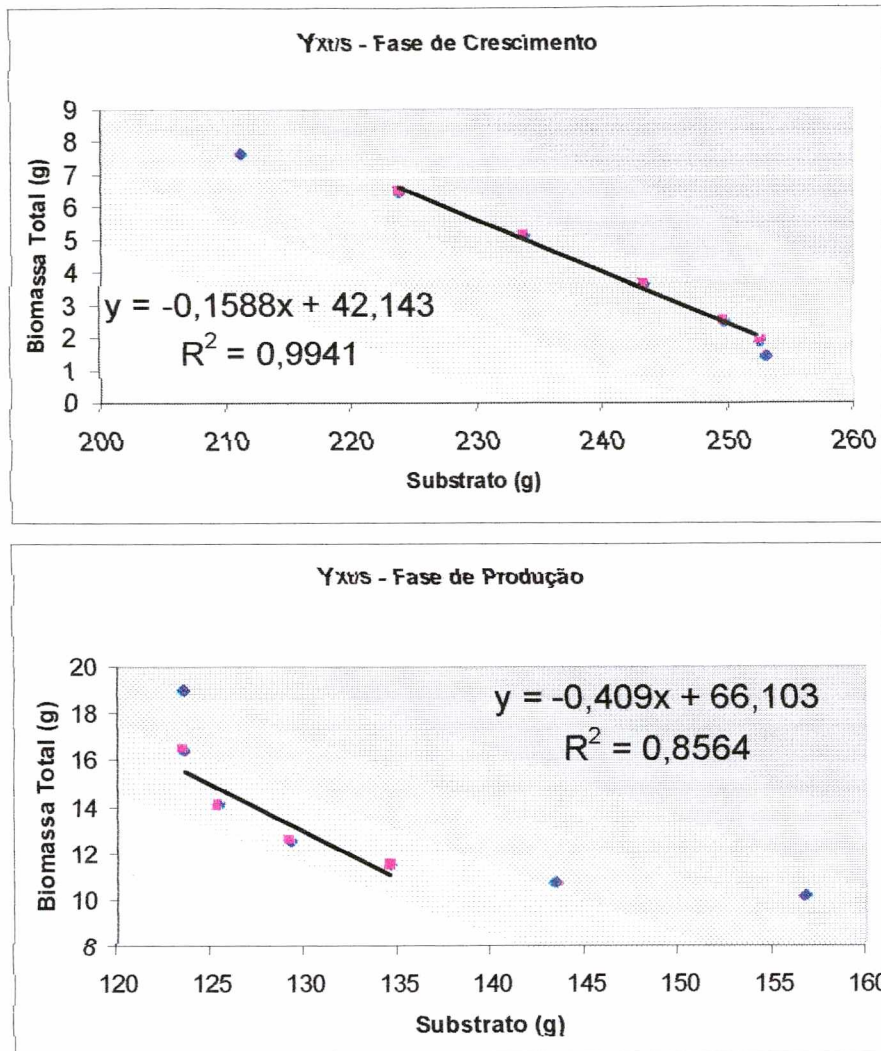
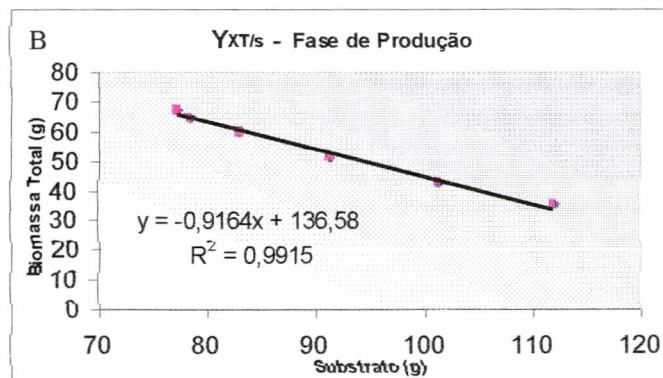
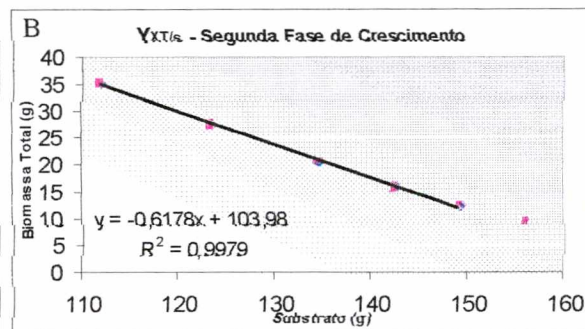
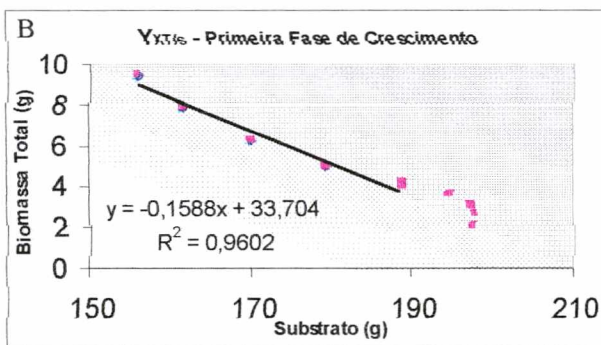
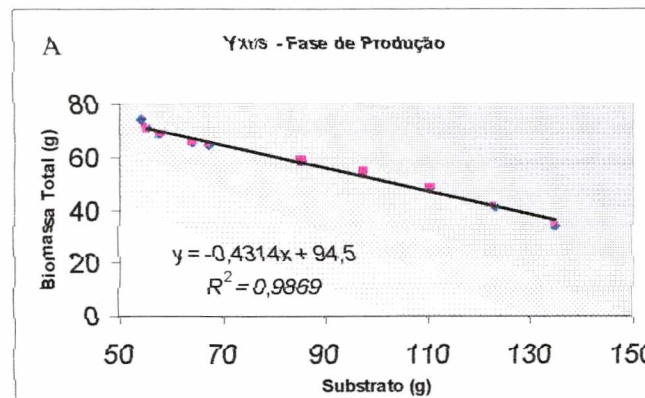
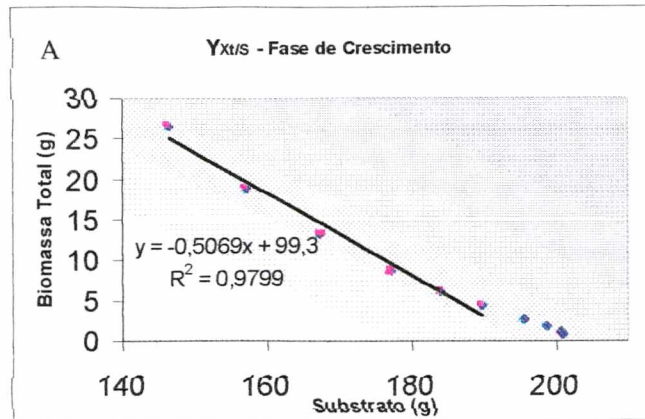


Figura A18: Curva de consumo substrato expressa em concentração representando as alimentações realizadas para a cultura com soro de leite e pulsos de ácido propiônico.



**Figura A19:** Curvas que representam os fatores de conversão de substrato em biomassa para as culturas com alimentação de ácido propiônico por regulação de pH (A) e pulsos (B).

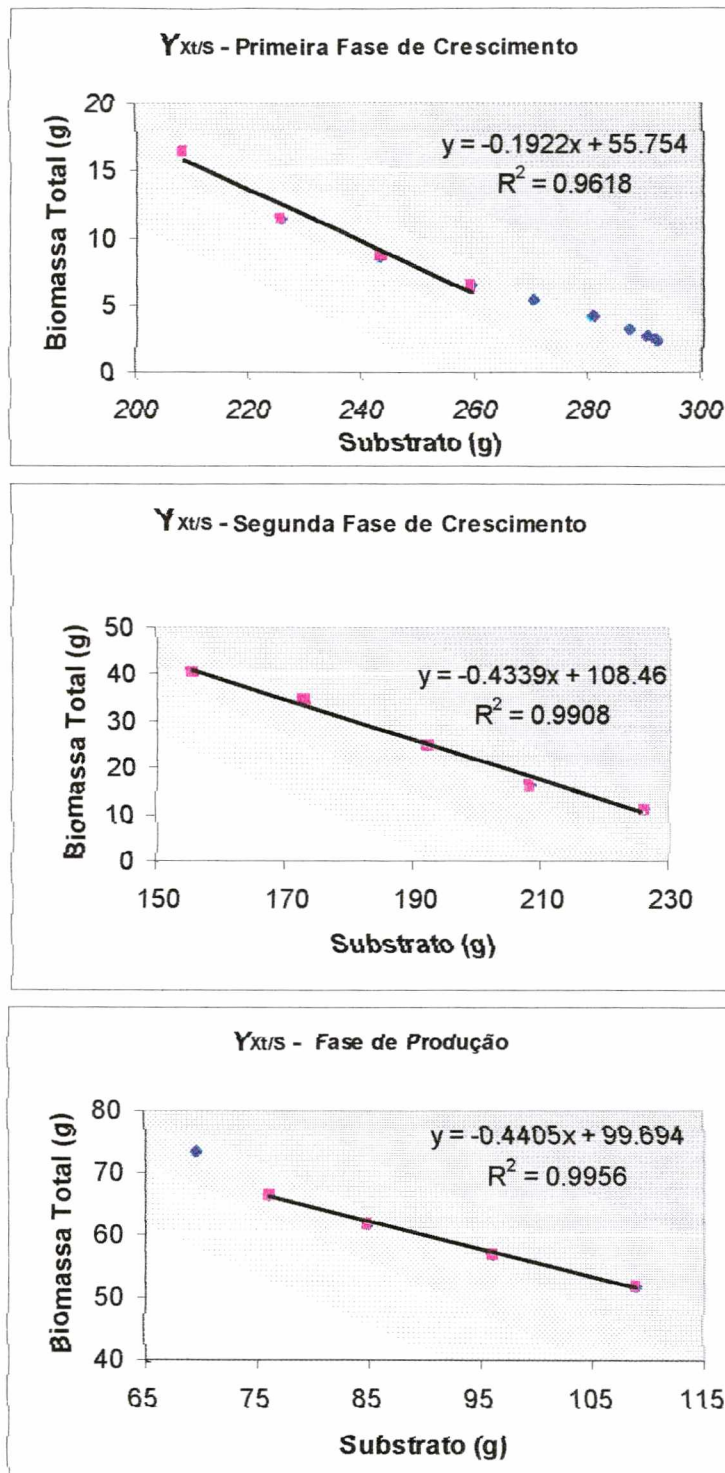
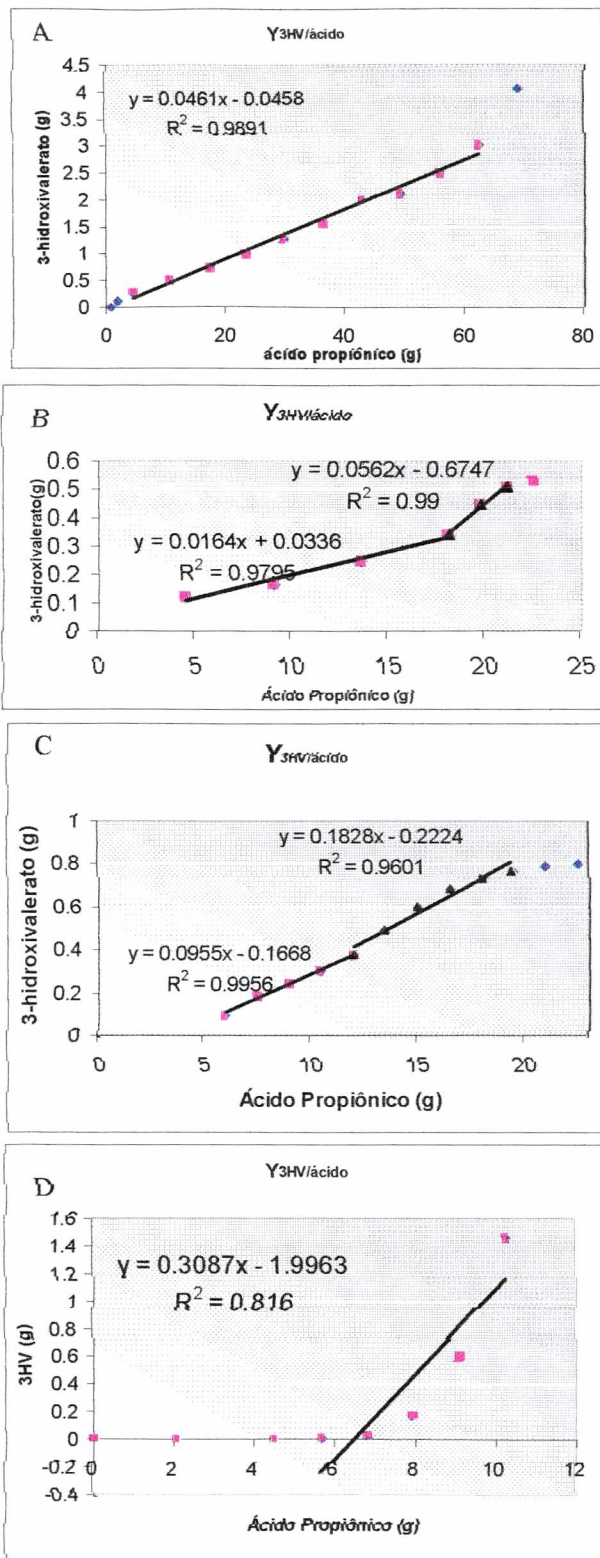


Figura A20: Curvas que representam os fatores de conversão de substrato em biomassa para a cultura com alimentação contínua de ácido propiônico



**Figura A21: Fatores de conversão de ácido propiônico em 3-hidroxicvalerato para todos os ensaios (A – regulação de pH, B – pulsos, C – alimentação contínua, D – Soro de leite).**



## **ANEXO VI**

**CARACTERIZAÇÃO DE P(3HB-co-3HV)**

**CURVAS DE DSC E TGA**

Estão apresentados a seguir os resultados referentes à caracterização do polímero P(3HB-co-3HV).

Apresenta-se as curvas obtidas nas análises de calorimetria de varredura diferencial (DSC) e termogravimetria (TGA) para o polímero recuperado e para o padrão obtido junto a SIGMA-ALDRICH com 12% de 3-hidroxivalerato.

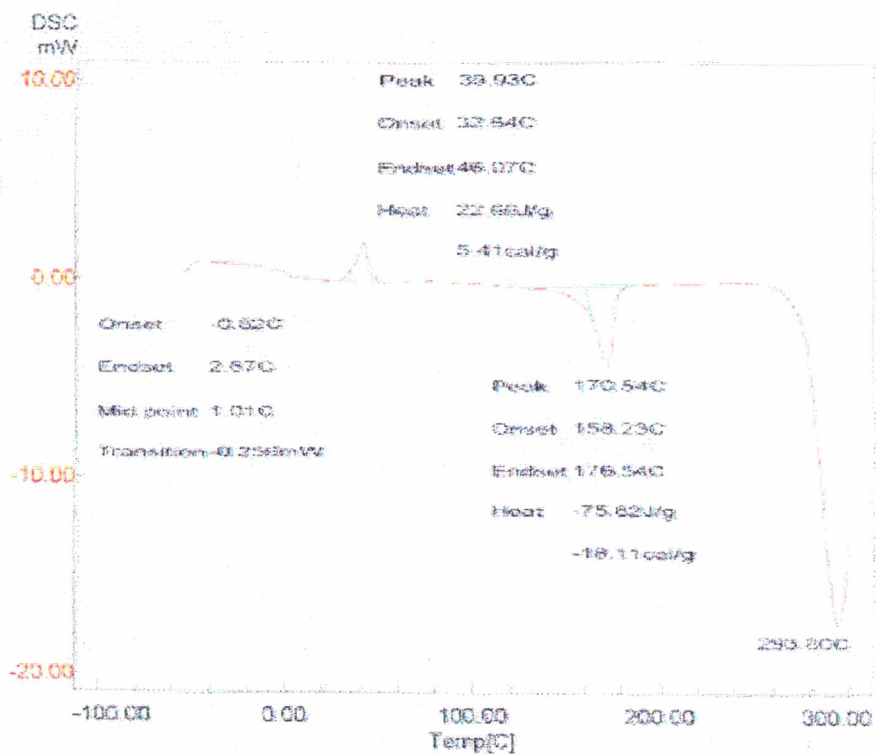


Figura A22: Curva obtida para a análise de DSC para a amostra de P(3HB-co-3HV)

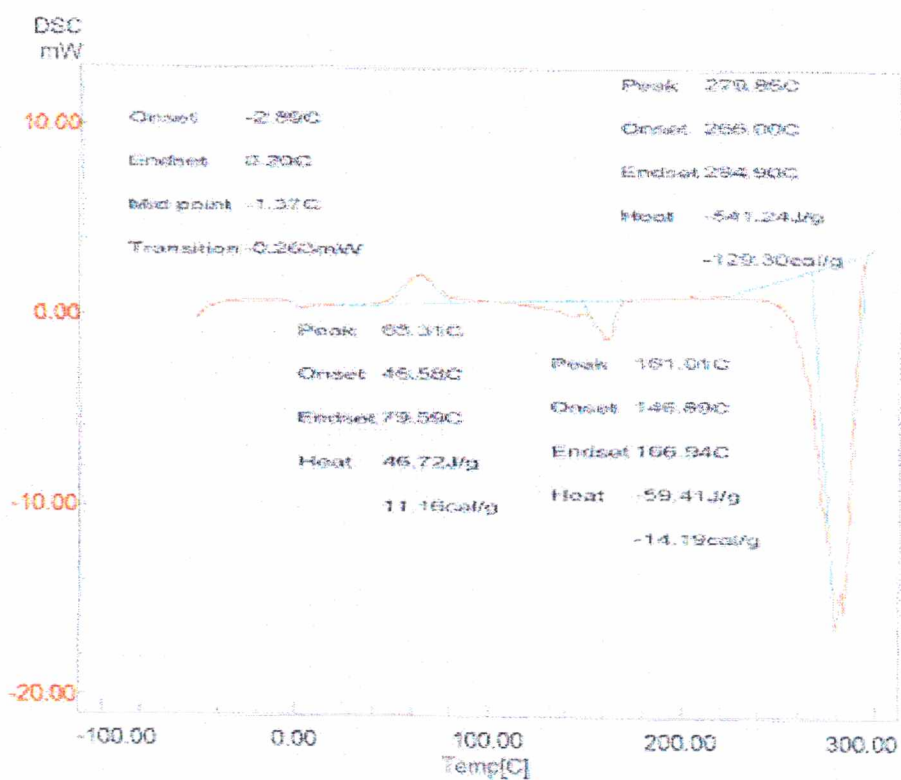


Figura A23 Curva obtida para a análise de DSC para o padrão de P(3HB-co-3HV)

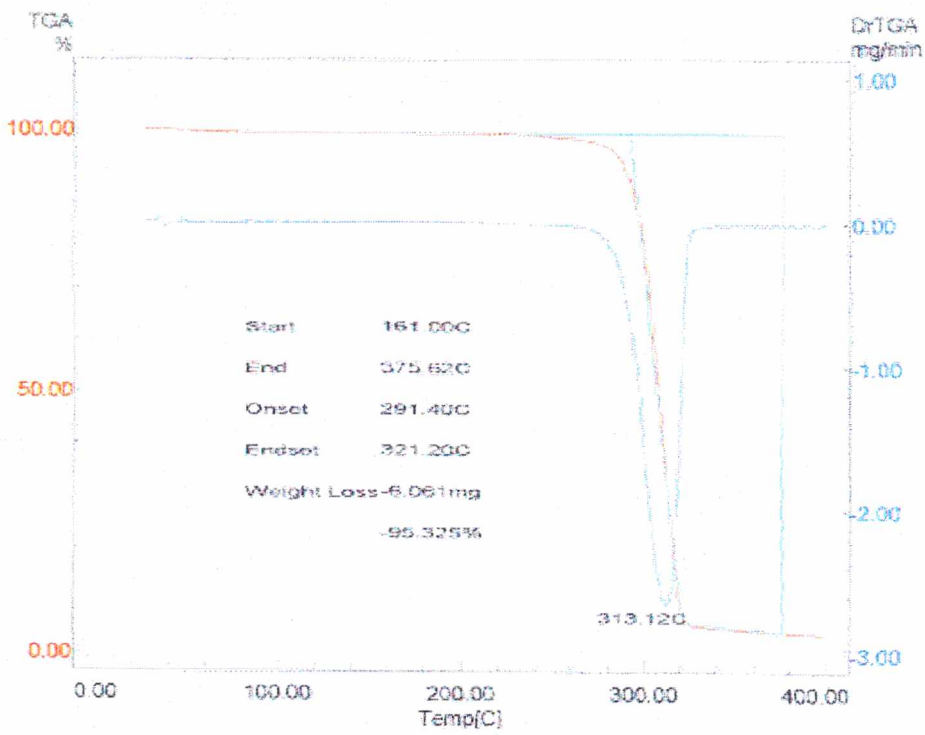


Figura A24: Curva obtida para a análise de TGA para a amostra de P(3HB-co-3HV)

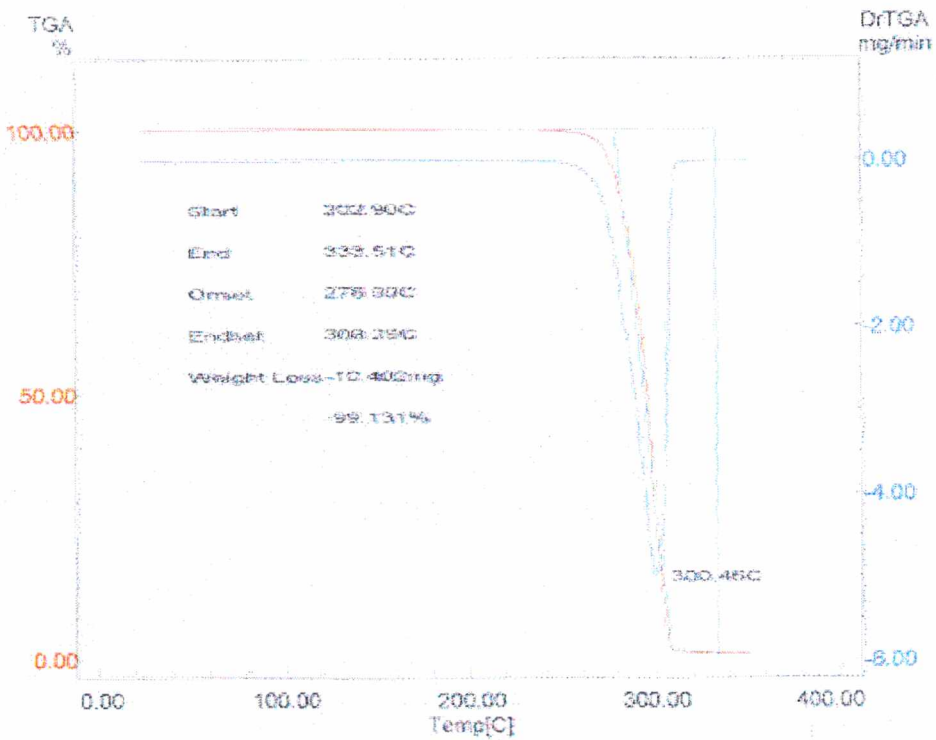


Figura A25 Curva obtida para a análise de TGA para o padrão de P(3HB-co-3HV)