

RAFAEL COSTA RODRIGUES

**CONDIÇÕES DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE POLI(3-
HIDROXIBUTIRATO) POR *Ralstonia eutropha* A PARTIR DE
RESÍDUOS DE INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS**

FLORIANÓPOLIS – SC

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**CONDIÇÕES DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE POLI(3-
HIDROXIBUTIRATO) POR *Ralstonia eutropha* A PARTIR DE
RESÍDUOS DE INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS**

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

Rafael Costa Rodrigues

Engenheiro de Alimentos

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gláucia Maria Falcão de Aragão

Florianópolis, fevereiro de 2005.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Gláucia Maria Falcão de Aragão, pela oportunidade de realizar este trabalho, e por todos os ensinamentos transmitidos durante o mesmo.

Aos colegas da equipe de trabalho pela importante colaboração para a realização deste trabalho.

À todos os colegas e amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica e do curso de Mestrado, pela amizade e companheirismo no dia-dia.

Aos meus pais e familiares, que mesmo distantes, sempre estiveram perto no meu coração, me dando forças, carinho e todo apoio para a conclusão deste trabalho.

À Giandra, meu amor, a pessoa que sempre esteve ao meu lado, me apoiando nas horas difíceis e comemorando comigo minhas alegrias, a quem dedico este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	I
NOMENCLATURA	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 DESCRIÇÃO DOS POLIHIDROXIALCANOATOS	4
2.1.1 HISTÓRICO DOS PHAs	4
2.1.2 CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES	5
2.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES	9
2.2.1 <i>RALSTONIA EUTROPHA</i>	9
2.2.2 BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>AZOTOBACTER</i>	10
2.2.3 MICRORGANISMOS METILOTRÓFICOS	10
2.2.4 BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>ALCALIGENES</i>	10
2.2.5 BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>PSEUDOMONAS</i>	11
2.2.6 <i>ESCHERICHIA COLI</i> RECOMBINANTE	11
2.2.7 PLANTAS TRANSGÊNICAS	12
2.3 DESCRIÇÃO GERAL DA <i>RALSTONIA EUTROPHA</i>	13
2.4 BIOSÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE PHAs EM <i>RALSTONIA EUTROPHA</i>	15
2.4.1 METABOLISMO DURANTE CRESCIMENTO BALANCEADO	15
2.4.2 BIOSÍNTESE DE P(3HB)	15
2.4.2.1 β -cetotiolase	16
2.4.2.2 Acetoacetyl-CoA redutase	16
2.4.2.3 PHA sintase	17
2.4.3 BIOSÍNTESE DE P(3HB-CO-3HV)	17
2.4.4 DEGRADAÇÃO INTRACELULAR DE P(3HB)	18
2.5 PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS	18

2.5.1 CULTURAS EM REGIME DE BATELADA ALIMENTADA	19
2.5.2 INFLUÊNCIA DE ALIMENTAÇÃO OU CARÊNCIA DO ELEMENTO LIMITANTE NA PRODUÇÃO DOS PHAS	20
2.5.3 INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE SUPLEMENTOS	22
2.5.4 UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO	23
2.5.4.1 Amido Hidrolisado	24
2.5.4.2 Soro de Leite	25
2.5.4.3 Melaço	26
2.5.4.4 Ácidos Orgânicos	27
2.5.4.5 Dióxido de Carbono (CO ₂)	27
2.6 BIODEGRADABILIDADE	28
2.7 APLICAÇÕES DOS PHAS	30
2.8 FATORES QUE INFLUENCIAM O CUSTO DE PRODUÇÃO DOS PHAS	31
2.8.1 PRODUTIVIDADE DE PHAS	31
2.8.2 CONTEÚDO DE PHAS NA CÉLULA	32
2.8.3 CUSTO COM SUBSTRATO E FATOR DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM PHAS	33
2.8.4 MÉTODO DE RECUPERAÇÃO	34
2.9 MODELAGEM MATEMÁTICA	35
<u>CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>37</u>
3.1 MICRORGANISMO	37
3.2 MEIOS DE CULTURA	37
3.3 CONDIÇÕES DE CULTURA	39
3.3.1 PRÉ-CULTURAS	39
3.3.2 CULTURAS EM FRASCOS AGITADOS	39
3.3.3 FONTES DE CARBONO	39
3.3.3.1 Glicose e Frutose	40
3.3.3.2 Meio Sintético Simulando Resíduo Amiláceo	40
3.3.3.3 Extrato Aquoso do Bagaço de Maçã	40
3.3.4 ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO	41
3.3.4.1 Alimentação em Açúcar	41
3.3.4.2 Alimentação com Suplementos Nutricionais	41
3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	42
3.4.1 AMOSTRAGEM	42

3.4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA	42
3.4.2.1 Medida por Espectrofotometria	42
3.4.2.2 Medida por Análise Gravimétrica	43
3.4.3 DOSAGEM DE SUBSTRATOS	43
3.4.3.1 Dosagem de Açúcares	43
3.4.3.2 Dosagem de Nitrogênio Residual	44
3.4.4 DOSAGEM DE P(3HB)	45
3.5 MODELAGEM DO CRESCIMENTO MICROBIANO	46
3.5.1 MODELO DE GOMPertz	46
3.5.2 MODELO DE GOMPertz MODIFICADO	47
3.5.3 MODELO LOGÍSTICO	47
3.5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
3.6 TRATAMENTO DOS DADOS	49
3.6.1 AJUSTES DOS DADOS EXPERIMENTAIS	49
3.6.2 ANÁLISE CINÉTICA	49
3.6.2.1 Velocidades Específicas de Crescimento	50
3.6.3 FATORES DE CONVERSÃO	50
3.6.3.1 Fator de Conversão de Substrato em Biomassa Residual	50
3.6.3.2 Fator de Conversão de Substrato em P(3HB)	50
3.6.4 PRODUTIVIDADE DE P(3HB)	51
3.6.4.1 Produtividade Média de P(3HB)	51
3.6.4.2 Produtividade de P(3HB) na Fase de Produção	51
<u>CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>52</u>
4.1 AVALIAÇÃO E MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE <i>R. EUTROPHA</i>	52
4.1.1 CONCLUSÃO	61
4.2 PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) EM RESÍDUOS DE INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS	62
4.2.1 CONCLUSÃO	76
<u>CAPÍTULO V - CONCLUSÕES E SUGESTÕES</u>	<u>77</u>
<u>CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>79</u>
<u>ANEXOS</u>	<u>89</u>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura geral dos polihidroxicanoatos e alguns membros representativos.....	6
Figura 2: <i>R. eutropha</i> em (a) fase de crescimento e (b) fase de produção.	13
Figura 3: Curva de crescimento microbiano com os parâmetros biológicos em função do tempo.....	46
Figura 4: Curva padrão para determinação da concentração de açúcares redutores.	89
Figura 5: Curva padrão para determinação de P(3HB).	89
Figura 6: Cromatograma referente a análise de P(3HB).	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação das propriedades de polímeros.....	8
Tabela 2: Resumo da produção de P(3HB) a partir de substratos de baixo custo por vários microrganismos	24
Tabela 3: Possíveis aplicações dos PHAs	30
Tabela 4: Efeito do custo com substrato e rendimento em polímero no custo de produção de P(3HB).....	33
Tabela 5: Composição do meio mineral (MM).....	38
Tabela 6: Composição da solução concentrada de oligo-elementos	38
Tabela 7: Procedimento de determinação de nitrogênio amoniacal.....	44

NOMENCLATURA

λ	Duração da fase lag (h)
μ_{\max}	Velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1})
3HB	3-hidroxibutirato
3HV	3-hidroxivalerato
4HB	4-hidroxibutirato
A	Aumento logarítmico da população
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
CO_2	Dióxido de carbono
DNS	Dinitrosalicílico
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
LCL	Comprimento de cadeia longa
MCL	Comprimento de cadeia média
MSE	Erro médio quadrático
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NH_4^+	Nitrogênio amoniacal
P(3HB)	Poli(3-hidroxibutirato)
P(3HB-co-3HV)	Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
PHAs	Polihidroxialcanoatos
rpm	Rotações por minuto
S	Substrato
SCL	Comprimento de cadeia curta
TCA	Ciclo dos ácidos tricarbóxicos
X_r	Biomassa Residual
X_t	Biomassa total
$Y_{\text{P(3HB)}/\text{S}}$	Fator de conversão de substrato em P(3HB)
$Y_{\text{Xr}/\text{S}}$	Fator de conversão de substrato em biomassa residual

RESUMO

Poli(3-hidroxi-butirato), P(3HB), é um polímero de reserva de carbono e energia acumulado intracelularmente por diversos microrganismos, sob condições desbalanceadas de crescimento. Além da vantagem de ser biodegradável e biocompatível, possui propriedades termoplásticas compatíveis aos plásticos convencionais. Embora apresente estas vantagens, apresenta um elevado custo de produção frente aos polímeros petroquímicos, o que dificulta o seu uso. Neste trabalho estudou-se a produção de P(3HB) em resíduos de indústrias de alimentos, objetivando reduzir os custos de produção. Primeiramente, verificou-se a capacidade de crescimento da bactéria *Ralstonia eutropha* nos resíduos das indústrias amiláceas e indústrias processadoras de maçã. Testou-se três modelos primários de crescimento, e o modelo Logístico, foi o que melhor descreveu o crescimento da bactéria nas diferentes fontes de carbono testadas. Após verificar a capacidade de crescimento da bactéria, foi realizada a produção de P(3HB), nos resíduos das indústrias de alimentos, e também a suplementação do meio de cultura com ácido oléico e óleo de soja, visando aumentar a produção de polímero. O resíduo da indústria amilácea mostrou-se uma boa fonte de carbono para a produção de P(3HB), onde os conteúdos de polímero acumulado foram de 46, 50 e 56% com produtividades de 0,22; 0,37 e 0,49 g.L⁻¹.h⁻¹ para as culturas sem suplementação, suplementação com ácido oléico e suplementação com óleo de soja. Quando se realizou o crescimento no resíduo da indústria processadora de maçã os conteúdos de P(3HB) acumulados foram de 14, 34 e 22% do total da massa celular seca, para as culturas sem suplementação, suplementação com ácido oléico e suplementação com óleo de soja. Apesar do baixo conteúdo de polímero acumulado, a utilização do bagaço de maçã como fonte de carbono para a produção de polihidroxialcanoatos é uma boa alternativa, pois é uma matéria-prima barata que pode contribuir na redução dos custos de produção deste biopolímero. A adição dos suplementos nutricionais ao meio de cultura favoreceu a produção de P(3HB) aumentando o conteúdo de polímero acumulado e a produtividade.

Palavras-chave: Polihidroxialcanoatos; resíduos das indústrias de alimentos; *Ralstonia eutropha*; P(3HB)

ABSTRACT

Poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB), is a polymer accumulated intracellularly as carbon and energy storage material by several microorganisms, under unbalanced growth conditions. Besides the advantage of being biodegradable and biocompatible, possess thermoplastics properties similar to the conventional plastics. However, its high cost of production related to petrochemical-based plastics limits its use. In this work was studied the production of P(3HB) in food industries wastes, aiming to reducing the production costs. Firstly, it was verified if the bacteria *Ralstonia eutropha* presents capacity of growth in the wastes from starchy industry and apple processing industry. Three primary models of growth were tested, and the Logistic model, it was what best described the growth of the bacteria in the different used carbon sources. After verifying the capacity of growth of the bacteria, the production of P(3HB) was accomplished, in the food industries wastes, and also the supplementation of the culture medium with oleic acid and soybean oil, aiming to increase the polymer production. The starchy industry waste was shown a good carbon source for the P(3HB) production, where the polymer contents accumulated were of 46, 50 and 56% with productivities of 0,22; 0,37 and 0,49 g.L⁻¹.h⁻¹ for the cultures without supplementation, supplemented with oleic acid and supplemented with soybean oil. When realized the growth in the apple processing industry the P(3HB) contents accumulated were of 14, 34 and 22% of the total of the cell mass weight, for the cultures without supplementation, supplemented with oleic acid and supplemented with soybean oil. In spite of the low polymer content, the use of the apple pomace as carbon source for the polyhydroxyalkanoates production is a good alternative, because it is a cheap raw material that can contribute in the reduction of the production costs of this biopolymer. The addition of the nutritional supplements to the culture media favored the P(3HB) production increasing the polymer content and the productivity.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates; food industries wastes; *Ralstonia eutropha*; P(3HB)

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

Os plásticos têm papel fundamental na sociedade moderna, onde são utilizados de múltiplas formas. Além disso, têm-se desenvolvido inúmeras aplicações para as quais anteriormente eram utilizados outros materiais, como metais, vidro, madeira, papel, etc., ou seja, os plásticos possuem não apenas um grande mercado, como também representam um mercado em crescimento. Devido ao fato de algumas aplicações dos plásticos, como por exemplo, o seu uso em embalagens, serem de descartabilidade muito rápida, associado à grande dificuldade de degradação destes materiais no ambiente, os plásticos têm despertado grande preocupação (Gomez e Bueno Netto, 2001).

Como resposta aos problemas ambientais causados pela produção e acúmulo de materiais plásticos de origem petroquímica, assim como o esgotamento das fontes de combustíveis fósseis, muitos países estão realizando estudos de gerenciamento do volume de lixo sólido, incluindo a diminuição do resíduo plástico através do desenvolvimento de materiais plásticos biodegradáveis (Lee, 1996b).

Os bioplásticos possuem propriedades termoplásticas e características de desempenho semelhantes às dos plásticos convencionais, mas são facilmente degradados pela ação de microrganismos no meio ambiente. Diversos materiais que reúnem essas características (termoplasticidade e biodegradabilidade) têm sido estudados e produzidos comercialmente; dentre eles pode-se citar: poliglicolato, poli-e-caprolactona (PCL), álcool polivinílico (PVOH), polihidroxialcanoatos (PHAs) (Gomez e Bueno Netto, 2001).

Os polihidroxialcanoatos 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 da célula. São polímeros 100% biodegradáveis e biocompatíveis.

Dentre os PHAs, pelo menos o poli-3-hidroxi-butirato, P(3HB), e seu copolímero poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato, P(3HB-co-3HV), têm despertado interesse científico, tecnológico e industrial em diversos países, pois além de serem termoplásticos biodegradáveis, podem ser sintetizados por cultivo submerso a partir de matérias-primas renováveis.

Muitos são os microrganismos produtores de PHAs 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 grandes quantidades de sua massa seca em polímero, com alto peso molecular e utilizando diferentes tipos de substrato como glicose, frutose, ácidos orgânicos, entre outros.

O processo de produção de P(3HB) por *R. eutropha* é normalmente conduzido em duas fases: uma fase de crescimento não limitado para acúmulo de biomassa em um meio de cultura balanceado e, na seqüência, uma fase de limitação ou exaustão de um ou mais elementos nutritivos associado ao fornecimento de excesso de fonte de carbono, para favorecer o acúmulo intracelular do polímero.

A produção dos polihidroxi-alcanoatos esbarra em seu elevado custo de produção quando comparado ao dos polímeros derivados do petróleo. Porém, estudos têm sido realizados para tentar minimizar os custos de produção através da utilização de fontes de carbono de baixo custo, desenvolvimento de novas linhagens e técnicas mais eficientes para extração e recuperação do polímero (Du *et al.*, 2001b; Marangoni *et al.*, 2001).

Este trabalho teve como **objetivo geral** estudar condições de cultura para a produção de polihidroxicanoatos, utilizando substratos de baixo custo, como resíduos das indústrias de alimentos.

E como **objetivos específicos**:

- Avaliar a capacidade de crescimento de *Ralstonia eutropha* em resíduos das indústrias processadoras de maçã e amilácea como fonte de carbono;
- Estudar um modelo matemático primário que descreva o crescimento da bactéria nestes substratos;
- Estudar a produção de polihidroxiacetato, P(3HB), nos dois resíduos de indústria de alimentos;
- Estudar adição de suplementos nutricionais (ácido oléico, óleo de soja) a fim de aumentar a produção de polímero.

O presente trabalho será apresentado em diferentes partes. O Capítulo II traz uma revisão bibliográfica sobre os polihidroxicanoatos. No Capítulo III, são apresentados o material e os métodos empregados para este estudo. Os resultados estão no Capítulo IV, e serão apresentados na forma de artigos. As conclusões e sugestões estão no Capítulo V. No Capítulo VI, estão as referências bibliográficas utilizadas.

CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DESCRIÇÃO DOS POLIHIDROXIALCANOATOS

2.1.1 Histórico dos PHAs

Em 1923, Lemoigne relatou que culturas da bactéria *Bacillus subtilis*, quando sofriam autólise em água destilada, reduziam o pH devido à liberação de um ácido desconhecido. Posteriormente, Lemoigne identificou que o ácido liberado pela autólise de *Bacillus megaterium* era o ácido 3-hidroxi-butírico, que era acumulado no interior das células desta bactéria na forma de polímero, poli-3-hidroxi-butirato (P(3HB)) (Gomez e Bueno Netto, 2001). Em 1958, a via funcional de P(3HB) foi proposta por Macrae e Wilkinson, que observaram que *B. megaterium* estocava o homopolímero especialmente quando a razão das fontes de glicose/nitrogênio no meio estava alta, e que a subsequente degradação ocorria rapidamente na ausência da fonte de carbono e energia. Concluíram, então, que P(3HB) era um material de reserva de carbono e energia (Braunegg *et al.*, 1998).

A descoberta de outros monômeros diferentes do ácido 3-hidroxi-butírico foi feita por Wallen e Rohwedder em 1974, ao isolarem estes poliésteres do lodo ativado. Os polihidroxi-alcanoatos são compostos principalmente de 3-hidroxiácidos, mas unidades monoméricas compostas de 4, 5 e 6-hidroxi-alcanoatos já foram observadas (Doi *et al.*, 1988; Steinbuchel e Valentin, 1995). Em 1976, a empresa inglesa Imperial Chemical Industries (ICI) retomou a avaliação do P(3HB), por fermentação bacteriana, objetivando sua produção e comercialização como uma alternativa aos plásticos gerados a partir de matérias-primas derivadas do petróleo. No início dos anos 80, lançou patentes para a produção, extração e mistura de P(3HB) com outros polímeros orgânicos. A companhia também desenvolveu um processo de produção, por fermentação, do copolímero de 3-hidroxi-butirato (3HB) e 3-hidroxi-valerato (3HV), a partir de substratos como glicose e ácido propiônico, que foi comercializado com o nome de Biopol[®]. Em 1990, foi lançado na Alemanha o primeiro produto obtido a partir de

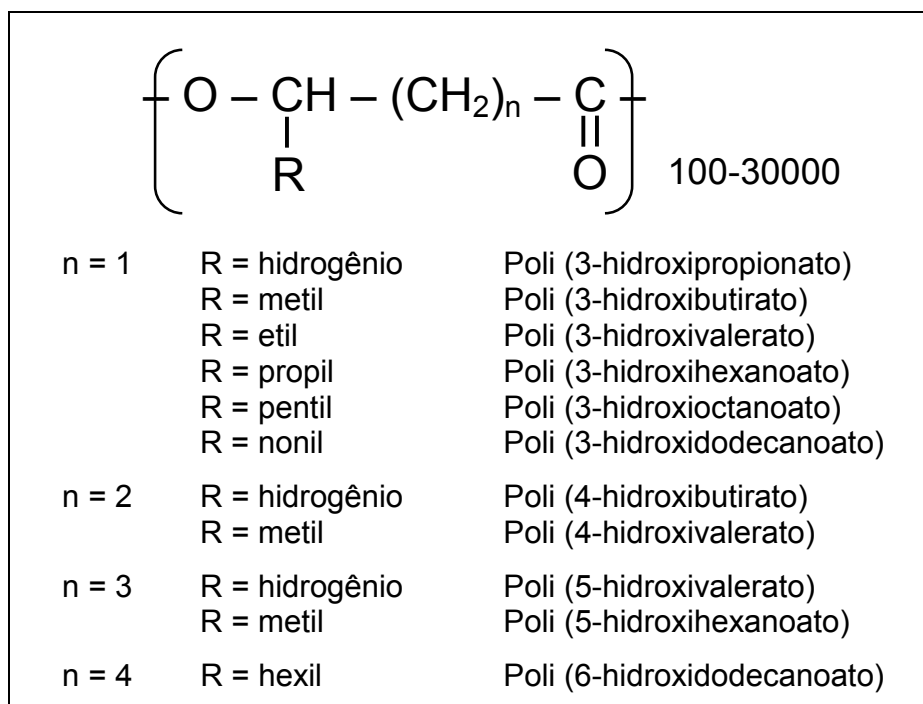
PHAs, uma embalagem de xampu para a indústria de cosméticos Wella (Braunegg *et al.*, 1998; Sudesh *et al.*, 2000).

No Brasil, a produção de PHAs começou a partir dos anos 90. Um projeto envolvendo o Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), e a empresa Copersucar, iniciou as pesquisas de produção de P(3HB) a partir cana-de-açúcar. Em 1995, foi implantada uma planta piloto, na Usina da Pedra em Serrana - SP, para a produção de PHAs, com o objetivo de produzir P(3HB) para suprir o mercado para testes e provas. Essa é a única produção industrial de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) a partir de cana-de-açúcar, constituindo em uma produção integrada na usina sucroalcooleira. A resina comercialmente conhecida como BioCycle[®], está sendo produzida em escala-piloto e destinada a universidades, empresas e centros de pesquisa e desenvolvimento (Nonato *et al.*, 2001; Pachione, 2004).

2.1.2 Características e Propriedades

Polihidroxicanoatos são poliésteres de hidroxialcanoatos sintetizados por várias bactérias e armazenados na formas de inclusões citoplasmáticas como reserva energética e poder redutor. Estes polímeros têm atraído recentemente muita atenção devido a seu uso potencial como termoplásticos biodegradáveis e elastômeros, além de serem produzidos a partir de substratos renováveis (Byrom, 1987; Anderson e Dawes, 1990; Doi, 1990; Lee e Chang, 1995).

A fórmula estrutural geral da unidade monomérica destes polímeros está apresentada na Figura 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, 1996b). O radical R pode variar de um único átomo de H, até tridecil (C₁₃), podendo conter insaturações, grupos aromáticos ou ainda ligações a elementos como flúor, cloro e cromo. Os 3-hidroxialcanoatos são monômeros mais encontrados, porém, 4, 5 e 6-hidroxialcanoatos já foram identificados como constituintes de PHAs sintetizados por bactérias (Steinbuechel e Valentin, 1995; Madison e Huisman, 1999).



Fonte: Lee, 1996b

Figura 1: Estrutura geral dos polihidroxi alcenoatos e alguns membros representativos.

Os PHAs podem ser divididos em dois grupos dependendo do número de átomos de carbono nas unidades monoméricas: polímeros de comprimento de cadeia curta (SCL), que consistem-se de moléculas compostas de unidades monoméricas com 3-5 átomos de carbono; e polímeros de comprimento de cadeia média (MCL) que consistem-se de polihidroxi alcenoatos formados por unidades monoméricas com 6-14 átomos de carbono (Lee, 1996a). Estes últimos têm um menor nível de cristalinidade do que os polímeros formados de 3-hidroxi alcenoatos, P(3HB) e P(3HB-co-3HV), e são mais elásticos (Reddy *et al.*, 2003).

O peso molecular dos polímeros está na faixa de 2×10^5 a 3×10^6 Daltons, dependendo do microrganismo e das condições de crescimento (Lee, 1996a). Estudos com vários organismos têm mostrado que os grânulos típicos de P(3HB) têm diâmetro de 0,2 a 0,7 μm e são circundados por uma membrana composta por cerca de 2% de proteínas e 0,5% de lipídios, cuja espessura é de 2nm (Braunegg *et al.*, 1998). As cadeias de polímeros geralmente formam hélices e cada grânulo contém, provavelmente, um mínimo de 1000 moléculas (Anderson e Dawes, 1990).

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 P(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).

As propriedades desejáveis às diferentes aplicações de um material plástico são: ponto de fusão elevado, 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 na qual inicia-se 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) possui resistência aos raios UV superior à do polipropileno e excelente impermeabilidade ao oxigênio (Holmes, 1985). É completamente estereoespecífico, com todos os átomos de carbono assimétricos na configuração D(-), o que o torna altamente cristalino (55-80%), e relativamente frágil. Sua temperatura de transição vítrea é aproximadamente 5°C e a temperatura de fusão, conforme Tabela 1, é de aproximadamente 179°C (Lee, 1996a).

Tabela 1: Comparação das propriedades de polímeros

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

¹ Poli(3-hidroxi butirato-co-4hidroxi butirato)

² Poli(3-hidroxi hexanoato-co-3-hidroxi octanoato)

Fonte: Lee, 1996a.

As propriedades mecânicas do P(3HB), incluindo Módulo de Young, e tensão de cisalhamento, são similares às do polipropileno (PP). Porém, sua resistência à ruptura (5%) é muito menor que a do PP (400%). O P(3HB-co-3HV) tem melhores propriedades mecânicas. O copolímero é mais flexível e tem maior resistência à ruptura conforme aumenta a fração de 3HV. Além disso, o decréscimo da temperatura de fusão com o aumento da fração de 3HV, sem afetar a temperatura de degradação, permite melhor processamento térmico do copolímero. Assim, as propriedades do P(3HB-co-3HV) podem ser controladas pelo ajuste da fração de 3HV durante a cultura em biorreator (Lee, 1996a).

2.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES

Os microrganismos capazes de acumular PHAs 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 tem grande influência no custo de fabricação do polímero (Anderson e Dawes, 1990). Alguns fatores como habilidade para utilizar fontes de carbonos baratas, velocidades de crescimento e síntese de polímero, e o máximo conteúdo de polímero acumulado, devem ser levados em conta na escolha do microrganismo (Lee e Chang, 1995).

Os microrganismos produtores de polihidroxialcanoatos são divididos em dois grupos. O primeiro grupo requer a limitação de um dos nutrientes essenciais ao crescimento para a produção do polímero, ao qual se tem como representantes, entre outros, *Ralstonia eutropha* e *Pseudomonas oleovorans*. O segundo grupo acumula PHAs já durante a fase de crescimento, sendo que a este grupo são pertencentes *Escherichia coli* recombinante e *Alcaligenes latus* (Lee, 1996b).

2.2.1 *Ralstonia eutropha*

Ralstonia eutropha tem sido o microrganismo mais utilizado na produção industrial de polímero, por possuir elevados rendimento e velocidade de produção. Pode acumular mais de 80% de sua massa seca celular em polímero com um alto peso molecular, utilizando diferentes tipos de substratos como frutose, glicose e sacarose (espécies mutantes), soro de leite, etc (Byrom, 1987; Ramsay *et al.*, 1990a; Lee e Chang, 1995). Por ser o microrganismo mais estudado, e também utilizado neste trabalho, será dado maior destaque a esta bactéria posteriormente.

2.2.2 Bactérias do Gênero *Azotobacter*

Azotobacter sp. foi a primeira bactéria escolhida para a síntese industrial da 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 grandes quantidades de P(3HB) superiores a 75% de sua massa seca, com um fator de conversão de glicose em polímero de 0,33 g.g⁻¹.

2.2.3 Microrganismos metilotróficos

São microrganismos que consomem metanol como fonte de carbono. O baixo custo deste substrato tornou interessante o estudo com metilotróficos, no início dos estudos de PHAs. Entretanto, o processo de produção é lento, gera baixa quantidade de polímero, ou seja, baixa produtividade, além de apresentar baixo peso molecular. Alguns microrganismos pesquisados são *Methylobacterium extorquens* e *Methylobacterium organophilum*. O conteúdo de PHA tipicamente obtido por metilotróficos é de aproximadamente 50 – 60% do peso seco da célula, o que precisa ser melhorado para que se tenha uma extração mais eficiente do polímero (Byrom, 1987; Lee, 1996b).

2.2.4 Bactérias do Gênero *Alcaligenes*

Alcaligenes latus pode utilizar sacarose como fonte de carbono, tem uma velocidade específica de crescimento elevada e acumula PHA durante a fase de crescimento (Lee, 1996a), embora, sob condições de limitação, possa acumular quantidade bem maior de polímero (Wang e Lee, 1997; Choi e Lee, 1999b). Tem como desvantagem, a sua sensibilidade aos precursores utilizados para produção de copolímero (Ramsay *et al.*, 1990a).

2.2.5 Bactérias do Gênero *Pseudomonas*

As bactérias do gênero *Pseudomonas* podem produzir tanto polihidroxicanoatos com comprimento de cadeia médio (PHA_{MCL}), quanto com comprimento de cadeia longa (PHA_{LCL}) (De Smet *et al.*, 1983; Brandl *et al.*, 1988; Preusting *et al.*, 1991). Esta produção é obtida a partir de substratos de cadeia de carbono alifática longa como os alcanos e os ácidos alcanóicos. Como *Pseudomonas oleovorans* é uma cepa estável, de difícil contaminação, o cultivo contínuo pode ser boa estratégia para a produção de PHA_{MCL} com alta produtividade (Lee, 1996a).

2.2.6 *Escherichia coli* recombinante

Apesar dos produtores naturais de PHAs serem acostumados a produzi-lo durante sua evolução, eles possuem longo tempo de geração, relativamente baixa temperatura ótima de crescimento, resistência a lise, além de conter vias intracelulares de degradação do polímero. Bactérias com a *E. coli* não têm capacidade de sintetizar ou degradar PHAs, entretanto, crescem rapidamente, a uma temperatura um pouco mais alta e sofrem fácil lise. O crescimento rápido diminui o tempo de processo de produção e a facilidade da lise das células economiza no processo de purificação dos grânulos do biopolímero (Madison e Huisman, 1999).

O uso de *E. coli* recombinante, contendo genes de biossíntese de PHAs de *Ralstonia eutropha*, tem sido extensivamente estudado para a produção destes polímeros. O acúmulo de P(3HB) nesse microrganismo pode chegar a 80-90% do peso seco da célula, com alta produtividade. Sua síntese não requer limitação de um nutriente específico, sendo dependente da quantidade de acetil-CoA disponível (Lee e Chang, 1995; Lee, 1996a).

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 melaço, soro de leite e hemicelulose hidrolisada (Lee e Chang, 1993; Zhang *et al.*, 1994; Lee, 1997). Outra vantagem é que *E. coli* não possui despolimerases intracelulares que degradam o polímero acumulado (Choi e Lee, 1999a). Entretanto, uma desvantagem da produção de P(3HB) é a formação de filamentos, durante a síntese do polímero. A filamentação faz com que as células fiquem alongadas, causa redução da velocidade de crescimento celular e menor atividade metabólica causando, conseqüentemente, menor acúmulo de polímero (Lee *et al.*, 1994).

2.2.7 Plantas Transgênicas

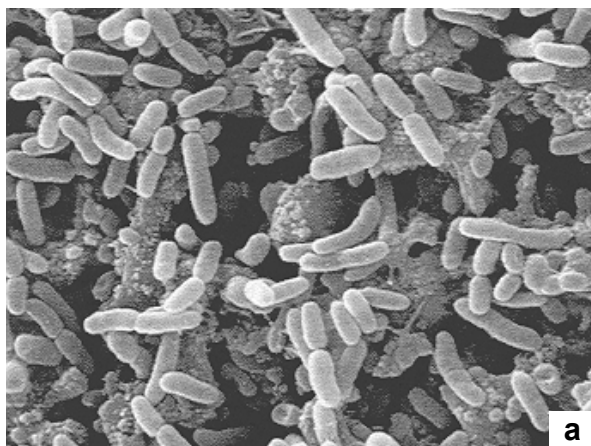
A clonagem e expressão dos genes de biossíntese de PHAs de microrganismos em plantas superiores podem se constituir em uma importante forma de redução dos custos de produção de PHA's, uma vez que eliminaria a necessidade de substratos como carboidratos e ácidos orgânicos, os quais representam importante parcela dos custos de produção do polímero em processos fermentativos. A planta necessitaria apenas do CO₂ atmosférico, da energia solar e de alguns nutrientes obtidos através do solo para fazer a síntese do polímero (Gomez e Bueno Netto, 1997).

O primeiro estudo com plantas transgênicas ocorreu com a expressão dos genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*, no citoplasma de *Arabidopsis thaliana*, resultando em baixo conteúdo de P(3HB) e crescimento retardado da planta (Poirier *et al.*, 1992). Quando os genes foram expressos nos cloroplastos da planta, esta exibiu crescimento normal e acumulou 14% de seu peso seco em P(3HB) (Steinbuchel e Fuchtenbusch, 1998).

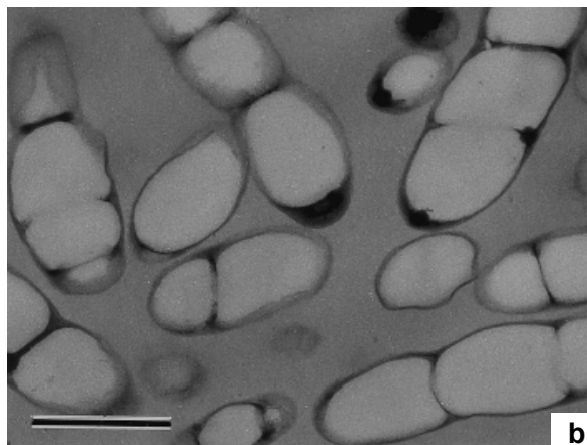
Algumas dificuldades que estão sendo transpostas no estudo com plantas transgênicas são: a síntese do polímero deve ocorrer em grande quantidade em órgão específico da planta, facilitando sua extração-purificação posterior; a síntese de PHA não deve ocorrer em detrimento do desenvolvimento global da planta e ainda há o interesse na obtenção de outros PHAs além do P(3HB) (Gomez e Bueno Netto, 1997).

2.3 DESCRIÇÃO GERAL DA *Ralstonia eutropha*

Ralstonia eutropha, anteriormente *Hydrogenomonas eutropha* e depois *Alcaligenes eutrophus*, e recentemente proposto para *Wautersia eutropha* (Vaneechoutte *et al.*, 2004), é um microrganismo procariótico, gram-negativo, quimiolitotrófico facultativo, encontrado naturalmente no solo e na água. Possui células na forma de bastonete com dimensões de 0,5 por 1,8 a 2,6 μm . É móvel, possuindo de 1 a 4 flagelos peritríquios. Na fase de acúmulo de polímero, as células podem se tornar esféricas (Marangoni, 2000). A figura 2 ilustra a forma desta bactéria na fase de crescimento e fase de produção do polímero.



Fonte: Ampe, 1995.



Fonte: Sudesh *et al.*, 2000.

Figura 2: *R. eutropha* em (a) fase de crescimento e (b) fase de produção.

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 30°C. Pode crescer autotroficamente em atmosfera de gases contendo H₂, O₂ e CO₂ (Tanaka *et al.*, 1995). O pH na cultura de *R. eutropha*, geralmente decresce devido à produção de subprodutos no ciclo de Krebs. Um pH ótimo para o crescimento e produção de P(3HB) é aproximadamente 6,9, sendo que em pH 5,4 há inibição do crescimento celular (Beaulieu *et al.*, 1995).

Este microrganismo tem também como característica importante, do ponto de vista biotecnológico, a produção de PHA's relacionada à fonte de carbono utilizada para seu crescimento. Isto porque a via de degradação dos carboidratos (via Entner-Doudoroff), utilizada em *R. eutropha*, leva à formação de piruvato, o qual é oxidativamente descarboxilado a acetil coenzima A (acetil-CoA). Assim, o monômero predominante encontrado em *R. eutropha* é o poli-3-hidroxi-3-butanato (P(3HB)), uma vez que é sintetizado a partir de acetil-CoA. Quando se utilizam ácidos propiônico ou valérico como co-substratos da glicose e/ou frutose no meio de cultura, há a formação do copolímero poli(3-hidroxi-3-butanato-co-3-hidroxi-3-valerato), P(3HB-co-3HV), cujas unidades (3HV) são formadas a partir de propionil-CoA, produto da degradação dos ácidos utilizados (Anderson e Dawes, 1990).

2.4 BIOSÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE PHAs EM *Ralstonia eutropha*

2.4.1 Metabolismo Durante Crescimento Balanceado

Em condições de crescimento balanceado, *Ralstonia eutropha* cataboliza carboidratos, pela via Entner-Doudoroff, a piruvato, que pode então ser convertido, através de descarboxilação, a acetil-CoA. Durante o crescimento reprodutivo, acetil-CoA entra no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) com a liberação da coenzima A (CoASH), sendo terminalmente oxidado a CO₂ gerando energia, na forma de ATP, equivalentes redutores (NADH, NADPH e FADH₂) e precursores biossintéticos (2-oxoglutarato, oxaloacetato) (Braunegg *et al.*, 1998).

A aminação ou transaminação direta do oxaloacetato leva à síntese de aminoácidos, que são incorporados nas cadeias polipeptídicas das proteínas em formação. A taxa de admissão do acetil-CoA no TCA é dependente da disponibilidade das fontes de nitrogênio, fósforo e outros elementos, além do potencial oxidativo do ambiente (Braunegg *et al.*, 1998).

2.4.2 Biossíntese de P(3HB)

O P(3HB) é sintetizado pela *R. eutropha* a partir de acetil-CoA que segue ora pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos em crescimento não limitado, como visto anteriormente, ora pela via de síntese de P(3HB) em condições de excesso de fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial como o oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre, magnésio ou potássio (Dawes e Senior, 1973; Oeding e Schlegel, 1973; Byrom, 1987; Anderson e Dawes, 1990).

A síntese do P(3HB) por *R. eutropha* ocorre por uma seqüência de três reações catalisadas pelas β -cetotiolase, acetoacetil-CoA redutase e PHA sintase. A enzima β -cetotiolase condensa, reversivelmente, 2 moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA. A enzima acetoacetil-CoA redutase, por sua vez, reduz esse substrato a R-3-hidroxi-butiril-CoA, que é incorporado à cadeia de polímero pela ação da PHA sintase (Oeding e Schlegel, 1973).

2.4.2.1 β -cetotiolase

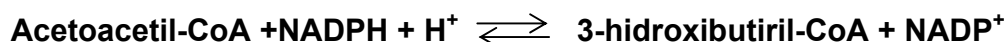
A β -cetotiolase catalisa o primeiro passo na formação dos PHAs. Seu mecanismo de ação envolve duas reações parciais que resultam na condensação de duas moléculas de acetil-CoA, formando acetoacetil-CoA. Dois resíduos de cisteína fazem parte do sítio ativo da enzima e são responsáveis pela ligação da primeira molécula de acetil-CoA à enzima e pela ativação de uma segunda molécula de acetil-CoA, ocorrendo então, a condensação e formação de acetoacetil-CoA (Madison e Huisman, 1999). A enzima catalisa a reação reversível:



A enzima β -cetotiolase, compete por acetil-CoA com várias outras vias metabólicas incluindo formação de acetato, formação de citrato e síntese de ácidos graxos. Essa enzima é inibida por moléculas de CoASH livres (Lee *et al.*, 1995a).

2.4.2.2 Acetoacetil-CoA redutase

Esta enzima catalisa a segunda reação na biossíntese de PHAs, convertendo o acetoacetil-CoA em 3-hidroxiacetil-CoA (Madison e Huisman, 1999):



Dois tipos de acetoacetil-CoA redutases, possuindo diferentes especificidades a substratos e coenzimas, foram encontradas em *R. eutropha*. A enzima NADH dependente é ativa em substratos D(-) e L(+), enquanto a NADPH dependente é estereoespecífica, ativa só com substratos de cadeia C₄ a C₆ de D(-)-3-hidroxiacetil-CoA. Durante a síntese de P(3HB), apenas a enzima NADPH dependente está envolvida, produzindo D(-)-3-hidroxiacetil-CoA, para a enzima PHA sintase (Steinbuechel, 1991).

2.4.2.3 PHA sintase

A PHA sintase é a enzima chave na biossíntese dos PHAs. Ela catalisa a formação de ligações ésteres entre as unidades D(-)3-hidroxiacil-CoAs, produzindo o polímero. A variedade dos monômeros constituintes dos PHAs é devido a grande especificidade de substratos das PHA sintase (Park *et al.*, 2005). Em *R. eutropha*, esta enzima é capaz de polimerizar 3-hidroxi, 4-hidroxi e 5-hidroxiacanoatos a partir de D isômeros de 4 e 5 carbonos de hidroxiacil-CoA, que são substratos naturais para esta enzima (Anderson e Dawes, 1990; Steinbuchel e Lutke-Eversloh, 2003).

Esta enzima é isolada sob duas formas, uma forma solúvel, predominante durante o crescimento não limitado, e outra associada ao grânulo de polímeros quando as condições de cultura favorecem o acúmulo de P(3HB). (Haywood *et al.*, 1989). 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 às que participam da regulação da β -cetotiolase (Braunegg *et al.*, 1998).

2.4.3 Biossíntese de P(3HB-co-3HV)

A biossíntese do copolímero em *R. eutropha* somente ocorre quando houver substratos, chamados precursores de unidades 3HV, que possam ser convertidos em propionil-CoA, 3-cetovaleril-CoA ou 3-hidroxi valeril-CoA, como o ácido propiônico, valérico ou pentanóico. As reações de síntese de P(3HB-co-3HV) são catalisadas pelas mesmas enzimas da síntese de P(3HB). β -cetotiolases e acetoacetil-CoA redutases não específicas, permitem a síntese de 3-hidroxi valeril-CoA, que é o substrato para muitas PHA sintases (Steinbuchel e Fuchtenbusch, 1998).

O copolímero apresenta uma distribuição aleatória de unidades de 3HB e 3HV. A via de síntese de P(3HB-co-3HV), mostra 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 (Doi *et al.*, 1987).

2.4.4 Degradação Intracelular de P(3HB)

A degradação intracelular de P(3HB) é efetuada através de uma seqüência de reações envolvendo, nesta ordem, as enzimas PHA despolimerase, 3-hidroxi-butirato desidrogenase e acetoacetil-CoA sintetase para formar ácido 3-hidroxi-butírico e acetil-CoA. O acetoacetil-CoA é um intermediário comum para as vias de síntese e degradação de P(3HB) (Doi, 1990). Em *R. eutropha*, o único produto da hidrólise de P(3HB) é o ácido 3-hidroxi-butírico, mas uma mistura de dímeros e monômeros do ácido pode ser obtida em outros organismos (Braunegg *et al.*, 1998).

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 sua síntese. A degradação do polímero é controlada pela inibição da 3-hidroxi-butirato desidrogenase pelo acetoacetato e o NADPH (Byrom, 1987).

2.5 PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS

A produção de PHAs por *Ralstonia eutropha*, ocorre em duas fases: uma primeira fase de crescimento celular em um meio balanceado, e uma segunda fase onde se tem a limitação de um nutriente essencial (N, P, O, S) com excesso de carbono. Na primeira fase, há acúmulo de biomassa, na segunda produção do polímero (Anderson e Dawes, 1990; Doi, 1990; Lee e Chang, 1995; Lee, 1996a; Braunegg *et al.*, 1998; Steinbuchel e Fuchtenbusch, 1998; Sudesh *et al.*, 2000).

Estudos são concentrados em reduzir o preço dos PHAs através do desenvolvimento de novas cepas, condições de cultura mais eficientes, utilização de substratos de baixo custo e processos de recuperação do polímero mais econômicos (Choi e Lee, 1999b; Marangoni *et al.*, 2001).

A produção de PHAs 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 do biopolímero. O método mais empregado para a obtenção de altas densidades celulares, as quais são freqüentemente necessárias para alta produtividade de polímero, tem sido culturas em batelada alimentada (*fed-batch*). Sistemas de cultura contínua podem oferecer alta produtividade tanto quanto batelada alimentada, mas somente quando a cultura pode ser mantida estável e sem contaminação (Koyama e Doi, 1995). Porém, a cultura contínua supera a cultura descontínua com alimentação como uma ferramenta de pesquisa para determinação do efeito da velocidade de crescimento e níveis de nutriente na produção de um composto (Gostomiski e Bungay, 1996). Biorreatores com membranas também têm sido empregados para obter altas densidades celulares, mas necessitam de melhorias para serem empregados industrialmente (Lee e Chang, 1995).

2.5.1 Culturas em Regime de Batelada Alimentada

Basicamente, o processo descontínuo alimentado é definido como uma técnica em processos microbianos, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao biorreator durante o cultivo e em que os produtos aí permanecem até o final do processo fermentativo (Carvalho e Sato, 2001).

A partir de estudos cinéticos para o crescimento de *Ralstonia eutropha* e acúmulo de PHAs, foi encontrado que a concentração de carbono deve ser mantida em um valor ótimo para a produção eficiente de polímero. Entretanto, o desenvolvimento de um método para monitorar e controlar precisamente a concentração da fonte de carbono é essencial. Os dois métodos mais empregados para monitorar a concentração de substrato são a estimativa por taxa de dióxido de carbono e um sistema *on-line*. Culturas em *fed-batch* de *R. eutropha* para a produção de P(3HB-co-3HV) são também conduzidas utilizando estratégias de alimentação similares (Lee e Chang, 1995).

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 bactéria *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 110-120 horas e o conteúdo de polímero acumulado é superior a 75% da biomassa total seca.

2.5.2 Influência de Alimentação ou Carência do Elemento Limitante na Produção dos PHAs

A síntese de PHAs pode ser resultado de limitações provocadas pela ausência ou deficiência de oxigênio, nitrogênio, fosfato, sulfato, magnésio ou potássio no crescimento. Magnésio é essencial para o crescimento da célula e tem três funções: manter a integridade dos ribossomos, participar do mecanismo de permeabilidade das membranas da célula e como um co-fator em muitas reações enzimáticas. O fósforo é um componente vital para muitas estruturas celulares como ácidos nucleicos, fosfolípidos e proteínas (Marangoni, 2000). Nitrogênio é desejável para a manutenção da atividade anabólica de acúmulo do polímero (Suzuki *et al.*, 1986).

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), pesquisaram sobre a limitação da fonte de nitrogênio, concluindo que a completa deficiência leva à perda considerável da atividade microbiana. Entretanto, a alimentação excessiva de nitrogênio causa degradação do polímero acumulado e 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 com cultura em batelada alimentada de *R. eutropha*, sob limitação em fósforo em um biorreator de 60L, conseguiram os melhores resultados relatados até agora para a produção de P(3HB). A partir de uma concentração inicial de fosfato de $5,5 \text{ g.h}^{-1}$, a cultura resultou em uma concentração final de massa celular seca de 281 g.L^{-1} , concentração de P(3HB) de 232 g.L^{-1} e uma produtividade de $3,14 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. 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) (Aragão, 1996).

Squiro *et al.*, 2003) estudaram estratégias de alimentação de fosfato durante a fase de produção de polímero. Quando uma baixa taxa de crescimento celular foi mantida (r_x de $0,02 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) a produção de polímero aumentou, resultando em uma massa celular final, massa de P(3HB-co-3HV), e conteúdo de P(3HB-co-3HV) de 98,2 g, 62,0 g e 63,1%, respectivamente. A máxima produtividade de polímero obtida durante a fase de produção foi $1,36 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

2.5.3 Influência da Utilização de Suplementos

Estratégias para a 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 PHAs. Estes agentes podem interferir na via metabólica proporcionando maior produção de células e resultando em maior produtividade, mas também podem agir diretamente na síntese dos biopolímeros.

Lee e Choi, 1999) citaram a utilização de ácido oléico e a adição de ácido acético na produção de copolímero 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 oléico, e em ambos os casos os resultados obtidos foram melhores do que os obtidos sem suplementação.

Utilizando culturas de *R. eutropha* em açúcar invertido e ácido propiônico, Marangoni *et al.*, 2000) estudaram a influência do ácido oléico como suplemento nutricional na produção de P(3HB-co-3HV). Os autores concluíram que o uso do ácido oléico como um suplemento para as culturas, aumentou a máxima produtividade de polímero de $0,14 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para $0,28 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Culturas com ácido oléico, também aumentaram o conteúdo de polímero acumulado de 18,3% das culturas sem suplementação para 28,3% com suplementação. Concluíram ainda que o ácido oléico atua como indutor para a produção de polímero e 3HB, sem alterar o fator de conversão de ácido propiônico em 3HV.

O uso de suplementos nutricionais para a produção de P(3HB-co-3HV) também foi estudado por Squio, 2003). Foram testadas a utilização dos ácidos graxos oléico, linoleico, e uma mistura de ácidos linoleico/oléico (2:1 v/v), adicionados no início da fase de produção, em culturas de *Ralstonia eutropha*, tendo glicose/frutose como fonte de carbono. O uso dos ácidos graxos oléico e linoleico, como suplementos nutricionais nas culturas, aumentou a produção de P(3HB-co-3HV) em cerca de 11%. A adição da mistura de ácidos linoleico/oléico mostrou-se um bom suplemento, tanto quanto o ácido oléico, obtendo-se resultados bastante próximos para as duas culturas.

Squio, 2003), estudou também a utilização de óleos vegetais como suplementos. Os ácidos oléico e linoleico fazem parte da composição de muitos óleos vegetais que são substratos de mais baixo custo que os ácidos graxos puros. As conclusões obtidas foram que o uso de óleos vegetais como suplementos nutricionais na produção de PHA's por *R. eutropha* leva a um aumento da produção de polímero. As melhores alternativas de substituição do ácido oléico foram os óleos de canola e oliva.

2.5.4 Utilização de Substratos de Baixo Custo

Um dos problemas que impede as aplicações comerciais de PHAs, é o seu alto custo de produção. Do ponto de vista econômico, o custo com substrato (principalmente com fonte de carbono) contribui significativamente para o custo total do processo. Para reduzir estes gastos com substrato, cepas recombinantes utilizando fontes de carbono de baixo custo e correspondentes estratégias de cultivo têm sido desenvolvidos (Lee *et al.*, 1999).

Pelo seu baixo custo, alguns substratos brutos como melaços de cana e beterraba, soro de leite, óleos vegetais, hidrolisados de amido podem ser excelentes substratos para a produção de PHAs, porém, geralmente resultam em conteúdo de polímero e produtividade menores que em substratos de carbono purificados (Lee, 1996b). Na Tabela 2, pode-se observar diversos substratos de baixo custo utilizados para a produção de P(3HB), com os seus respectivos microrganismos e dados das culturas.

Tabela 2: Resumo da produção de P(3HB) a partir de substratos de baixo custo por vários microrganismos

Organismo	Fonte de carbono	Conc. ¹ Celular (g.L ⁻¹)	Conc. de P(3HB) (g.L ⁻¹)	Cont. ² de P(3HB) (%)	Prod. ³ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
<i>Azobacter chroococcum</i>	Amido	54	25	46	0,35
<i>Azobacter chroococcum</i>	Amido	1,17	0,864	73,9	0,0149
<i>Azobacter chroococcum</i> H23	Amido	5,19	3,85	74,2	0,0535
<i>Haloferax mediterranei</i>	Amido	10	6	60	
<i>Ralstonia eutropha</i>	Tapioca hidrolisada	106	61	58	1,03
<i>E. coli recombinante</i>	Soro de leite	31	25	80	0,48
<i>E. coli recombinante</i>	Soro de leite	55	32	57	0,90
<i>Methylobacterium</i> sp. ZP24	Soro de leite	9,9	5,9	59,6	0,123
<i>Burkholderia cepacia</i>	Lactose	3,57	2	56	0,0167
<i>Burkholderia cepacia</i>	Xilose			48,8	
<i>Burkholderia cepacia</i>	Xilose	2,59	1,55	60	0,0259
<i>Pseudomonas pseudoflava</i>	Xilose			22	
<i>Azotobacter vinelandii</i> UWD	Melaço	33	22	66	0,61

¹ Concentração; ² Conteúdo; ³ Produtividade.
Fonte: adaptado de Kim, 2000.

2.5.4.1 Amido Hidrolisado

Kim, 2000) estudou o uso de amido como fonte de carbono para culturas de *Azobacter chroococcum*, conseguindo, em batelada alimentada com limitação em oxigênio, um acúmulo de 46% de P(3HB). O autor concluiu que a utilização do oxigênio como elemento limitante, aumentou a produção e a produtividade de polímero.

O resíduo de batata na forma de amido, é descartado todo dia das plantas processadoras de batata, principalmente resultante das linhas de corte e lavagem. As perdas totais durante as operações de corte e lavagem, estão na faixa de 0,05 a 1% por peso de matéria-prima. Entretanto, em termos de amido, é estimado que 16% do conteúdo de amido da batata é perdido. Em um trabalho utilizando resíduo da indústria processadora de batatas, Rusendi e Sheppard, 1995) realizaram a hidrólise enzimática do amido para a produção de P(3HB) por *Ralstonia eutropha*. Em experimentos realizados em biorreator, os pesquisadores obtiveram 6,5 g.L⁻¹ de biomassa, após 54 h de cultivo, com um conteúdo de polímero acumulado de 76,9% da biomassa total seca.

2.5.4.2 Soro de Leite

O soro de leite é o principal subproduto da indústria de laticínios, representando em torno de 80-90% do volume de leite transformado. A lactose é o principal componente do soro de leite, e muitos microrganismos tem a capacidade de utilizá-la para o seu crescimento (Lee *et al.*, 1999). O soro de leite pode ser utilizado como fornecido, ou concentrado por ultrafiltração. Devido à alta concentração de matéria orgânica presente neste resíduo, seu uso como substrato é economicamente interessante (Anh *et al.*, 2000).

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 g.L⁻¹ de lactose, conseguiu-se uma concentração de biomassa seca de 87 g.L⁻¹ e uma concentração de P(3HB) de 69 g.L⁻¹ em regime de batelada alimentada durante 49 horas. O conteúdo de P(3HB) acumulado foi de 80%, com uma produtividade em polímero de 1,4 g.L⁻¹.h⁻¹.

Marangoni *et al.*, 2002) realizaram o estudo de produção de P(3HB-co-3HV) por *Ralstonia eutropha* utilizando lactose hidrolisada e açúcar invertido como fonte de carbono. A hidrólise da lactose é necessária pois a bactéria *R. eutropha* não possui a capacidade de assimilar dissacarídeos em seu metabolismo. O soro de leite (lactose hidrolisada) foi utilizado como fonte de carbono principal, e pulsos de açúcar invertido foram feitos quando a concentração de açúcar no meio estava abaixo de 12 g.L⁻¹.

Nestes estudos, concluiu-se que é possível aproveitar o soro de leite como fonte de carbono para a produção de polímeros, e dessa forma deixando de ser um resíduo causador de danos ao meio ambiente, tornando-se um subproduto com alto valor agregado.

2.5.4.3 Melaço

Outro subproduto da indústria que vem sendo estudado como fonte alternativa de carbono na produção de PHAs é o melaço. Além de ser mais barato que a glicose, o melaço contém elementos traços e vitaminas tais como a tiamina, riboflavina, piridoxina e niacinamida, que podem ser usados como potencializadores do crescimento microbiológico em alguns microrganismos (Beaulieu *et al.*, 1995).

O melaço de beterraba é um excelente substrato para a produção de PHAs. Contendo em torno de 50-52% de sacarose entre outros nutrientes, seu uso vem sendo investigado por alguns autores. O custo com substrato para a produção de PHAs com melaço de beterraba em culturas em batelada alimentada pode atingir um terço do que usando glicose (Page, 1992; Liu *et al.*, 1998).

Resíduo em grande abundância no Brasil, o melaço de cana também é utilizado para a produção de biopolímeros. Um projeto com iniciativa do Instituto de Pesquisas tecnológicas (IPT), a Universidade de São Paulo (USP), e a empresa Copersucar, mantém desde 1995, em escala piloto, uma planta para a produção de PHAs a partir de açúcares extraídos da cana de açúcar (Nonato *et al.*, 2001).

2.5.4.4 Ácidos Orgânicos

Ácidos orgânicos estão presentes em grande quantidade em efluentes agroindustriais e podem ser uma alternativa como substitutos às fontes de carbono convencionais para a produção de PHAs. Ácidos graxos voláteis (AGVs) podem ser obtidos de sistemas anaeróbicos em que componentes biodegradáveis em resíduos são digeridos sob condições anaeróbicas por bactérias acidogênicas. AGVs como ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico e outros componentes orgânicos solúveis podem ser retirados de efluentes (Ruan *et al.*, 2003).

Diversos microrganismos podem utilizar estes ácidos orgânicos como substrato para a produção de PHAs, entre eles pode-se citar *Ralstonia eutropha*, *Azotobacter chroococcum*, *Rhodobacter sphaeroides*. Resíduos orgânicos de frutas e vegetais, efluentes de indústrias de óleo de palma e azeite de oliva, efluentes amiláceos, são as principais fontes para obtenção dos ácidos orgânicos para a produção dos PHAs (Hassan *et al.*, 1997; Ganzeveld *et al.*, 1999; Yu, 2001; Pozo *et al.*, 2002; Ruan *et al.*, 2003).

2.5.4.5 Dióxido de Carbono (CO₂)

Dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera é um bom substrato para a produção de PHAs. Cianobactérias e algumas bactérias fotossintéticas podem assimilar imediatamente CO₂ da atmosfera usando energia luminosa. Alguns tipos selvagens de cianobactérias são capazes de acumular pequenas quantidades de P(3HB) (aproximadamente 6% em peso) nas células a partir de CO₂ (Tsuge, 2002). Alterações genéticas podem aumentar este conteúdo de polímero acumulado para 27 e 55% (Miyake *et al.*, 1996).

Algumas bactérias oxidantes de hidrogênio, chamadas de quimiolitotróficas, isto é, bactérias que podem crescer usando misturas dos gases H_2 , O_2 e CO_2 como substrato, também podem acumular P(3HB) no interior das células. A composição desta mistura de gases que atende às necessidades de crescimento das bactérias, usualmente é composto de 7:1:1 ($H_2:O_2:CO_2$). Entretanto, esta composição de gases está completamente dentro da faixa de explosão dos gases e, portanto, pode causar acidentes facilmente (Ishizaki *et al.*, 2001).

A bactéria *Ralstonia eutropha* pode assimilar dióxido de carbono e produzir P(3HB), na ausência de energia luminosa, com oxidação de hidrogênio. Atualmente, o hidrogênio tem atraído atenção industrial como uma fonte limpa de energia e uma alternativa ao petróleo. Se um processo para prover uma grande quantidade de hidrogênio a baixos preços é desenvolvido, a produção de PHAs a partir de CO_2 por *R. eutropha* pode ganhar espaço, devido às altas produtividades e conteúdo de polímero acumulado por esta bactéria (Tanaka *et al.*, 1995; Tsuge, 2002).

2.6 BIODEGRADABILIDADE

Biodegradabilidade é a capacidade de decomposição de materiais, especialmente em produtos inócuos, pela ação de seres vivos como os microrganismos. Bactérias e fungos são os principais participantes do processo de biodegradação na natureza. A decomposição dos materiais fornece aos microrganismos os precursores para os componentes celulares e energia. Dessa forma, a biodegradabilidade é nada mais que um processo catabólico (Braunegg *et al.*, 1998).

A característica mais atrativa dos PHAs é a sua biodegradabilidade. Um grande número de microrganismos aeróbios e anaeróbios, com capacidade de degradar PHAs, tem sido isolados de diversos ambientes, como solo, lodo ativado, água do mar, água de lagos e lodo anaeróbio. Estes microrganismos excretam extracelularmente PHA-despolimerases para degradar o polímero em monômeros e oligômeros solúveis na água e usá-los como fonte de carbono (Lee, 1996a).

A microscopia eletrônica de amostras, parcialmente degradadas, mostrou que a hidrólise inicia-se na superfície do polímero, causando lesões físicas (erosões) e prosseguindo então para a parte interior (Molitoris *et al.*, 1996). A degradação enzimática do polímero é uma reação heterogênea envolvendo duas etapas, adsorção e hidrólise. A primeira etapa consiste na adsorção da enzima à superfície do polímero e a segunda na hidrólise das cadeias poliméricas pelo sítio ativo das enzimas. A velocidade de biodegradação de PHA's depende de muitos fatores, alguns relacionados ao ambiente, como temperatura, umidade, pH e suprimento de nutrientes e outros relacionados ao próprio PHA, como composição, cristalinidade, aditivos e área superficial (Sudesh *et al.*, 2000).

P(3HB) e outros PHAs podem ser completamente degradados a dióxido de carbono e água em condições aeróbias e também a metano em condições anaeróbias (Grothe *et al.*, 1999). A degradação enzimática de P(3HB) é afetada por sua estereocomposição e tacticidade. Os polímeros com conformação (R) sofrem degradação, enquanto que aqueles com unidades repetidas da conformação (S) não são degradáveis (Grodzinski, 1999). O tempo de degradação do produto formado por P(3HB) é na ordem de poucos meses (digestão anaeróbia) e anos (água do mar) (Madison e Huisman, 1999).

2.7 APLICAÇÕES DOS PHAs

Os PHA's são considerados de grande interesse industrial, como plásticos biodegradáveis e/ou biocompatíveis, para diversas áreas de aplicação (Lee, 1996a). O plástico biodegradável deve complementar o plástico petroquímico, conquistando espaços específicos onde suas características de pureza e biodegradabilidade sejam necessárias.

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 (Steinbuchel e Fuchtenbusch, 1998).

Os PHA's também têm aplicação na área médica, como materiais osteossintéticos e suturas cirúrgicas. Estes biopolímeros podem ser aplicados como matriz de materiais para liberação lenta de drogas, hormônios, inseticidas e fragrâncias para as indústrias farmacêutica e de alimentos (Steinbuchel e Fuchtenbusch, 1998). De acordo com Sudesh *et al.*, 2000), na área médica, os PHA's contendo monômeros 4-hidroxibutirato (4HB), são os mais promissores como polímeros com valor terapêutico potencial. Na tabela 3, pode-se observar algumas possíveis aplicações dos PHAs.

Tabela 3: Possíveis aplicações dos PHAs

-
- Embalagens como filmes, bolsas e recipientes;
 - Condutor biodegradável para dosagem de drogas, remédios, inseticidas, herbicidas ou fertilizantes;
 - Utensílios descartáveis como, aparelhos de barbear, fraldas, ou produtos de higiene feminina;
 - Pinos e suturas cirúrgicas;
 - Curativos;
 - Placas e reposições de ossos;
 - Reposição de vasos sanguíneos.
-

Fonte: Adaptado de Lee, 1996a.

2.8 FATORES QUE INFLUENCIAM O CUSTO DE PRODUÇÃO DOS PHAs

Como foi observado ao longo desta revisão, os PHAs são substitutos ideais dos plásticos de origem petroquímica por terem propriedades similares a vários termoplásticos e elastômeros, além de serem completamente biodegradáveis. Porém, o seu uso em uma faixa maior de aplicações é limitado principalmente pelo alto custo de produção destes biopolímeros, quando comparado aos plásticos convencionais derivados do petróleo (Byrom, 1987).

Com o objetivo de comercializar os PHAs, muitas alternativas tem sido estudadas para reduzir os custos de produção através do desenvolvimento de melhores linhagens de microrganismos, e processos mais eficientes de produção e recuperação dos polímeros (Lee, 1996b; Lee, 1996a). Entretanto, a otimização de cada etapa separadamente irá desperdiçar muitos esforços e resultará em uma sub-otimização do processo em geral. Minimização dos custos de produção dos PHAs pode ser alcançada considerando o planejamento e uma análise completa de todo o processo (Choi e Lee, 1999b). Os principais fatores que afetam os custos de produção dos polihidroxialcanoatos, como produtividade, conteúdo de polímero acumulado, fonte de carbono e seu rendimento em polímero, e processos de extração/recuperação serão discutidos a seguir.

2.8.1 Produtividade de PHAs

A produtividade é definida como a quantidade de PHA produzida por unidade de volume em uma unidade de tempo. Para a produção de uma mesma quantidade de PHA por ano, um processo com menor produtividade requer equipamentos maiores. Então, os custos relacionados a equipamentos aumentam com o decréscimo da produtividade (Choi e Lee, 1999b).

Quando comparados dois processos de produção de P(3HB) por *E. coli* recombinante com duas produtividades diferentes percebe-se claramente o efeito da produtividade nos custos de produção dos PHAs. Segundo Choi e Lee, 1999b), quando a produtividade aumenta de $1,98 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para $3,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, os custos de produção decrescem de US\$ 5,37 para US\$ 4,91 kg^{-1} P(3HB). Um baixo custo de produção, de US\$ 2,6 kg^{-1} P(3HB), foi obtido devido à alta produtividade do processo com *Alcaligenes latus*. Sendo que o alto conteúdo de P(3HB) acumulado (88,3%) também contribuiu para a redução do preço do polímero (Lee e Choi, 1998).

2.8.2 Conteúdo de PHAs na Célula

O conteúdo de PHA's acumulado afeta a eficiência do processo de recuperação e o fator de conversão de carbono em polímero. O rendimento e pureza do processo de recuperação são fortemente dependentes do conteúdo de PHA's. Menor quantidade de produto de digestão pode ser utilizada para separar os grânulos de PHA's de células com maior conteúdo de polímero. Por outro lado, baixo conteúdo de PHA's leva à grande quantidade de substrato desperdiçado em outros materiais celulares e/ou metabólitos (Choi e Lee, 1999b).

Duas culturas em batelada alimentada de *Alcaligenes latus*, com diferentes conteúdos de polímero acumulados mostram a influência deste item no custo de produção dos PHAs. Uma primeira cultura com um conteúdo de polímero acumulado de 50% e rendimento de $0,17 \text{ g}_{\text{P(3HB)}}.\text{g}_{\text{sacarose}}^{-1}$, resulta em um custo de recuperação do polímero de US\$ 4,8 kg^{-1} P(3HB), enquanto que em uma cultura com 80% de polímero acumulado com um rendimento de $0,42 \text{ g}_{\text{P(3HB)}}.\text{g}_{\text{sacarose}}^{-1}$ o custo com extração é de US\$ 0,92 kg^{-1} P(3HB). Comparando esses dois processos, observa-se que menores conteúdos de polímero acumulado resultam em um alto custo de recuperação devido, principalmente, ao uso de grandes quantidades de agentes de separação e assim aumentando o custo com tratamento de resíduos (Choi e Lee, 1999b).

2.8.3 Custo com Substrato e Fator de Conversão de Substrato em PHAs

O custo da fonte de carbono contribui significativamente para o custo global da produção de PHAs, podendo atingir até 40% do custo total (Kim, 2000). Como já foi apresentado anteriormente (vide 2.5.4), diversos substratos de baixo custo podem ser utilizados na produção dos PHAs, com o objetivo de diminuir os gastos com matéria-prima e assim contribuindo na redução do custo total. Na Tabela 4, está apresentado o efeito do substrato e do fator de conversão em P(3HB) no custo total de produção deste polímero.

Tabela 4: Efeito do custo com substrato e rendimento em polímero no custo de produção de P(3HB)

Substrato	Preço Aproximado (US\$ kg ⁻¹)	$Y_{P(3HB)/S}$ [†] (g P(3HB)·g substrato ⁻¹)	Custo do substrato (US\$ kg ⁻¹ P(3HB))
Glicose	0,493	0,38	1,30
Sacarose	0,290	0,40	0,72
Metanol	0,180	0,43	0,42
Acetato	0,595	0,38	1,56
Etanol	0,502	0,50	1,00
Melaço de cana	0,220	0,42	0,52
Soro de leite	0,071	0,33	0,22
Hemicelulose hidrolisada	0,069	0,20	0,34

[†] Fator de conversão de substrato em P(3HB)

Fonte: Lee, 1996b.

Pelo seu baixo custo, alguns substratos brutos como melaços de cana e beterraba, soro de leite, óleos vegetais, hidrolisados de amido, celulose e hemicelulose, podem ser excelentes substratos para a produção de PHA's para bactérias. Diversas bactérias podem produzir PHAs a partir destas fontes de carbono mas, em geral, o conteúdo de polímero acumulado e a produtividade são menores do que os obtidos com fontes de carbonos purificados (Choi e Lee, 1999b).

2.8.4 Método de Recuperação

Vários processos de recuperação de PHA's podem ser utilizados. Porém, o desenvolvimento de métodos eficientes, que podem ser diferentes para cada microrganismo empregado, é importante para o custo total da produção de PHA's (Choi e Lee, 1999b).

Extração usando solventes orgânicos como clorofórmio, diclorometano, carbonato de propileno, dicloroetileno, podem resultar em PHAs muito puros (Ramsay *et al.*, 1994). Entretanto, a solução de polímero extraída é muito viscosa e a remoção do material celular é difícil, além destes métodos de extração necessitarem de grandes quantidades de solventes tóxicos e voláteis, que não aumentam o custo total de produção, mas têm conseqüências ambientais adversas (Choi e Lee, 1997).

Digestão usando hipoclorito tem sido proposto como alternativa. Entretanto, durante a digestão dos materiais celulares não poliméricos (NPCM), degradação do PHA é observada. Pré-tratamento com surfactante e digestão com hipoclorito sob condições otimizadas resulta em um PHA muito puro com menos degradação (Ramsay *et al.*, 1990b). Um método de digestão enzimática desenvolvido pela empresa Zeneca tem sido usado na produção do Biopol, P(3HB-co-3HV), mas o uso de reagentes caros e processos complexos não parece ser econômico (Choi e Lee, 1999b). Recuperação de PHAs utilizando uma dispersão de clorofórmio e uma solução de hipoclorito de sódio tem a vantagem de menor degradação do polímero, mas este processo de dispersão também requer grandes quantidades de solvente (Hahn *et al.*, 1994).

Como os grânulos de PHAs não contêm muitos contaminantes, polímeros altamente puros, podem ser produzidos por processos que quebram as células e solubilizam o NPCM. Portanto, os métodos de digestão simples através de produtos químicos de baixo custo, parecem ser os processos de recuperação mais eficientes e econômicos. Estes métodos são especialmente eficientes para recuperação de PHAs de células com alto conteúdo acumulado, e são aplicados na obtenção de PHAs altamente puros de diversas bactérias (Choi e Lee, 1999b).

Um método de digestão alcalina para recuperação de P(3HB) de células de *E. coli* recombinante foi desenvolvido. Quando células de *E. coli* com um conteúdo de P(3HB) de 77% foram tratadas com uma solução 0,2M de NaOH por uma hora, P(3HB) foi recuperado com 98,5% de pureza. Empregando este método, o custo de produção de P(3HB) foi 25% menor do obtido quando o método de digestão com surfactante-hipoclorito foi usado (Choi e Lee, 1999a). Estes resultados enfatizam a importância do desenvolvimento de um método econômico e eficiente para a recuperação dos polihidroxialcanoatos (Choi e Lee, 1999b).

2.9 MODELAGEM MATEMÁTICA

Apesar de a Engenharia Bioquímica compreender diferentes tipos de processos, englobando transporte de calor e massa e recuperação de produtos, incluindo vários constituintes e fenômenos dominantes, a pesquisa em modelagem matemática reportada na literatura técnica especializada refere-se basicamente às reações biológicas e, recentemente, às reações que ocorrem no interior das células. Dessa forma, a modelagem matemática de processos fermentativos pode ser definida como a tentativa de representar, através de equações matemáticas, os balanços de massa para cada componente no biorreator, associados às complexas transformações bioquímicas que ocorrem no processo e às velocidades com que estas transformações se processam (Bononi e Schmidell, 2001).

A modelagem matemática do crescimento microbiano tem sido utilizada para estimar parâmetros (velocidade específica de crescimento e tempo de fase lag) necessários para o estudo do crescimento sob diferentes condições físicas e químicas, formular meios microbiológicos apropriados ou construir modelos preditivos para uso em microbiologia de alimentos (López *et al.*, 2004).

Estes modelos podem ser aplicados em vários níveis. Um modelo de nível primário é uma equação ou função que é usada para descrever a resposta microbiana contra o tempo com um conjunto característico de parâmetros (Whiting, 1995; Mcmeekin e Ross, 2002). A resposta microbiana geralmente é expressa em termos do número de microrganismos (concentração de unidades formadoras de colônia), massa celular seca (concentração de biomassa) ou densidade ótica como uma medida indireta (Dalgaard e Koutsoumanis, 2001). Alguns dos modelos primários amplamente utilizados na literatura incluem: Modelo de Gompertz, Modelo de Gompertz Modificado e Modelo Logístico (Buchanan *et al.*, 1997; Erkmen e Alben, 2002; Hajmeera e Basheer, 2003; Ferreira, 2004).

Segundo Baranyi e Roberts, 1994), o objetivo dos modelos preditivos é minimizar ou prevenir o crescimento microbiano e não otimizá-lo, como em bioprocessos. Geralmente a informação das características do meio é menor e menos exata que num biorreator, e os modelos são matematicamente mais simples e com maior conteúdo empírico. Embora os autores considerem que estes modelos não apresentem aplicação prática para Engenharia Bioquímica, o conhecimento ou “previsão” do crescimento microbiano pode ser fundamental para o estabelecimento de estratégias de cultura, em especial para a produção de PHAs, que ocorre durante a fase de crescimento limitado. Além disso, pesquisas vem sendo realizadas com a utilização de modelos primários para a determinação de parâmetros cinéticos de culturas em batelada (Tobajas e Garcia-Calvo, 2000; Erkmen e Alben, 2002; Wachenheim *et al.*, 2003).

CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados as metodologias e equipamentos utilizados neste estudo. Constatam as descrições do microrganismo, meios e condições de cultura, métodos analíticos de determinação de biomassa, proteína, substrato e polímero, além da metodologia empregada para análise dos dados.

3.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado foi uma cepa de *Ralstonia eutropha* DSM 545 devido à sua capacidade de utilizar glicose como fonte de carbono (mutante espontâneo).

A cepa foi mantida em um meio ágar nutriente (NA) sob refrigeração a 4°C. A composição deste meio é 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne, 3,0g.L⁻¹ de extrato de carne e 1,5% de ágar bacteriológico.

3.2 MEIOS DE CULTURA

Como primeira pré-cultura foi utilizado um meio nutriente (NB) possuindo a seguinte composição: peptona de carne, 5,0 g.L⁻¹, extrato de carne, 3,0 g.L⁻¹.

O meio mineral (MM) foi utilizado como segunda pré-cultura e como meio final. Este meio foi baseado em Aragão, 1996) e sua composição, sem limitação, utilizada na primeira pré-cultura, está apresentada na Tabela 5.

Para os ensaios realizados em frascos agitados, o meio utilizado nas culturas foi o mesmo apresentado na Tabela 5, porém limitado em nitrogênio, com concentração final da fonte de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄) no meio de 2,3 g.L⁻¹, suficiente para obtenção de 5 g.L⁻¹ de biomassa no momento da limitação, baseado em um fator de conversão de nitrogênio em biomassa (Y_{X/N}) de 7,3 g_{célula}·g_{nitrogênio}⁻¹ (Aragão, 1996).

O pH da solução 1 foi ajustado a 7,0 com NaOH (10%) e HCl (10%). As soluções 1, 2 e 3 foram autoclavadas separadamente durante 15 minutos a 120°C e adicionadas assepticamente para compor o meio final.

Tabela 5: Composição do meio mineral (MM)

		Concentração (g.L ⁻¹)
Solução 1	Ácido nitrilotriacético	0,19
	Citrato ferroso de amônia	0,06
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0
	Solução de oligo-elementos ^a	1,0 (mL.L ⁻¹)
	Água destilada	
Solução 2	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	8,95
	KH ₂ PO ₄	1,5
Solução 3	Fonte de carbono ^b	30,0

^a a composição da solução concentrada de oligo-elementos é dada na Tabela 6

^b a composição da fonte de carbono depende do estudo realizado

Tabela 6: Composição da solução concentrada de oligo-elementos

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

3.3 CONDIÇÕES DE CULTURA

3.3.1 Pré-culturas

Foram realizadas duas pré-culturas. A primeira em frasco erlenmeyer aletado de 500 mL contendo 150 mL de meio NB, inoculado com três alçadas da cepa mantida em meio ágar. Esta pré-cultura foi colocada em incubadora com agitação orbital (*shaker*) a 30°C e 150 rpm por 24 h. Após esse período, iniciou-se a segunda pré-cultura em frasco aletado de 1000 mL contendo 300 mL de meio MM não limitado, que recebeu uma quantidade correspondente a 10% de seu volume final de inóculo proveniente do meio NB. Da mesma forma este meio foi incubado em *shaker* a 30°C e 150 rpm por 24 h. A concentração e a fonte de carbono são dependentes do ensaio realizado.

3.3.2 Culturas em Frascos Agitados

Alguns estudos foram realizados em frascos agitados. Nestes casos, as culturas foram desenvolvidas em frascos erlenmeyer aletados de 1000 mL, contendo 300 mL de meio MM limitado em nitrogênio (quantidade citada no item 3.2), inoculados com a segunda pré-cultura (MM) na quantidade de 10% de seu volume final. Os frascos foram incubados a 30°C sob agitação de 150 rpm durante o tempo necessário para cada experimento. Foi realizado o controle manual de pH durante a cultura com adição de NaOH (10%) e HCl (10%).

3.3.3 Fontes de Carbono

Foram utilizadas diferentes fontes de carbono e preparadas de acordo com o estudo realizado.

3.3.3.1 Glicose e Frutose

Ensaio foram conduzidos utilizando glicose e frutose como fonte de carbono. A utilização deste substrato se deve ao fato de ser considerado como meio padrão. Uma solução de glicose/frutose (1:1 p/p) foi preparada e adicionada ao meio para proporcionar uma concentração final de 30 g.L⁻¹.

3.3.3.2 Meio Sintético Simulando Resíduo Amiláceo

Para este estudo foi preparada uma solução simulando resíduos de indústrias amiláceas (arroz, batata, mandioca). Preparou-se uma solução a partir de arroz branco polido obtido no comércio local. O arroz foi colocado em água destilada com agitação e aquecimento, e obteve-se uma solução concentrada em amido. Como a bactéria *Ralstonia eutropha* não possui a capacidade de assimilar o amido como fonte de carbono, foi necessário hidrolisar este amido para obtenção de glicose. Foi realizada uma hidrólise ácida, com adição de HCl (10%) na proporção de 1:10 (ácido:solução com amido). A solução para hidrólise foi aquecida a 110°C por 2,5 horas. Após, resfriou-se à temperatura ambiente e neutralizou-se a solução com adição de NaOH (10%). A concentração de glicose foi determinada através do método de determinação de açúcares redutores que será descrito posteriormente. A solução de amido hidrolisado foi adicionada ao meio de cultivo para obter uma concentração final de 30 g.L⁻¹.

3.3.3.3 Extrato Aquoso do Bagaço de Maçã

O bagaço de maçã foi cedido pela empresa Yakult S.A., com sede em Lages, SC.

O substrato utilizado nos experimentos foi o extrato aquoso obtido a partir do bagaço de maçã. A metodologia para obtenção do extrato líquido foi baseada em Streit, 2004). Para tanto, o bagaço foi seco em estufa com circulação de ar a 50-60°C por 24 horas e triturado. A extração do material solúvel presente no bagaço seco foi feita em frascos erlenmeyers aletados utilizando a relação 1:9 de bagaço seco e triturado para água destilada. Após a extração (60°C por 5 horas, 150rpm), o material foi centrifugado (3500 rpm por 5 min) e o líquido foi filtrado em papel filtro qualitativo. O extrato líquido foi armazenado a -20°C para posterior utilização. Foi determinada a concentração de açúcares redutores na solução e adicionada ao meio final para obter uma concentração de 30 g.L⁻¹.

3.3.4 Estratégias de Alimentação

3.3.4.1 Alimentação em Açúcar

Alimentações foram realizadas sempre que a concentração de açúcares redutores decresceu à aproximadamente 10 g.L⁻¹. Este valor foi monitorado, durante a cultura, através do método de determinação de açúcares redutores (item 3.4.3.1). A alimentação foi realizada a partir de uma solução concentrada (500 g.L⁻¹) da fonte de carbono em estudo de forma a proporcionar uma concentração final de 30 g.L⁻¹ de açúcar no meio.

3.3.4.2 Alimentação com Suplementos Nutricionais

Como suplementos nutricionais, foram utilizados o ácido oléico, e o óleo de soja, que possui aproximadamente 25% de ácido oléico e 50% de ácido linoleico. Estes últimos, são ácidos graxos testados por Squio, 2003) que verificou que sua adição provocava um auxílio no crescimento do microrganismo e aumento no conteúdo de polímero acumulado.

Os suplementos foram adicionados na forma de pulsos no momento da limitação, a fim de se obter o equivalente uma concentração de 0,3 g.L⁻¹ de ácido oléico no meio.

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.4.1 Amostragem

A amostragem, nos ensaios em frascos agitados, foi realizada em menores proporções, devido ao menor volume de amostra disponível. A retirada de amostra foi feita em intervalos de 2 horas até o momento da limitação e de hora em hora nas primeiras 5 horas seguintes ao ponto de limitação, após isso retornou-se a retirada a cada 2h.

Neste caso, foram retiradas amostras de 2 mL para leitura em espectrofotômetro e pH, e de 10 mL, sendo 6 mL para determinação de substrato e polímero e 4 mL para determinação da concentração celular por gravimetria. A amostra foi centrifugada em tubos *ependorf* de 2 mL cada, sendo que o sobrenadante foi guardado para posteriores análises de substrato, nitrogênio e fosfato, o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e, após a última centrifugação, foi congelado para posterior análise de polímero.

3.4.2 Determinação da Concentração de Biomassa

A concentração celular foi determinada por dois métodos: espectrofotometria e gravimetria.

3.4.2.1 Medida por Espectrofotometria

A concentração de biomassa das amostras coletadas foi avaliada em um espectrofotômetro (modelo GENESYS 10 Vis, marca Spectronic Unicam, USA) medindo-se a absorbância a 600 nm. Para manter uma precisão adequada (região linear), a faixa de absorbância utilizada foi entre 0,0 e 0,8. A partir deste valor, foram feitas diluições para manter a linearidade.

3.4.2.2 Medida por Análise Gravimétrica

A concentração celular por gravimetria foi obtida a partir de um volume conhecido de cultura. O meio de cultura foi centrifugado, em tubos *ependorf*, previamente secos e pesados, a 14.000 rpm, e o precipitado foi ressuspendido com água destilada e centrifugado por duas vezes para lavagem, seguido de secagem em estufa a 90°C por 24 h.

3.4.3 Dosagem de Substratos

3.4.3.1 Dosagem de Açúcares

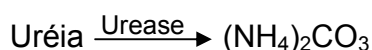
A dosagem de açúcares foi determinada pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) Miller, 1959), que determina a concentração de açúcares redutores. O reativo foi preparado da seguinte forma:

- 300 g de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e 16 g de NaOH foram dissolvidos em água destilada;
- 10 g de ácido dinitrosalicílico foram adicionados muito lentamente;
- O volume foi completado para 1 L com água destilada.

Um volume de 400 μL de sobrenadante, previamente diluído, foi adicionado a 400 μL de reativo DNS e depois colocado a 100°C durante 5 minutos, em banho-maria. Após esse período, fez-se o resfriamento em banho de gelo e adicionou-se 4 mL de água destilada. Após 15 minutos em repouso para estabilização da temperatura, foi realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm contra um branco de água destilada que passou pela mesma reação. A curva padrão expressa a concentração de glicose (g.L^{-1}) *versus* absorbância em uma escala compreendida entre 0 e 3 g.L^{-1} de glicose. Um exemplo de curva padrão é apresentado nos Anexos - Figura 4.

3.4.3.2 Dosagem de Nitrogênio Residual

O nitrogênio determinado no meio de cultura é o nitrogênio amoniacal (NH_4^+). A dosagem o nitrogênio amoniacal é realizada utilizando-se um kit que determina uréia por um método enzimático colorimétrico (Gold Analisa Diagnostica). A uréia, através da ação enzimática, é decomposta em nitrogênio amoniacal, o qual é determinado por meio colorimétrico. O fundamento do método é o seguinte:



Onde: NP = nitroprussiato

Os reativos usados são os seguintes:

- 1) Tampão: tampão fosfato 20 mmol.L^{-1} , salicilato de sódio 62 mmol.L^{-1} , nitroprussiato de sódio $3,4 \text{ mmol.L}^{-1}$;
- 2) Oxidante: hipoclorito de sódio 7 mmol.L^{-1} e NaOH 150 mmol.L^{-1} ;
- 3) Enzima: solução de urease $> 500 \text{ U.mL}^{-1}$;
- 4) Padrão: solução aquosa de uréia 50 mg.dL^{-1} ;
- 5) Reagente de trabalho: mistura do conteúdo dos frascos do tampão e enzima.

O procedimento adotado para a determinação do nitrogênio amoniacal é apresentado na Tabela 7:

Tabela 7: Procedimento de determinação de nitrogênio amoniacal

	Branco	Padrão	Teste
Padrão	-	10 μL	-
Amostra	-	-	10 μL
Reagente de trabalho	1 mL	1 mL	1 mL
Agitar e incubar por 10 min a 15-30°C. Adicionar:			
Oxidante	1 mL	1 mL	1 mL
Agitar e incubar por 10 min a 15-30°C.			
Ler a absorbância a 600 nm, zerando o aparelho com o branco			

O cálculo para a determinação do nitrogênio amoniacal é feito da seguinte forma:

$$[\text{NH}_4^+] = \frac{\text{absorbância teste}}{\text{absorbância padrão}} \times 0,5 \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$$

3.4.4 Dosagem de P(3HB)

O P(3HB) foi dosado por cromatografia gasosa através da metodologia de metanólise ácida baseado em Braunegg *et al.*, 1978), com as modificações propostas por Brandl *et al.*, 1988).

As amostras, com volume conhecido de meio de cultura, foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e congelado para posterior análise. Para a metanólise ácida, após descongelamento, o precipitado foi ressuspensão em um volume de 2 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol acidificado (H₂SO₄ 15%), contendo ácido benzóico 0,4 g.L⁻¹ como padrão interno, e a mistura foi então aquecida a 100°C durante 4 horas. A mistura foi agitada, de hora em hora, durante alguns segundos e devolvida ao aquecimento. Após resfriamento à temperatura ambiente, adicionou-se 1 mL de água destilada e as amostras foram agitadas durante 30 segundos, seguido de decantação. A fase orgânica (inferior) foi retirada com uma seringa e armazenada sob refrigeração para posterior análise em cromatografia gasosa. Uma curva padrão (Anexos - Figura 5) foi feita utilizando poli-(3-hidroxitbutirato) (Sigma), como padrão externo, com massa variando entre 0,0010 g e 0,0100 g. Os padrões foram submetidos à mesma metanólise que as amostras.

A coluna utilizada para dosagem do P(3HB) foi de sílica fundida (0,53 mm x 30 m) modelo Supercowax-10. O cromatógrafo foi um CG-90 equipado com um detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio). O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a 30 mL.min⁻¹ e as temperaturas de injeção, detecção e coluna foram respectivamente de 190°C, 230°C e 90°C. O volume injetado foi de 1 µL. A integração e os cromatogramas foram obtidos através do software Clarity Lite (DataApex®). Um exemplo de cromatograma pode ser visto nos Anexos - Figura 6.

3.5 MODELAGEM DO CRESCIMENTO MICROBIANO

Os modelos primários utilizados para o ajuste das curvas de crescimento foram: modelo de Gompertz, modelo de Gompertz Modificado e modelo Logístico. Os modelos serão usados para derivar uma expressão para os parâmetros biológicos da formação de biomassa, e serão comparados estatisticamente. Os parâmetros, velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max} [h^{-1}]), duração da fase lag (λ [h]) e o aumento logarítmico da população (A), que são mostrados na Figura 3, foram calculados por três modelos que são descritos a seguir. Os modelos foram obtidos através de regressão não linear por software estatístico.

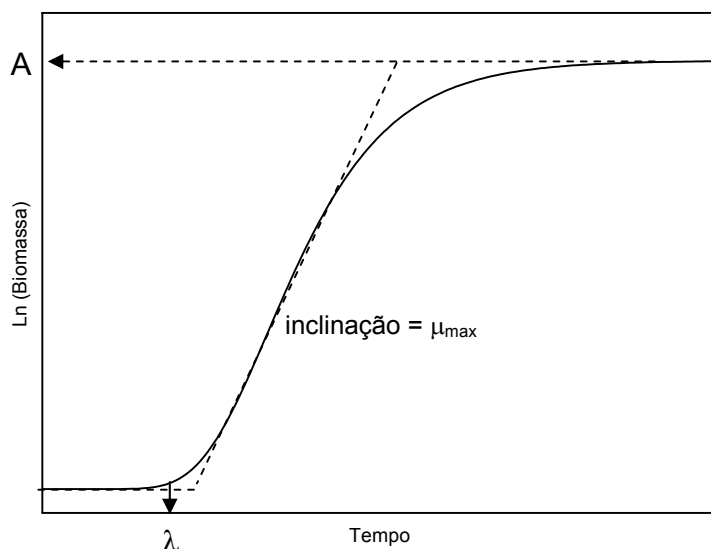


Figura 3: Curva de crescimento microbiano com os parâmetros biológicos em função do tempo.

3.5.1 Modelo de Gompertz

O ajuste aos dados experimentais pelo modelo de Gompertz é feito pela equação abaixo, segundo Erkmen, 2000):

$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = A \cdot \exp\left\{-\exp[-B \cdot (t - M)]\right\}$$

onde, $\ln X/X_0$ é o logaritmo neperiano da densidade celular no tempo t , sendo que X é a absorbância final e X_0 é a absorbância inicial, e a absorbância é proporcional a concentração celular, A é o aumento logaritmo da população, B é a velocidade relativa máxima de crescimento no tempo M [h^{-1}], e M é o tempo necessário para atingir a velocidade máxima de crescimento [h].

Através destes parâmetros, foram calculadas a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{max} = B.A/e$ [h^{-1}], onde $e = 2,7182$) e a duração da fase lag ($\lambda = M - (1/B)$ [h]).

3.5.2 Modelo de Gompertz Modificado

O modelo de Gompertz Modificado é uma modificação do modelo apresentado no item 3.5.1, e é expresso pela equação abaixo (Erkmen, 2001):

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_{max} \cdot e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\}$$

onde, $\ln X/X_0$ é o logaritmo neperiano da absorbância no tempo t , sendo que X é a absorbância final e X_0 é a absorbância inicial, A é o aumento logarítmico da população, μ_{max} é a velocidade específica máxima de crescimento [h^{-1}] e λ é a duração da fase lag [h].

3.5.3 Modelo Logístico

O Modelo Logístico foi aplicado de acordo segundo a equação (Erkmen, 2000):

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \frac{A}{[1 + \exp(D - B.t)]}$$

onde, $\ln(X/X_0)$ e A possuem o mesmo significado que os do Modelo de Gompertz, D é um parâmetro adimensional e B é o crescimento relativo na metade do tempo da fase exponencial [h^{-1}]. Destes parâmetros foram obtidos: a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max} = A.B/4$ [h^{-1}]), a duração da fase lag ($\lambda = (D-2)/B$ [h]).

Estes modelos foram numericamente ajustados às curvas de crescimento de *R. eutropha* nas diferentes fontes de carbono testadas.

3.5.4 Análises Estatísticas

Os seguintes índices foram utilizados para comparação dos modelos: erro médio quadrático (MSE), coeficiente de correlação (r), fator bias e fator de exatidão (Ferreira, 2004).

Quanto menor o valor de MSE, melhor é o ajuste do modelo aos dados experimentais. A equação usada para o cálculo do MSE foi:

$$MSE = \frac{RSS}{n} = \frac{\sum (\text{Valor}_{\text{observado}} - \text{Valor}_{\text{predito}})^2}{n}$$

onde, RSS é a soma dos quadrados residuais e n é o número de graus de liberdade (número de pontos experimentais – número de parâmetros do modelo).

O fator bias é uma estimativa para a diferença média entre os valores observados e preditos. Pode ser calculado através da equação:

$$\text{fator bias} = 10^{\left(\frac{\sum \log(\text{Valor}_{\text{observado}} / \text{Valor}_{\text{predito}})}{n} \right)}$$

O fator bias procura dar o mesmo peso na média dos valores que sobreestimam e subestimam a média, ou seja, é um desvio relativo médio. Se bias igual 1, a resposta observada é igual à resposta predita. No entanto, quando bias maior 1, significa que o modelo falha na zona de perigo e o predito é maior que o observado. Quando bias menor 1, significa que o modelo falha na zona segura, ou seja, o predito é menor que o observado.

O fator de exatidão é uma medida para a diferença média absoluta entre os valores preditos e observados, e foi calculado através da equação:

$$\text{fator de exatidão} = 10 \left(\sum \frac{|\log(\text{Valor}_{\text{observado}} / \text{Valor}_{\text{predito}})|}{n} \right)$$

Conforme aumenta o valor deste fator, o modelo é menos exato na média, ou seja, no cálculo do fator bias como se calcula uma média dos valores, os com sinais opostos, tendem a se cancelar; já no cálculo do fator de exatidão, por se tratar de valores absolutos será sempre maior que 1. Quanto maior seu valor, menor a exatidão da estimativa da média.

3.6 TRATAMENTO DOS DADOS

3.6.1 Ajustes dos Dados Experimentais

Os dados experimentais obtidos foram ajustados pelo programa Lissage, desenvolvido no “Institut National des Sciences Appliquees de Toulouse” França, por Ardaillon-Simoës, Arroyo e Uribe Larrea.

3.6.2 Análise Cinética

Como o acúmulo de P(3HB) é intracelular, as velocidades específicas de crescimento celular e de produção de P(3HB) foram 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) [$X_r = X_t - P(3HB)$].

3.6.2.1 Velocidades Específicas de Crescimento

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

$$\ln(Xr) = \ln(Xr_0) + \mu_{max} \cdot t$$

Onde, Xr é a biomassa residual (g.L^{-1}); Xr_0 a biomassa residual inicial (g.L^{-1}); μ_{max} é a velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}); e t o tempo (h).

3.6.3 Fatores de Conversão

3.6.3.1 Fator de Conversão de Substrato em Biomassa Residual

O fator de conversão é obtido a partir do coeficiente angular da porção linear do gráfico da concentração de biomassa residual contra a concentração de substrato, de acordo com a equação:

$$Y_{Xr/S} = -\frac{dXr}{dS}$$

Onde, $Y_{Xr/S}$ é o fator de conversão de substrato em biomassa residual ($\text{g}_{Xr} \cdot \text{g}_S$); Xr é a concentração de biomassa residual (g.L^{-1}); e S é a concentração de substrato (g.L^{-1}).

3.6.3.2 Fator de Conversão de Substrato em P(3HB)

O fator de conversão é obtido a partir do coeficiente angular da porção linear do gráfico da concentração de polímero contra a concentração de substrato, de acordo com a equação:

$$Y_{P(3HB)/S} = -\frac{dP(3HB)}{dS}$$

Onde, $Y_{P(3HB)/S}$ é o fator de conversão de substrato em biomassa residual ($g_{Xr} \cdot g_S$); $P(3HB)$ é a concentração de polímero ($g \cdot L^{-1}$); e S é a concentração de substrato ($g \cdot L^{-1}$).

3.6.4 Produtividade de P(3HB)

3.6.4.1 Produtividade Média de P(3HB)

A produtividade média foi calculada pela diferença entre a quantidade de P(3HB) em um instante de tempo t e a quantidade inicial de P(3HB), dividida pelo intervalo de tempo correspondente, conforme a equação:

$$P_r = \frac{P(3HB)t - P(3HB)t_0}{t - t_0}$$

Onde, P_r é a produtividade média de P(3HB) ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$); $P(3HB)t$ é a concentração de P(3HB) no instante de tempo t ($g \cdot L^{-1}$); e $P(3HB)t_0$ a concentração de P(3HB) no instante de tempo t_0 inicial ($g \cdot L^{-1}$).

3.6.4.2 Produtividade de P(3HB) na Fase de Produção

A produtividade na fase de produção foi calculada pela diferença entre a quantidade de P(3HB) em um instante de tempo t após o início da fase de produção e a quantidade de P(3HB) no início da fase de produção, dividida pelo intervalo de tempo correspondente a estas concentrações, segundo a equação:

$$P_p = \frac{P(3HB)t - P(3HB)t_i}{t - t_i}$$

Onde, P_p é a produtividade na fase de produção de P(3HB) ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$); $P(3HB)t$ é a concentração de P(3HB) no instante de tempo t após o início da fase de produção ($g \cdot L^{-1}$); e $P(3HB)t_i$ a concentração de P(3HB) no instante de tempo t_i inicial da fase de produção ($g \cdot L^{-1}$).

CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo será apresentado na forma de artigos, de acordo com as etapas realizadas no trabalho.

4.1 AVALIAÇÃO E MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE *R. eutropha*

Um dos problemas que impede as aplicações comerciais dos PHAs, é o seu alto custo de produção. Do ponto de vista econômico, o custo com substrato (principalmente com fonte de carbono) contribui significativamente para o custo total do processo. Para reduzir estes gastos com substrato, cepas recombinantes utilizando fontes de carbono de baixo custo e correspondentes estratégias de cultivo têm sido desenvolvidos (Lee *et al.*, 1999). A utilização de resíduos das indústrias de alimentos é uma alternativa viável para a redução dos custos de produção dos PHAs e torná-los mais competitivos no mercado.

O estudo do comportamento do crescimento microbiano através de modelos matemáticos é uma ferramenta que pode auxiliar na previsão do crescimento microbiano e assim sendo fundamental para o estabelecimento de estratégias de cultura, em especial para a produção de PHAs, que ocorre durante a fase de crescimento limitado. Além disso, os modelos primários de crescimento podem ser aplicados para determinar parâmetros cinéticos de culturas em batelada (Erkmen e Alben, 2002).

Desta forma, o objetivo desta etapa foi avaliar o crescimento de *Ralstonia eutropha* em resíduos das indústrias processadoras de maçã, e indústrias amiláceas, e estabelecer um modelo matemático primário que descreva o crescimento da bactéria nestes resíduos. Os resultados estão apresentados no artigo a seguir, intitulado “Avaliação e modelagem matemática do crescimento de *Ralstonia eutropha* em resíduos de indústrias de alimentos para produção de polihidroxialcanoatos”.

Avaliação e modelagem matemática do crescimento de *Ralstonia eutropha* em resíduos de indústrias de alimentos para produção de polihidroxicanoatos

Rafael C. Rodrigues, Gláucia M. F. Aragão*

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina - Cx. Postal 476 - CEP: 88040-900, Florianópolis - SC, Brasil
E-mail: rafael@enq.ufsc.br; glaucia@enq.ufsc.br

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento de *Ralstonia eutropha* em resíduos de indústrias de alimentos e estudar um modelo matemático que descreva o crescimento da bactéria nestes meios. Os resíduos das indústrias processadoras de maçã e amiláceas foram utilizados como fonte de carbono. Três modelos primários de crescimento – Gompertz, Gompertz Modificado e Logístico – foram ajustados às curvas de crescimento para a obtenção dos parâmetros: A , aumento logarítmico da população; μ_{max} , velocidade específica de crescimento na fase exponencial (h^{-1}); e λ , duração da fase lag (h). Os valores do erro médio quadrático (MSE), coeficiente de correlação (r), fator bias e fator de exatidão foram utilizados para calcular e comparar a performance dos três modelos primários de crescimento. Os resultados demonstraram que a bactéria possui capacidade de utilização destes resíduos como fonte de carbono, apresentando velocidades específicas máximas de crescimento de $0,24 h^{-1}$ para o bagaço de maçã e $0,23 h^{-1}$ para o resíduo amiláceo, valores próximos ao obtido em meio padrão (glicose/frutose – $0,27 h^{-1}$). Os três modelos não apresentaram diferenças significativas entre si na descrição do crescimento. Entretanto o Modelo Logístico foi o que obteve melhores resultados nos índices estatísticos calculados.

Palavras-chave: Modelagem matemática; Crescimento microbiano; resíduos de indústria de alimentos; polihidroxicanoatos

Evaluation and mathematical modeling of *Ralstonia eutropha* growth in food industries wastes aiming to polyhydroxyalkanoates production

Abstract

This work had as objective to evaluate the growth of *Ralstonia eutropha* in residues of food industries and to study a mathematical model that describes the bacterial growth. The residues from apple processing and starchy industries were used as carbon source. Three primary growth models - Gompertz, Modified Gompertz and Logistic - were adjusted to the growth curves to obtaining the following parameters: A , logarithmic increase of population; μ_{max} , specific growth rate (h^{-1}); and λ , the lag phase duration (h). The values of the medium square error (MSE), correlation coefficient (r), and, bias and accuracy factor were used to calculate and to compare the performance of the three primary growth models. The results demonstrated that the bacteria possess capacity of use these residues as carbon source, presenting specific growth rates of $0,24 h^{-1}$ to apple pomace and $0,23 h^{-1}$ to starchy waste, values close to when used standard medium (glucose/fructose – $0,27h^{-1}$). The three models did not present significant differences to each other in describing the growth, however the Logistic Model was that obtained better results in the calculated statistical indexes.

Keywords: Mathematical modeling; microbial growth; food industry wastes; polyhydroxyalkanoates

1. Introdução

Nos recentes anos, tem crescido o consenso público sobre os efeitos prejudiciais ao ambiente causados por plásticos derivados de petroquímicos. O impacto ambiental causado pelo descarte de produtos plásticos e o progresso da medicina

motivam o desenvolvimento de materiais biodegradáveis e biocompatíveis (Marangoni *et al.*, 2000; Reddy *et al.*, 2003). Entre os biopolímeros em desenvolvimento, os polihidroxicanoatos (PHAs) são os mais estudados. PHAs são polímeros de hidroxicanoatos, que são acumulados como material de reserva de carbono e energia em vários

microrganismos, usualmente sob condições de limitação de elementos nutricionais como N, P, S ou O e na presença de excesso de fonte de carbono (Lee *et al.*, 1999). Polihidroxibutirato (P(3HB)) é o mais estudado e caracterizado PHA encontrado em bactérias (Poirier, 2002). Mais de 300 microrganismos diferentes são conhecidos por sintetizar e acumular intracelularmente PHAs, e *Ralstonia eutropha* é a bactéria mais empregada para a produção de polímeros biodegradáveis devido à facilidade de cultivo usando fontes de carbono renováveis, e também pelo fato desta bactéria acumular mais de 80% de sua massa seca como polímero (Doi, 1990; Du *et al.*, 2001a; Squio *et al.*, 2003).

Como as propriedades físicas dos PHAs são similares às de alguns plásticos convencionais, como o polipropileno, a produção industrial de PHAs é consideravelmente interessante. Entretanto, estes polímeros biodegradáveis não possuem preços competitivos até o momento (Pozo *et al.*, 2002). O alto custo de produção dos PHAs pode ser diminuído pelo desenvolvimento de melhores cepas, otimização de processos de fermentação e separação e utilização de fontes de carbono de baixo custo. Na produção de PHAs, cerca de 40% do custo total de produção é para matéria-prima (Kim, 2000). Neste sentido, diversos processos de produção de PHAs a partir de fontes de carbono baratas, como resíduos das indústrias de alimentos, têm sido propostos (Choi e Lee, 1999b).

O bagaço de maçã é um resíduo da indústria processadora de suco que apresenta problemas de despejo no meio ambiente. Este bagaço consiste na massa resultante da prensagem de maçãs para suco ou cidra (Berovic e Ostroversnik, 1997). Resíduos como estes, contém grandes quantidades de açúcares redutores (Christen *et al.*, 2000), podendo ser adequados para o crescimento de bactérias. A produção industrial de amido está na ordem de 2×10^{10} ton.ano⁻¹, podendo este ser obtido de grãos como arroz, trigo e milho, e tubérculos como batata e mandioca (Sarıkaya *et al.*, 2000). Rusendi e Sheppard, 1995), produziram poli-β-hidroxibutirato a partir do hidrolisado do resíduo da indústria processadora de batatas, mostrando dessa forma que estes resíduos podem ser utilizados para crescimento e produção de PHAs por bactérias.

A modelagem matemática do crescimento microbiano tem sido utilizada para estimar parâmetros (velocidade específica de crescimento e tempo de fase lag) necessários para o estudo do crescimento sob diferentes condições físicas e químicas, formular meios microbiológicos apropriados ou construir modelos preditivos para

uso em microbiologia de alimentos (López *et al.*, 2004).

Estes modelos podem ser aplicados em vários níveis. Um modelo de nível primário é uma equação ou função que é usada para descrever a resposta microbiana contra o tempo com um conjunto característico de parâmetros (Whiting, 1995; Mcmeekin e Ross, 2002). A resposta microbiana geralmente é expressa em termos do número de microrganismos (concentração de unidades formadoras de colônia), massa celular seca (concentração de biomassa) ou densidade ótica como uma medida indireta (Dalgaard e Koutsoumanis, 2001). Alguns dos modelos primários amplamente utilizados na literatura incluem: Modelo de Gompertz, Modelo de Gompertz Modificado e Modelo Logístico (Buchanan *et al.*, 1997; Erkmen e Alben, 2002; Hajmeera e Basheer, 2003; Ferreira, 2004).

Segundo Baranyi e Roberts, 1994), o objetivo dos modelos preditivos é minimizar ou prevenir o crescimento microbiano e não otimizá-lo, como em bioprocessos. Geralmente a informação das características do meio é menor e menos exata que num biorreator, e os modelos são matematicamente mais simples e com maior conteúdo empírico. Embora os autores considerem que estes modelos não apresentem aplicação prática para Engenharia Bioquímica, o conhecimento ou "previsão" do crescimento microbiano pode ser fundamental para o estabelecimento de estratégias de cultura, em especial para a produção de PHAs, que ocorre durante a fase de crescimento limitado. Além disso, pesquisas vem sendo realizadas com a utilização de modelos primários para a determinação de parâmetros cinéticos de culturas em batelada (Tobajas e Garcia-Calvo, 2000; Erkmen e Alben, 2002; Wachenheim *et al.*, 2003).

O objetivo deste trabalho é estudar fontes de carbono de baixo custo para o crescimento e produção de polihidroxialcanoatos por *Ralstonia eutropha*, e estabelecer um modelo matemático primário que descreva o crescimento da bactéria nestes meios. Dois resíduos de indústrias de alimentos (resíduo amiláceo e resíduo da indústria de maçã) foram usados para os experimentos.

2. Material e Métodos

2.1 Microrganismo e meio de cultura

A cepa utilizada foi *Ralstonia eutropha* DSM 545, por sua grande capacidade de acúmulo de polímero e possibilidade de crescimento em glicose como fonte de carbono (mutante espontâneo).

Inicialmente, as células foram cultivadas em um meio complexo, caldo nutriente (NB), contendo peptona de carne ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$) e extrato de carne (3 g.L^{-1}). O inóculo e o meio de cultivo, utilizado nas culturas, foi um meio mineral (MM), com a sua composição final a mesma usada por Aragão *et al.*, 1996) contendo, por litro de meio: $0,19 \text{ g}$ de ácido nitrilotriacético; $0,06 \text{ g}$ de citrato ferroso de amônia; $0,5 \text{ g}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,01 \text{ g}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $5,0 \text{ g}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; e 1 mL da solução de elementos traços. A solução de elementos traços é composta de, por litro de água destilada: $0,3 \text{ g}$ H_3BO_3 ; $0,2 \text{ g}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $0,1 \text{ g}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,03 \text{ g}$ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $0,03 \text{ g}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $0,02 \text{ g}$ $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $0,01 \text{ g}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Uma cultura suplementada apenas com a fonte de nitrogênio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$), foi testada. Após autoclavado, nos meios de cultura acima citados, uma solução estéril de fosfato foi assepticamente adicionada ao meio de cultura para obter uma concentração final de $8,5 \text{ g.L}^{-1}$ de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 . Os meios de cultura foram preparados sem limitação em nenhum nutriente, verificando-se apenas o crescimento bacteriano e não a produção de polímero.

2.2 Fonte de carbono

Duas fontes de carbono foram utilizadas neste trabalho: resíduo da indústria processadora de maçã (bagaço de maçã) e um meio sintético simulando resíduo da indústria amilácea. O bagaço de maçã foi seco a 60°C e triturado. A este bagaço foi adicionada água destilada (1:9) e colocado em agitador rotatório por 4h a 100 rpm e 60°C , seguido de filtração, obtendo-se um extrato aquoso rico em açúcares redutores. Para tornar possível a utilização do resíduo amiláceo pelo microrganismo, realizou-se um processo de hidrólise para a quebra do amido em glicose. A hidrólise ácida foi feita adicionando-se (1:10) de ácido clorídrico (10%) para extrato de amido e aquecendo a 110°C por 2,5h. Em seguida o meio foi resfriado e neutralizado com uma solução de hidróxido de sódio (10%). Foi determinada a concentração de açúcares redutores nas soluções das fontes de carbono e então adicionadas ao meio de cultivo de forma a obter-se uma concentração inicial de 30 g.L^{-1} de açúcares redutores. Para comparação dos resultados, ensaios com meio padrão (glicose/frutose – 1:1 p/p) foram realizados.

2.3 Condições de cultivo

Os experimentos foram conduzidos em frascos aletados de 1000 mL, contendo 300 mL do meio de cultura e incubados a 150 rpm em agitador rotatório

(shaker). A temperatura foi de 30°C para todos os experimentos. O meio de cultura foi inoculado com 10% (v/v) da pré-cultura. O pH da cultura foi mantido em 7,0 pela adição manual de NH_4OH (5%) ou HCl (10%). Amostras foram retiradas a cada 2h por aproximadamente 16h, correspondente à fase de crescimento.

2.4 Determinações analíticas

2.4.1 Biomassa

A densidade celular foi determinada por turbidimetria a 600 nm.

2.4.3 Modelagem do crescimento microbiano

Os modelos primários utilizados para o ajuste das curvas de crescimento foram: modelo de Gompertz, modelo de Gompertz Modificado e modelo Logístico. Os modelos serão usados para derivar uma expressão para os parâmetros biológicos da formação de biomassa, e serão comparados estatisticamente. Os parâmetros, velocidade específica de crescimento na fase exponencial (μ_{max} [h^{-1}]), duração da fase lag (λ [h]) e o aumento logarítmico da população (A), que são mostrados na figura 1, foram calculados pelos três modelos que são descritos a seguir.

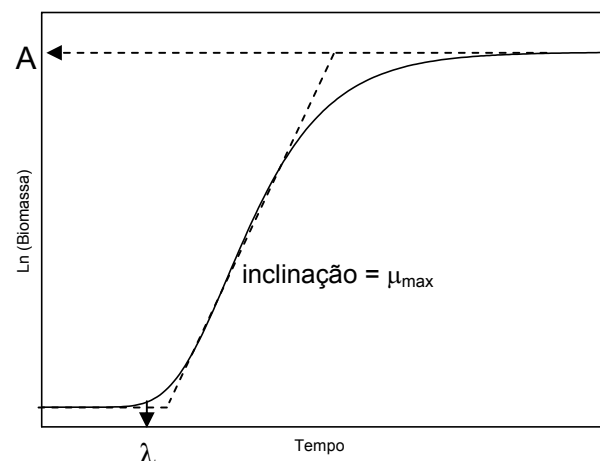


Figura 1: Curva de crescimento microbiano com os parâmetros biológicos em função do tempo

O Modelo de Gompertz (Erkmen, 2000) está expresso pela equação (1):

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[-B \cdot (t - M)\right]\right\} \quad (1)$$

onde, $\ln X/X_0$ é o logaritmo neperiano da densidade celular no tempo t , sendo que X é a absorbância final e X_0 é a absorbância inicial, A é o aumento

logarítmico da população, B é a velocidade relativa máxima de crescimento no tempo M [h^{-1}], e M é o tempo necessário para atingir a velocidade máxima de crescimento [h].

Através destes parâmetros, foram calculadas a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{max} = B.A/e$ [h^{-1}], onde $e=2.7182$) e a duração da fase lag ($\lambda = M - (1/B)$ [h]).

O *Modelo de Gompertz Modificado* (Erkmen, 2001) expresso pela equação (2)

$$\ln(X/X_0) = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_{max} \cdot e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (2)$$

onde, $\ln X/X_0$ é o logaritmo neperiano da absorvância no tempo t , sendo que X é a absorvância final e X_0 é a absorvância inicial, A é o aumento logarítmico da população, μ_{max} é a velocidade específica máxima de crescimento [h^{-1}] e λ é a duração da fase lag [h].

O *Modelo Logístico* (Erkmen, 2000) foi aplicado de acordo com a equação (3):

$$\ln(X/X_0) = \frac{A}{[1 + \exp(D - B.t)]} \quad (3)$$

onde, $\ln(X/X_0)$ e A possuem o mesmo significado que os do Modelo de Gompertz, D é um parâmetro adimensional e B é o crescimento relativo na metade do tempo da fase exponencial [h^{-1}]. Destes parâmetros foram obtidos: a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{max} = A.B/4$ [h^{-1}]) e a duração da fase lag ($\lambda = (D-2)/B$ [h]).

Estes modelos foram numericamente ajustados às curvas de crescimento de *R. eutropha* nas diferentes fontes de carbono testadas.

2.5 Análises estatísticas

Os seguintes índices foram utilizados para comparação dos modelos conforme apresentado por Ferreira, 2004): erro médio quadrático (MSE), coeficiente de correlação (r), fator bias e fator de exatidão.

Quanto menor o valor de MSE (eq. 4), melhor é o ajuste do modelo aos dados experimentais.

$$MSE = \frac{RSS}{n} = \frac{\sum (\text{Valor}_{\text{observado}} - \text{Valor}_{\text{predito}})^2}{n} \quad (4)$$

onde, RSS é a soma dos quadrados residuais e n é o número de graus de liberdade (número de pontos experimentais – número de parâmetros do modelo).

O fator bias é uma estimativa para a diferença média entre os valores observados e preditos. Pode ser calculado através da equação (5):

$$\text{fator bias} = 10^{\left(\frac{\sum \log(\text{Valor}_{\text{observado}} / \text{Valor}_{\text{predito}})}{n}\right)} \quad (5)$$

O fator bias procura dar o mesmo peso na média dos valores que sobreestimam e subestimam a média, ou seja, é um desvio relativo médio. Se bias igual 1, a resposta observada é igual à resposta predita. No entanto, quando bias maior 1, significa que o predito é maior que o observado. Quando bias menor 1, significa que o predito é menor que o observado.

O fator de exatidão (eq. 6) é uma medida para a diferença média absoluta entre os valores preditos e observados.

$$\text{fator de exatidão} = 10^{\left(\frac{\sum |\log(\text{Valor}_{\text{observado}} / \text{Valor}_{\text{predito}})|}{n}\right)} \quad (6)$$

Conforme aumenta o valor deste fator, o modelo é menos exato na média, ou seja, no cálculo do fator bias como se obtém uma média dos valores, os com sinais opostos, tendem a se cancelar; já no cálculo do fator de exatidão, por se tratar de valores absolutos será sempre maior que 1. Quanto maior seu valor, menor a exatidão da estimativa da média.

3. Resultados e Discussão

3.1. Aplicação dos modelos matemáticos para ajuste das curvas de crescimento de *R. eutropha*

Os modelos foram aplicados para descrever o crescimento de *Ralstonia eutropha* nas diferentes fontes de carbono testadas (glicose/frutose; bagaço de maçã; resíduo amiláceo). Os resultados das análises estatísticas realizadas para comparação dos modelos aplicados estão apresentados na Tabela 1.

O erro médio quadrático, MSE, representa a adequação dos modelos aos dados experimentais. Quanto menor o valor do MSE, melhor o ajuste do modelo. Comparando os valores dos MSE da Tabela 1, observa-se que os três modelos apresentaram um baixo valor de MSE. Entretanto, o Modelo Logístico obteve a melhor predição dos dados de crescimento de *Ralstonia eutropha* nas três fontes de carbono testadas. Os coeficientes de

Tabela 1: Valores dos índices matemáticos e estatísticos para os modelos aplicados nas diferentes fontes de carbono

Índices	Modelos Matemáticos								
	Glicose/Frutose			Bagaço de Maçã			Resíduo Amiláceo		
	GM ^a	G ^b	L ^c	GM	G	L	GM	G	L
MSE ^d	0,003	0,003	0,003	0,016	0,013	0,012	0,003	0,001	0,000
r ^e	0,998	0,998	0,998	0,995	0,996	0,997	0,998	0,999	0,999
F. bias	0,988	0,990	0,962	1,021	1,004	1,003	1,016	1,004	1,004
F. exatidão	1,051	1,046	1,078	1,084	1,064	1,067	1,037	1,024	1,021

^a GM: Gompertz Modificado; ^b G: Gompertz; ^c L: Logístico; ^d MSE: erro médio quadrático; ^e r: coeficiente de correlação.

correlação obtidos nos modelos estiveram todos acima de 0,99, indicando que todos os modelos testados apresentaram um bom ajuste aos dados experimentais, podendo desta forma ser utilizados para a predição do crescimento da bactéria *R. eutropha*. O fator bias e de exatidão, fornecem uma indicação objetiva da performance do modelo. Os valores do fator bias estiveram bem próximos de 1,0 indicando que a resposta predita é igual a observada.

Os valores do fator de exatidão representam quanto os preditos diferem dos observados em média. Conforme aumenta esse valor, o modelo é menos exato na média, isto é, menor a exatidão da estimativa. Os valores do fator de exatidão obtidos estão próximos de 1,0, sendo que para o bagaço de maçã o Modelo de Gompertz Modificado, foi o que apresentou o maior valor, indicando que, em média, os preditos diferem em 8% dos observados. Pode-se dizer que, para as três fontes de carbono testadas, pela proximidade dos valores obtidos para os diferentes índices calculados, em geral o Modelo Logístico foi o que obteve os melhores resultados para a predição do crescimento de *Ralstonia eutropha*. Pelos motivos acima citados o Modelo Logístico foi escolhido, embora não apresente diferença significativa com os outros dois modelos.

Diversos autores reportam o crescente uso de modelo Logístico para descrever o crescimento de microrganismos, assim como para prever inibição ou inativação do crescimento microbiano (Tobajas e Garcia-Calvo, 2000; Erkmen e Alben, 2002; Wachenheim *et al.*, 2003). Para culturas em que o acúmulo de produtos é verificado após a carência ou limitação de nutrientes, o modelo Logístico é apropriado, como na produção de PHAs (Wachenheim *et al.*, 2003). Assim como para a obter parâmetros que tenham significado biológico, ao invés do que simplesmente plotar curvas de crescimento empiricamente. As curvas do ajuste do Modelo Logístico aos dados experimentais do crescimento do microrganismo estão apresentadas na Figura 2. A partir das curvas ajustadas,

obtiveram-se os parâmetros A , μ_{max} e λ , e os seus valores para as diferentes fontes de carbono estão apresentadas na Tabela 2.

Os resultados apresentados na Figura 2 e Tabela 2 mostram que a bactéria *Ralstonia eutropha* possui capacidade de crescimento nas fontes de carbono testadas (bagaço de maçã e resíduo amiláceo), sendo próximo ao crescimento em meio padrão (Glicose/Frutose).

Tabela 2: Parâmetros obtidos pelo ajuste Modelo Logístico

Parâmetro	Fonte de carbono		
	Glicose/ Frutose	Bagaço de Maçã	Resíduo Amiláceo
A ^a	2,50	3,39	2,28
μ_{max} ^b (h ⁻¹)	0,27	0,24	0,23
λ ^c (h)	0,99	0,00	0,00

^a A: aumento logarítmico da população;

^b μ_{max} : velocidade específica máxima de crescimento;

^c λ : duração da fase lag.

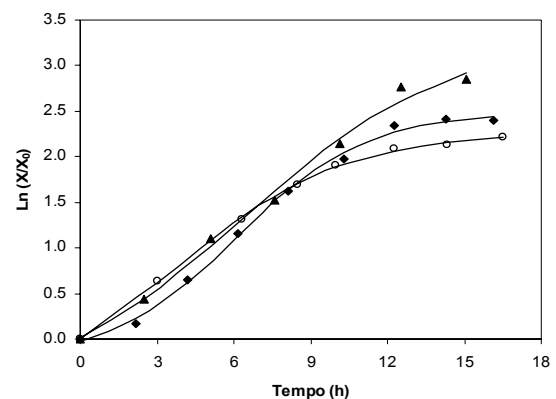


Figura 2: Curvas de crescimento de *R. eutropha* expressa em $\ln(X/X_0)$ pelo tempo nas fontes de carbono (◆) Glicose/Frutose, (▲) Bagaço de Maçã e (○) Resíduo Amiláceo. As linhas representam o Modelo Logístico ajustado aos dados experimentais.

Apesar de apresentar velocidade específica máxima de crescimento ligeiramente superior em meio padrão, a bactéria teve uma pequena fase lag (0,99 h) no crescimento em Glicose/Frutose. As velocidades de crescimento na fase exponencial para os resíduos testados foram quase iguais (0,24 e 0,23 h⁻¹), mas o aumento logarítmico da população em bagaço de maçã foi maior, isto é, a concentração celular final foi maior neste resíduo comparado ao resíduo amiláceo.

3.2 Influência da Suplementação do Meio de Cultura com Solução Mineral

Como os resíduos utilizados apresentam, além de açúcares redutores, outros nutrientes (sais minerais) em sua composição, procedeu-se um teste para verificar a necessidade da suplementação do meio de cultura com uma solução mineral, ou apenas com a fonte de nitrogênio. Em ambos os casos, adicionou-se ao meio uma solução de fosfato. As curvas de crescimento com os dados experimentais e o ajuste do Modelo Logístico estão apresentadas nas Figuras 3 e 4, para o bagaço de maçã e resíduo amiláceo, respectivamente. Os dados obtidos pelo modelo podem ser visualizados na Tabela 3.

Percebe-se na Tabela 3 e Figura 3, que há uma pequena diferença entre as culturas com e sem suplementação da solução mineral. A velocidade específica máxima de crescimento no meio apenas com fonte de nitrogênio, foi superior (0,29 h⁻¹), comparada ao meio com sais, porém este apresentou uma concentração celular final maior (A=3,39). Com isto, pode-se dizer que não é necessária a suplementação do bagaço de maçã com o meio mineral, para o crescimento e produção de polihidroxialcanoatos por *R. eutropha*.

Para o resíduo amiláceo, observa-se na Figura 4 e Tabela 3, que a cultura apenas com fonte de nitrogênio próximos à cultura suplementada com o meio mineral, apresentando um A ligeiramente superior àquele sem suplementação. O μ_{max} na cultura sem suplementação foi maior que o da cultura com sais, 0,25 e 0,23 h⁻¹, respectivamente. Da mesma forma que para o bagaço de maçã, não é necessária a suplementação do resíduo amiláceo com nutrientes minerais, fato que é interessante para a produção dos polihidroxialcanoatos, pois a adição apenas de fontes de nitrogênio e fósforo ao meio de cultivo, contribui para a redução dos custos de produção destes biopolímeros.

Tabela 3: Parâmetros obtidos pelo Modelo Logístico para as culturas com e sem suplementação de solução mineral

Meio	Parâmetro		
	A	μ_{max} (h ⁻¹)	λ (h)
Bagaço de Maçã			
Suplementado com sais	3,39	0,24	0,00
Suplementado com a fonte de N	2,74	0,29	0,37
Resíduo Amiláceo			
Suplementado com sais	2,28	0,23	0,00
Suplementado com a fonte de N	3,00	0,25	0,00

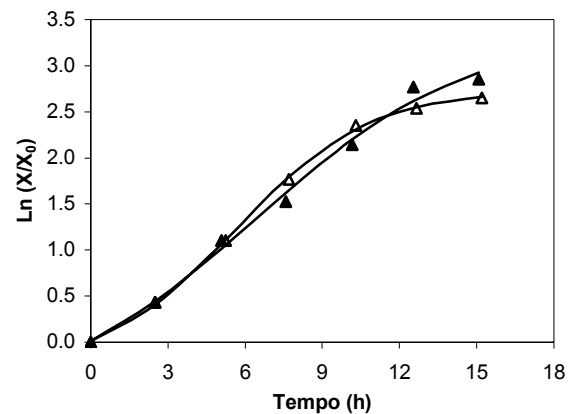


Figura 3: Curvas de crescimento de *R. eutropha*, expressa em Ln (X/X_0) pelo tempo, em Bagaço de Maçã (▲) suplementado com sais e (△) apenas com fonte de N. As linhas representam o Modelo Logístico ajustado aos dados experimentais.

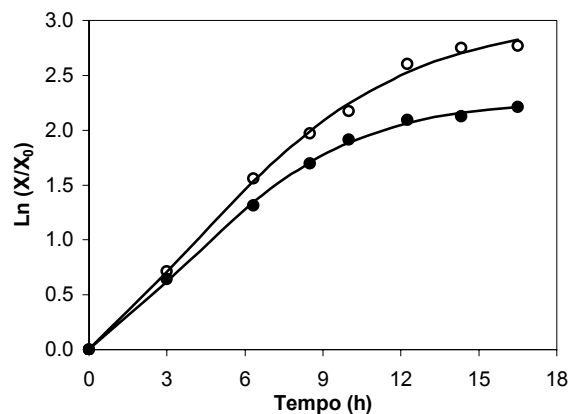


Figura 4: Curvas de crescimento de *R. eutropha*, expressa em Ln (X/X_0) pelo tempo, em Resíduo Amiláceo (●) suplementado com sais e (○) apenas com fonte de N. As linhas representam o Modelo Logístico ajustado aos dados experimentais.

A capacidade de crescimento e produção de PHAs em resíduos agroindustriais, já foi demonstrada por outros autores. O crescimento de *R. eutropha* utilizando açúcar invertido como fonte de carbono foi realizado por Marangoni *et al.*, (2001). Os autores encontraram uma velocidade específica máxima de crescimento de $0,26 \text{ h}^{-1}$, valor próximo aos encontrados neste trabalho, confirmando que este microrganismo tem grande capacidade de utilizar substratos renováveis e de baixo custo para o seu crescimento. Outro resíduo potencial para a produção de PHAs é o soro de leite. Subproduto da manufatura de queijos, o soro de leite possui em sua composição lactose que pode ser utilizada como fonte de carbono pelas bactérias no processo de obtenção dos PHAs (Wong e Lee, 1998; Marangoni *et al.*, 2002). Rusendi e Sheppard, (1995), utilizando hidrolisado de efluente de indústria processadora de batatas (resíduo amiláceo) obtiveram $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de P(3HB), que representou 76,9% do total de biomassa seca.

4. Conclusão

A bactéria *Ralstonia eutropha* apresentou uma grande capacidade de crescimento nas fontes de carbono testadas, comparado ao meio padrão (Glicose/Frutose). A utilização de substratos como os resíduos amiláceos e da indústria processadora de maçã pode contribuir para redução dos custos de produção dos polihidroxialcanoatos, visto que este fator tem grande influência no preço final dos biopolímeros. Verificou-se também neste trabalho que não há a necessidade de complementar o meio de cultivo com sais minerais, já que estes sais estão presentes nos resíduos testados, suplementado o meio apenas com fontes de nitrogênio e fósforo.

Este estudo permitiu a predição do crescimento de *Ralstonia eutropha* em diferentes fontes de carbono através do cálculo de três parâmetros, μ_{max} , λ e A . Os modelos testados (Gompertz, Gompertz Modificado e Logístico) descreveram bem o crescimento da bactéria, entretanto o Modelo Logístico foi escolhido por apresentar melhores resultados na análise estatística. A partir destes testes, estudos de estratégias para a produção de PHAs utilizando os resíduos testados como substratos devem ser realizados. A modelagem da produção de polímero poderá ser feita, com o objetivo de determinar estratégias de alimentação de substrato e nutrientes.

Referências

- Aragão, G. M. F., Lindley, N. D., Uribealrea, J. L. e Pareilleux, A. Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 937-942, 1996.
- Baranyi, J. e Roberts, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 277-294, 1994.
- Berovic, M. e Ostrovernik, H. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 47-53, 1997.
- Buchanan, R. L., Whiting, R. C. e Damert, W. C. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. **Food Microbiology**, v. 14, p. 313-326, 1997.
- Choi, J. e Lee, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 13-21, 1999.
- Christen, P., Bramorski, A., Revah, S. e Soccol, C. R. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 211-215, 2000.
- Dalgaard, P. e Koutsoumanis, K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. **Journal of Microbiological Methods**, v. 43, p. 183-196, 2001.
- Doi, Y. **Microbial Polyesters**. ed., v. New York: VHC Publishers, Inc., 1990.
- Du, G. C., Chen, J., Yu, J. e Lun, S. Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 59-65, 2001.
- Erkmen, O. Predictive modelling of *Listeria monocytogenes* inactivation under high pressure carbon dioxide. **LWT - Food Science and Technology**, v. 33, p. 514-519, 2000.
- Erkmen, O. Mathematical modeling of *Escherichia coli* inactivation under high-pressure carbon dioxide. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p. 39-43, 2001.
- Erkmen, O. e Alben, E. Mathematical modeling of citric acid production and biomass formation by *Aspergillus niger* in undersized semolina. **Journal of Food Engineering**, v. 52, p. 161-166, 2002.

- Ferreira, L. D. **Utilização da microbiologia preditiva na avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas em presunto fatiado**. Florianópolis, 2004. f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina.
- Hajmeera, M. e Basheer, I. Comparison of logistic regression and neural network-based classifiers for bacterial growth. **Food Microbiology**, v. 20, p. 43-55, 2003.
- Kim, B. S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 27, p. 774-777, 2000.
- Lee, S. Y., Choi, J. e Wong, H. H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 31-36, 1999.
- López, S., Prieto, M., Dijkstra, J., Dhanoa, M. S. e France, J. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 289-300, 2004.
- Marangoni, C., Furigo Jr, A. e Aragão, G. M. F. Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1635-1638, 2000.
- Marangoni, C., Furigo Jr, A. e Aragão, G. M. F. The influence of substrate source on the growth of *Ralstonia eutropha* aiming at the production of polyhydroxyalkanoate. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18, p. 175-180, 2001.
- Marangoni, C., Furigo Jr, A. e Aragão, G. M. F. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 137-141, 2002.
- Mcmeekin, T. A. e Ross, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 133-153, 2002.
- Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 426-428, 1959.
- Poirier, Y. Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism. **Progress in Lipid Research**, v. 41, p. 131-155, 2002.
- Pozo, C., Martínez-Toledo, M. V., Rodelas, B. e González-López. Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechín (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source. **Journal of Biotechnology**, v. 97, p. 125-131, 2002.
- Reddy, C. S. K., Ghai, R., Rashmi e Kalia, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 137-146, 2003.
- Rusendi, D. e Sheppard, J. D. Hydrolysis of potato processing waste for the production of poly-b-hydroxybutyrate. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 191-196, 1995.
- Sarikaya, E., Higasa, T., Adachi, M. e Mikami, B. Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 711-715, 2000.
- Squio, C. R., Marangoni, C., Vecchi, C. S. e Aragão, G. M. F. Phosphate feeding strategy during production phase improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) storage by *Ralstonia eutropha*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 257-260, 2003.
- Tobajas, M. e Garcia-Calvo, E. Comparison of analysis methods for determination of kinetic parameters in batch culture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 845-851, 2000.
- Wachenheim, D. E., Patterson, J. A. e Ladisch, M. R. Analysis of the logistic function model: derivation and applications specific to batch cultured microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 157-164, 2003.
- Whiting, R. C. Microbial modeling in foods. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 35, p. 464-494, 1995.
- Wong, H. H. e Lee, S. Y. Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 30-33, 1998.

4.1.1 Conclusão

Através deste estudo, demonstrou-se que a bactéria *Ralstonia eutropha* possui capacidade de crescimento nos resíduos das indústrias processadoras de maçã e amilácea. Os três modelos primários de crescimento testados ajustaram-se às curvas de crescimento da bactéria, sendo que o Modelo logístico apresentou melhores resultados na análise estatística.

Com os resultados desta primeira etapa, foi dada continuidade ao trabalho realizando o crescimento da bactéria em meio limitado, utilizando os resíduos das indústrias de alimentos como fonte de carbono, para a produção de poli(3-hidroxibutirato).

4.2 PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) EM RESÍDUOS DE INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS

Diversos autores vêm propondo o uso de resíduos de indústrias de alimentos como fonte de carbono para a produção de polihidroxialcanoatos. Estes resíduos são excelentes substratos para bioprocessos pois geralmente possuem grandes quantidades de carboidratos, ácidos orgânicos e outros nutrientes que auxiliam no crescimento microbiano. Alguns resíduos como o soro de leite, açúcar invertido, melaços, entre outros já foram utilizados nos processos de biossíntese dos PHAs (Wong e Lee, 1998; Kim, 2000; Nonato *et al.*, 2001; Marangoni *et al.*, 2002). A adição de ácidos graxos, no momento da limitação, ao meio de cultura, favorece a produção dos PHAs, aumentando o conteúdo de polímero acumulado e a produtividade (Lee *et al.*, 1995b; Marangoni *et al.*, 2000; Squio, 2003).

Com isso, o objetivo desta etapa foi estudar a produção de poli(3-hidroxitirato) utilizando resíduos das indústrias processadoras de maçã e indústria amilácea como substrato, bem como a suplementação do meio de cultura com ácido oléico e óleo de soja.

Os resultados serão apresentados nos artigos a seguir, intitulados “Produção de poli(3-hidroxitirato) por *Ralstonia eutropha* em resíduos amiláceos suplementado com ácidos graxos” e “Bagaço de maçã suplementado com ácidos graxos como substrato para a produção de poli(3-hidroxitirato) por *Ralstonia eutropha*”.

Produção de poli(3-hidroxiбутирато) por *Ralstonia eutropha* em resíduos amiláceos suplementado com ácidos graxos

Rafael C. Rodrigues, Gláucia M. F. Aragão*

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina - Cx. Postal 476 - CEP: 88040-900, Florianópolis - SC, Brasil
E-mail: rafael@enq.ufsc.br; glaucia@enq.ufsc.br

Resumo

Este trabalho teve como objetivo estudar a produção de poli(3-hidroxiбутирато) a partir de resíduos de indústrias amiláceas, bem como a suplementação do meio de cultura com ácido oléico e óleo de soja, a fim de obter maiores produtividades e reduzir os custos de produção. Os ensaios foram conduzidos através de culturas de *Ralstonia eutropha*, em frascos agitados, onde a fonte de carbono utilizada foi um meio sintético simulando resíduo amiláceo. Os suplementos foram adicionados no início da fase de produção. Amostras foram retiradas a cada 2h para análise de crescimento celular, açúcares redutores, nitrogênio residual e dosagem do polímero. Os conteúdos de P(3HB) encontrados foram de 46, 50 e 56% com produtividades de 0,22; 0,37 e 0,49 g.L⁻¹.h⁻¹ para as culturas sem suplementação, suplementação com ácido oléico e suplementação de óleo de soja, respectivamente. O resíduo de indústrias amiláceas mostrou-se uma boa fonte de carbono para a produção de PHAs, e a suplementação do meio de cultura com ácidos graxos, ou óleo de soja favoreceu a produção de P(3HB) aumentando o conteúdo de polímero acumulado em 10% e a produtividade em mais de duas vezes com relação à cultura sem suplementação.

Palavras-chave: poli(3-hidroxiбутирато); resíduo amiláceo; *Ralstonia eutropha*; suplementação com ácidos graxos

Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Ralstonia eutropha* in starchy industry waste with fatty acids supplementation

Abstract

The aim of this work was to use the residue of the starch industry, with supplementation of oleic acid (pure or as vegetable oil) for the poly(3-hydroxybutyrate) production, in order to obtain larger productivity and to reduce the polymer production costs. The experiments were carried out through cultures of *Ralstonia eutropha* in agitated flasks, where the carbon source was a synthetic medium that had characteristics from the waste of the starch industry. The supplementation of oleic acid and soybean oil was made in the moment of the nitrogen limitation. Samples were collected to each 2h for analysis of cellular growth, reducing sugars, residual nitrogen and polymer dosage. The P(3HB) content obtained were 46; 50 and 56% with productivities of 0,22; 0,37 and 0,49 g.L⁻¹.h⁻¹ for the cultures without supplementation, oleic acid supplementation and soybean oil supplementation, respectively. The starchy industry waste was shown a good carbon source for PHAs production, and the supplementation of the culture medium with fatty acids, or soybean oil favored the P(3HB) accumulation increasing the polymer content about 10% and the productivity more than twice in relation to culture without supplementation.

Keywords: poly(3-hydroxybutyrate); starchy waste; *Ralstonia eutropha*; fatty acids supplementation

1. Introdução

Materiais plásticos têm sido universalmente usados no cotidiano e estão causando sérios problemas ambientais devido à sua baixa degradabilidade. Na busca para reduzir a

quantidade de resíduos plásticos, programas mundiais para gerenciamento eficiente de materiais plásticos usados, como a reciclagem, foram iniciados. Outra solução para reduzir estes resíduos é o uso de plásticos biodegradáveis (Holmes, 1985; Byrom, 1987; Lee e Chang, 1995).

Dentre os principais plásticos biodegradáveis em desenvolvimento, encontram-se os polihidroxialcanoatos (PHAs), que são polímeros acumulados como material de reserva de carbono e/ou energia, intracelularmente em vários microrganismos sob condição de limitação de um nutriente essencial como N, P, S, O ou Mg, e na presença de excesso de fonte de carbono (Anderson e Dawes, 1990; Lee *et al.*, 1999). Os PHAs têm recebido muita atenção devido à sua similaridade aos plásticos convencionais e sua completa biodegradabilidade (Lee, 1996a). O poli(3-hidroxiobutirato) [P(3HB)] e o poli(3-hidroxiobutirato-co-3-hidroxi valerato) [P(3HB-co-3HV)] são os polímeros mais estudados da família dos polihidroxialcanoatos. Este polímero apresenta propriedades físicas e mecânicas similares às encontradas no polipropileno, plástico de origem petroquímica (Marangoni *et al.*, 2001; Tsuge, 2002).

A bactéria, gram-negativa, *Ralstonia eutropha*, é o microrganismo mais utilizado para a produção de polihidroxialcanoatos, devido a seus altos rendimentos, podendo atingir até 80% de sua massa seca em polímero, e habilidade para crescer em fontes de carbono renováveis (Doi, 1990).

O processo de produção de P(3HB) em *R. eutropha* acontece em duas fases: (1) crescimento celular não limitado, com o objetivo de geração de biomassa, em um meio de cultura balanceado; (2) limitação ou exaustão de um nutriente essencial, associado ao fornecimento não limitado de fonte de carbono, com acúmulo intracelular de polímero (Dawes e Senior, 1973).

Apesar de apresentar vantagens em relação aos plásticos convencionais, como o fato de serem materiais biocompatíveis e biodegradáveis, a produção industrial de PHA, embora já ocorra, possui um custo ainda muito elevado quando comparado aos polímeros de origem petroquímica. Alguns fatores como, desenvolvimento de melhores cepas, processos de recuperação e extração mais eficientes, e principalmente redução dos custos com matéria-prima, podem contribuir para tornar os PHAs mais competitivos no mercado (Choi e Lee, 1999b).

O gasto com matéria-prima pode chegar a 40% do custo total de produção dos polihidroxialcanoatos. Uma forma de reduzir estes custos é a utilização de fontes de carbono alternativas, que podem ser resíduos ou subprodutos das indústrias de alimentos como soro de leite ou açúcar invertido (Marangoni *et al.*, 2002). Uma outra fonte disponível em grandes quantidades é o amido. Amido e seus derivados são os principais componentes da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) de efluentes de indústrias têxteis, fermentativas e de processamento de alimentos e

bebidas (Yu, 2001). Nas indústrias de alimentos, o amido pode ser obtido de grãos como arroz, trigo e milho, e tubérculos como batata e mandioca (Sarikaya *et al.*, 2000). Determinados microrganismos não possuem capacidade de utilizar o amido como fonte de carbono, para tanto, antes do processo fermentativo, o amido sofre uma hidrólise à glicose (Kim, 2000). Rusendi e Sheppard, (1995), utilizaram resíduo da indústria processadora de batatas para a produção de P(3HB), e através de uma hidrólise enzimática, foi possível a obtenção de glicose para utilização como fonte de carbono pelo microrganismo.

O uso de ácidos graxos como o ácido oléico, ou de óleos vegetais que contêm em sua composição estes constituintes, como suplementos nutricionais é uma alternativa interessante para aumentar a produção e a produtividade do processo de obtenção dos PHAs. Estes agentes podem interferir na via metabólica proporcionando maior produção de células e resultando em maior produtividade, mas também podem agir diretamente na síntese dos biopolímeros. A utilização destes ácidos graxos e óleos vegetais tem sido demonstrada por diversos autores (Fukui e Doi, 1998; Choi e Lee, 1999c; Marangoni *et al.*, 2000; Kahar *et al.*, 2004).

Este trabalho teve como objetivo estudar a produção de poli(3-hidroxiobutirato) a partir de resíduos de indústrias amiláceas, bem como a suplementação do meio de cultura com ácido oléico e óleo de soja.

2. Material e Métodos

2.1 Microrganismo e meio de cultura

A cepa utilizada foi *Ralstonia eutropha* DSM 545, por sua grande capacidade de acúmulo de polímero e possibilidade de crescimento em glicose como fonte de carbono (mutante espontâneo). Inicialmente, as células foram cultivadas em um meio complexo, caldo nutriente (NB), contendo peptona de carne (5,0 g.L⁻¹) e extrato de carne (3,0 g.L⁻¹). O meio de cultura foi um meio sintético simulando efluente de indústria amilácea. Preparou-se uma solução a partir de arroz branco polido onde foi colocado em água destilada com agitação e aquecimento, e obteve-se uma solução concentrada em amido. Como a bactéria *Ralstonia eutropha* não possui a capacidade de assimilar o amido como fonte de carbono, foi necessário hidrolisar este amido para obtenção de glicose. Foi realizada uma hidrólise ácida, com adição de HCl (10%) na proporção de 1:10 (ácido:solução com amido). A solução para hidrólise foi aquecida a 110°C por 2,5

horas. Após, resfriou-se à temperatura ambiente e neutralizou-se a solução com adição de NaOH (10%). A solução de amido hidrolisado foi adicionada ao meio de cultivo para se obter uma concentração inicial de açúcar de 30 g.L⁻¹. A esta solução foi adicionada a fonte de nitrogênio, (NH₄)₂SO₄, na concentração de 5,0 g.L⁻¹ no pré-inóculo e 2,3 g.L⁻¹ no meio de cultura final. Após autoclavado, uma solução estéril de fosfato foi assepticamente adicionada para se obter uma concentração final de 8,5 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄.12H₂O e 1,5 g.L⁻¹ de KH₂PO₄.

2.2 Condições de cultivo

Os experimentos foram conduzidos em culturas em batelada alimentada em frascos aletados de 1000 mL, contendo 300 mL do meio de cultura e incubados a 150 rpm em agitador rotatório (*shaker*). A temperatura foi de 30°C para todos os experimentos. O meio de cultura foi inoculado com 10% (v/v) da pré-cultura. O pH foi mantido em 7,0 pela adição manual de NaOH (10%) ou HCl (10%).

2.3 Adição de suplementos

No início da fase de produção, um pulso de cada suplemento selecionado foi adicionado a fim de se obter uma concentração equivalente a 0,3 g_{ac. oléico}.L⁻¹ no meio, conforme estudos realizados por Marangoni *et al.*, (2000). Foram adicionados ácido oléico puro, e óleo de soja, com uma concentração em ácido oléico de aproximadamente 25%.

2.4 Determinações analíticas

Para as determinações analíticas, amostras foram retiradas a cada 2h, para as análises descritas abaixo.

2.4.1 Biomassa

A densidade celular foi determinada por turbidimetria a 600 nm e a concentração celular através de análise gravimétrica, onde amostras de 2mL do meio de cultura foram centrifugadas e os precipitados foram lavados duas vezes com água destilada e colocados em estufa a 100°C até peso constante.

2.4.2 Fonte de carbono

A concentração de açúcar redutor residual foi medida pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959), que determina a concentração de açúcares redutores.

2.4.3 Nitrogênio residual

A concentração de nitrogênio residual, na forma de íons amônio, foi determinada por um kit Uréia-PP (Gold Analisa Diagnóstica) através de método enzimático-colorimérico.

2.4.4 Dosagem de P(3HB)

Amostras de células para análise de polímero foram obtidas de forma semelhante àquelas para análise de biomassa, com a diferença que foram congeladas, ao invés de secas, para subsequente análise e foram preparadas conforme descrito por Squio *et al.*, (2003). Poli(3-hidroxiobutirato) (Sigma) foi usado como padrão externo. Os metil-ésteres resultantes da reação de metanólise foram quantificados pela injeção de 1 µL em cromatógrafo a gás (CG-90) equipado com uma coluna de sílica fundida (Supercowax-10 - 0,53 mm x 30 m). As temperaturas de injeção, detecção e coluna utilizadas foram 190, 230 e 90°C, respectivamente.

2.5 Análise cinética

A produtividade foi calculada pela diferença entre a concentração de polímero em um instante *t* e a concentração inicial de polímero, dividida pelo intervalo de tempo correspondente, ou seja, $produtividade_{poi} = (pol_t - pol_i) / (t_t - t_i)$. Os dados experimentais foram ajustados pelo software LISSAGE desenvolvido pelo "Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse", França.

3. Resultados e Discussão

A Figura 1 mostra as curvas de crescimento microbiano em função do tempo, expresso pelo logaritmo neperiano da biomassa medida pela absorbância ($\ln X/X_0$), para todas as culturas. As curvas auxiliam como uma medida "on-line" do crescimento da bactéria para verificar o momento de limitação da cultura. As velocidades específicas de crescimento na fase exponencial (μ_{max}), foram determinadas pela regressão linear das curvas de $\ln X/X_0$ e os valores obtidos foram de 0,18; 0,21 e 0,22 h⁻¹, para as culturas sem suplementação, com suplementação de ácido oléico e suplementação de óleo de soja. As evoluções da concentração de biomassa total (*Xt*) e residual [*Xr* = *Xt* - P(3HB)], polímero [P(3HB)], nitrogênio residual (NH₄⁺) e consumo de açúcar ao longo das culturas sem suplementação e com suplementação de ácido oléico e óleo de soja, estão apresentadas nas Figuras 2a, b e c, respectivamente.

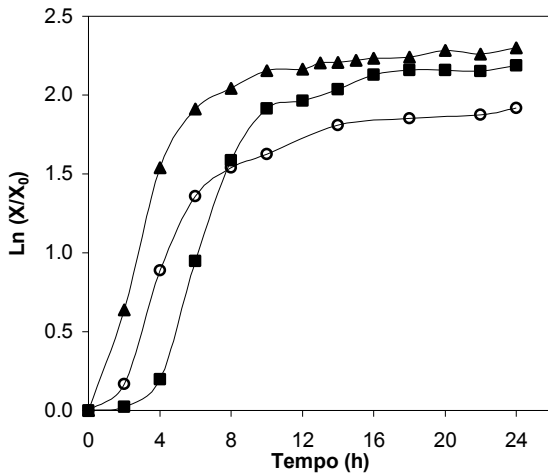


Figura 1: Curvas de crescimento de *R. eutropha* expresso em $\ln(X/X_0)$ em função do tempo para as culturas sem suplementação (\circ); suplementado com ácido oléico (\blacktriangle), suplementado com óleo de soja (\blacksquare).

A fonte de carbono principal foi um meio sintético simulando resíduo de indústria amilácea, o qual sofreu um processo de hidrólise ácida para permitir o crescimento da bactéria. Para a produção de P(3HB) por *R. eutropha*, há a necessidade da limitação de um ou mais nutrientes essenciais ao crescimento. Neste caso, pode-se perceber o ponto de limitação representado pela linha pontilhada na Figura 2. Este ponto está de acordo com o início da fase estacionária observado na Figura 1. Um resumo dos dados gerais obtidos nas culturas é mostrado na Tabela 1.

Ao analisar a Tabela 1, observa-se que a suplementação do meio de cultura com ácido oléico e óleo de soja favoreceu o acúmulo de P(3HB). A adição de ácido oléico ao meio de cultivo causou um aumento de 4,5% no conteúdo de polímero nas células. Já a suplementação com óleo de soja levou a produção de mais de 10% de polímero em relação à cultura sem suplementação. Estes resultados estão de acordo com Marangoni *et al.*, 2000, que obtiveram um aumento de 10% no conteúdo de polímero acumulado quando *R. eutropha* cresceu em açúcar invertido e ácido propiônico suplementando com ácido oléico. Choi e Lee, 1999c), demonstraram que o ácido oléico como suplemento nutricional em culturas de *Escherichia coli* recombinante também aumenta o acúmulo de polímero.

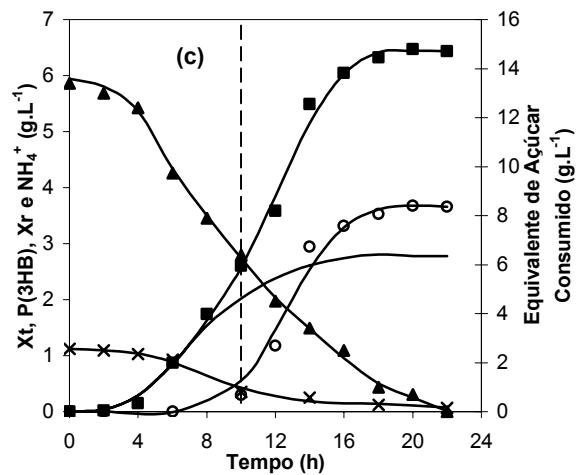
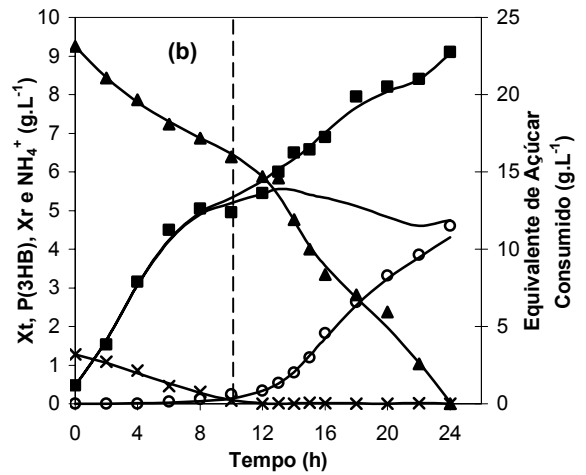
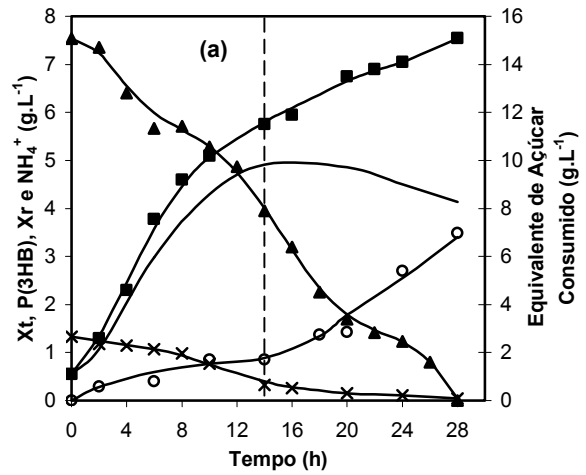


Figura 2: Evolução da biomassa total (\blacksquare), P(3HB) (\circ), biomassa residual ($—$), nitrogênio residual (\times) e consumo de açúcar (\blacktriangle) em função do tempo para as culturas sem suplementação (a); com suplementação de ácido oléico (b); com suplementação de óleo de soja (c). A linha pontilhada indica o início da fase de produção.

Tabela 1: Dados gerais obtidos nas culturas

Culturas	Tempo (h) ^a	Xt (g.L ⁻¹) ^b	P(3HB) (g.L ⁻¹)	Xr (g.L ⁻¹) ^c	% P(3HB) ^d
Sem suplementação	28	7,55	3,48	3,72	46,0
Suplementada com ácido oléico	24	9,10	4,60	4,50	50,5
Suplementada com óleo de soja	22	6,43	3,65	2,78	56,7

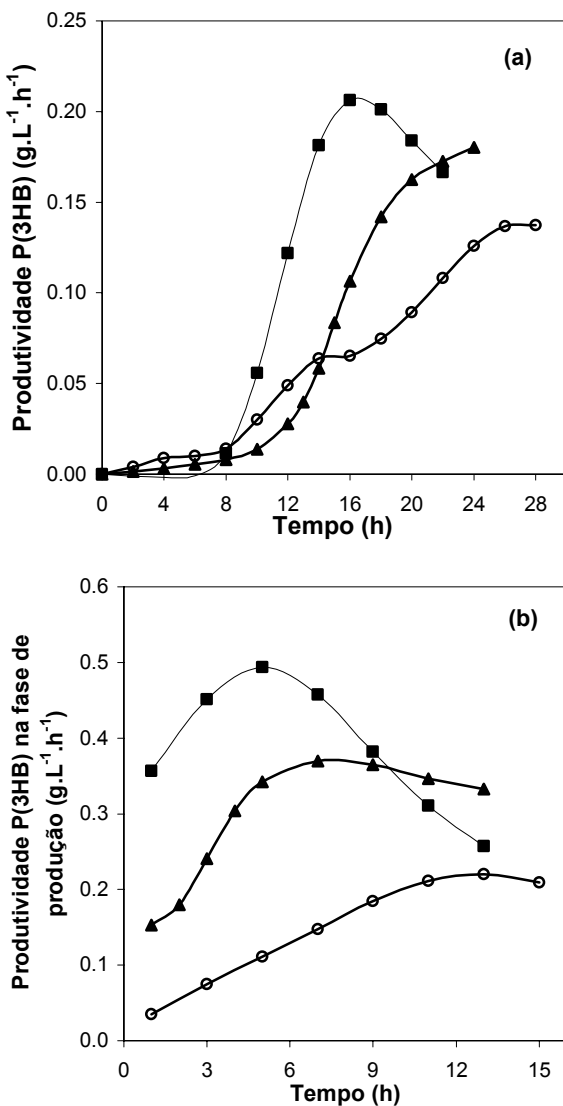
^a Tempo total da cultura^b Biomassa total^c Biomassa residual [Xr = Xt - P(3HB)]^d Conteúdo de P(3HB) no total de células secas

Figura 3: Produtividade de P(3HB) em toda a cultura (a) e na fase de produção (b) para as diferentes culturas: sem suplementação (○); suplementado com ácido oléico (▲), suplementado com óleo de soja (■).

A produtividade em polímero (P(3HB)) durante toda a cultura e durante a fase de produção, estão ilustradas nas Figuras 3a e b, respectivamente. A cultura suplementada com óleo de soja obteve os maiores valores de produtividade, que foram encontrados no início da fase de produção, enquanto que na cultura sem suplementação foram obtidos os menores valores de produtividade. As produtividades máximas foram, em g.L⁻¹.h⁻¹, 0,22, para a cultura sem suplementação, 0,37, para a cultura com suplementação de ácido oléico e 0,49, para a cultura com suplementação de óleo de soja. Os valores de produtividade obtidos foram superiores aos encontrados por Marangoni *et al.*, (2000), que obtiveram 0,14 e 0,28 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente, para as culturas sem e com suplementação de ácido oléico.

Contrário aos açúcares que podem ser diretamente utilizados pelas células bacterianas, muitos ácidos graxos, correspondentes às cadeias de formação de óleos vegetais, são produzidos na cultura por hidrólise enzimática, na presença de lipase extracelular quando estes óleos vegetais são usados para a produção de PHAs (Kahar *et al.*, 2004). Na hidrólise dos triglicérides do óleo de soja por lipase, ácidos graxos de C16 e C18 como ácido palmítico, ácido oléico, ácido linoleico e ácido linolenico são liberados no meio de cultura. Subseqüentemente, estes ácidos graxos são transferidos através da membrana celular e metabolizados via β -oxidação nas células de *R. eutropha*. Isto pode explicar o fato de se ter um maior acúmulo de polímero na cultura suplementada com óleo de soja comparada à cultura suplementada com ácido oléico.

4. Conclusão

Os conteúdos de P(3HB) e produtividade máxima em polímero, obtidos para as culturas sem suplementação, com suplementação de ácido oléico, e com suplementação de óleo de soja foram,

respectivamente 46,0% e $0,22\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$; 50,5% e $0,37\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$; 56,7% e $0,49\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

Como visto neste trabalho, a utilização de resíduos das indústrias amiláceas para a produção de polihidroxicanoatos promete ser uma alternativa potencial para redução dos elevados custos de produção dos biopolímeros. A suplementação do meio de cultura com óleos vegetais, ricos em ácidos graxos, contribuiu para o aumento do conteúdo de polímero acumulado e da produtividade.

Referências

- Anderson, A. J. e Dawes, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**, v. 54, p. 450-472, 1990.
- Byrom, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Trends in Biotechnology**, v. 5, p. 246-250, 1987.
- Choi, J. e Lee, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 13-21, 1999a.
- Choi, J. e Lee, S. Y. High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4363-4368, 1999b.
- Dawes, E. A. e Senior, P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, v. 10, p. 135-266, 1973.
- Doi, Y. **Microbial Polyesters**. ed., v. New York: VHC Publishers, Inc., 1990.
- Fukui, T. e Doi, Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 333-336, 1998.
- Holmes, P. A. Applications of PHB - A microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physical Technology**, v. 16, p. 32-36, 1985.
- Kahar, P., Tsuge, T., Taguchi, K. e Doi, Y. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. **Polymer Degradation and Stability**, v. 83, p. 79-86, 2004.
- Kim, B. S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 27, p. 774-777, 2000.
- Lee, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 1-14, 1996.
- Lee, S. Y. e Chang, H. N. Production of Poly(hydroxyalkanoic acid). **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 52, p. 27-58, 1995.
- Lee, S. Y., Choi, J. e Wong, H. H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 31-36, 1999.
- Marangoni, C., Furigo Jr, A. e Aragão, G. M. F. Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1635-1638, 2000.
- Marangoni, C., Furigo Jr, A. e Aragão, G. M. F. The influence of substrate source on the growth of *Ralstonia eutropha* aiming at the production of polyhydroxyalkanoate. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18, p. 175-180, 2001.
- Marangoni, C., Furigo Jr, A. e Aragão, G. M. F. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 137-141, 2002.
- Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 426-428, 1959.
- Rusendi, D. e Sheppard, J. D. Hydrolysis of potato processing waste for the production of poly-β-hydroxybutyrate. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 191-196, 1995.
- Sarikaya, E., Higasa, T., Adachi, M. e Mikami, B. Comparison of degradation abilities of α- and β-amylases on raw starch granules. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 711-715, 2000.
- Squio, C. R., Marangoni, C., Vecchi, C. S. e Aragão, G. M. F. Phosphate feeding strategy during production phase improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) storage by *Ralstonia eutropha*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 257-260, 2003.
- Tsuge, T. Metabolic improvements and use inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 579-584, 2002.
- Yu, J. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 105-112, 2001.

Bagaço de maçã suplementado com ácidos graxos como substrato para a produção de poli(3-hidroxi-butirato) por *Ralstonia eutropha*

Rafael C. Rodrigues, Gláucia M. F. Aragão *

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina - Cx. Postal 476 - CEP: 88040-900, Florianópolis - SC, Brasil
E-mail: rafael@enq.ufsc.br; glaucia@enq.ufsc.br

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar o uso do bagaço maçã, resíduo da indústria processadora de maçãs, para a produção de poli(3-hidroxi-butirato). Realizou-se também a suplementação do meio de cultura com ácidos graxos a fim de aumentar a produção de polímero. Os experimentos foram realizados através de culturas de *Ralstonia eutropha*, em frascos agitados, onde a fonte de carbono utilizada foi um extrato aquoso do bagaço de maçã. Foram adicionados ácido oléico e óleo de soja, como suplementos nutricionais, no momento da limitação. Amostras foram retiradas a cada 2h para análise de crescimento celular, açúcares redutores, nitrogênio residual e quantificação do polímero. Os conteúdos de P(3HB) acumulados foram de 14, 34 e 22% do total da massa de células secas, para as culturas sem suplementação, suplementação com ácido oléico e suplementação de óleo de soja. A utilização do bagaço de maçã como fonte de carbono para a produção de poli-hidroxi-alcanoatos é uma boa alternativa, pois é uma matéria-prima barata que pode contribuir na redução dos custos de produção destes biopolímeros. A suplementação do meio de cultura com ácidos graxos aumentou o acúmulo de polímero em 20% (suplementação com ácido oléico), a produtividade ($0,09 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ sem suplementação para $0,22 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ suplementação com óleo de soja) e o fator de conversão de substrato em P(3HB) de $0,05 \text{ g}_{\text{P(3HB)}}.\text{g}_{\text{S}}^{-1}$ da cultura sem suplementação para $0,14 \text{ g}_{\text{P(3HB)}}.\text{g}_{\text{S}}^{-1}$ na cultura suplementada com ácido oléico.

Palavras-chave: poli(3-hidroxi-butirato); bagaço de maçã; *Ralstonia eutropha*; suplementação com ácidos graxos

Apple pomace with fatty acids supplementation as substrate for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Ralstonia eutropha*

Abstract

The target of this paper was to study the use of apple pomace, waste from apple processing industry, to poly(3-hydroxybutyrate) production. The supplementation of the culture medium with fatty acids was done to improve the polymer accumulation. The assays were carried out through cultures of *Ralstonia eutropha* in agitated flasks, where the carbon source was a aqueous extract from apple pomace. Oleic acid and soybean oil were added, as nutritional supplements, in the moment of the nutrient limitation. Samples were collected to each 2h for analysis of cellular growth, reducing sugars, residual nitrogen and polymer dosage. The P(3HB) content accumulated were 14; 34 and 22% in the total dry cell weight, for the cultures without supplementation, oleic acid supplementation and soybean oil supplementation. The use of apple pomace as carbon source for polyhydroxyalkanoates production is a good alternative, because it is an inexpensive raw material that could help in the reduction of the production costs from these biopolymers. The supplementation of the culture medium with fatty acids improved the P(3HB) accumulation, the productivity ($0,09 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ without supplementation to $0,22 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ soybean oil supplementation) and the yield of P(3HB) on substrate from $0,05 \text{ g}_{\text{P(3HB)}}.\text{g}_{\text{S}}^{-1}$ culture without supplementation to $0,14 \text{ g}_{\text{P(3HB)}}.\text{g}_{\text{S}}^{-1}$ culture supplemented with oleic acid.

Keywords: poly(3-hydroxybutyrate); apple pomace; *Ralstonia eutropha*; fatty acids supplementation

1. Introdução

Os plásticos biodegradáveis são polímeros que

se degradam completamente por ataque microbiano em um curto espaço de tempo, sob condições apropriadas do meio ambiente. Dentre os

biopolímeros em desenvolvimento estão os polihidroxialcanoatos (PHAs). Além da vantagem de serem biodegradáveis, ainda apresentam outras importantes características como serem biocompatíveis, serem produzidos a partir de recursos renováveis como açúcares e ácidos graxos e por terem propriedades termoplásticas e características físicas e mecânicas semelhantes às do polipropileno, polímero derivado do petróleo (Braunegg *et al.*, 1998; Sudesh *et al.*, 2000). Os PHAs são poliésteres sintetizados por microrganismos como substâncias naturais de reserva de carbono e energia. O polihidroxibutirato, P(3HB), foi o primeiro PHA a ser descoberto e é também o mais estudado e melhor caracterizado. O P(3HB) é acumulado pela célula microbiana na forma de grânulos, podendo atingir mais de 80 % de seu peso seco (Squiro e Aragão, 2004; Khanna e Srivastava, 2005).

O processo de produção de P(3HB) é normalmente conduzido em duas fases: uma fase de crescimento não limitado para acúmulo de biomassa em um meio de cultura balanceado e, na seqüência, uma fase de limitação ou exaustão de um ou mais elementos nutritivos (N, P, S ou O) associado ao fornecimento de excesso de fonte de carbono, para favorecer o acúmulo intracelular do polímero (Doi, 1990).

Muitos são os microrganismos produtores de PHAs, 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 grandes quantidades de sua massa seca em polímero, com alto peso molecular e utilizando diferentes tipos de substrato como glicose, frutose, ácido láctico, entre outros (Ramsay *et al.*, 1990).

A produção dos polihidroxialcanoatos esbarra em seu elevado custo de produção quando comparado ao dos polímeros derivados do petróleo. Porém, estudos têm sido realizados para tentar minimizar os custos de produção através da utilização de fontes de carbono de baixo custo, desenvolvimento de novas linhagens e técnicas mais eficientes para extração e recuperação do polímero (Du *et al.*, 2001; Marangoni *et al.*, 2001). Na produção de PHAs, cerca de 40% do custo total de produção é para matéria-prima (Kim, 2000). Neste sentido, diversos processos de produção de PHAs a partir de fontes de carbono baratas, como resíduos das indústrias de alimentos têm sido propostos (Choi e Lee, 1999a).

O bagaço de maçã é um resíduo da indústria processadora de maçã que apresenta problemas de despejo, causando problemas ambientais. Este bagaço consiste na massa resultante da prensagem

de maçãs para suco ou cidra (Berovic e Ostroversnik, 1997). Resíduos como estes, contém grandes quantidades de açúcares redutores (Christen *et al.*, 2000) sendo uma ótima fonte de carbono para os processos de biossíntese dos PHAs.

A utilização de ácidos graxos, ou de óleos vegetais, como fonte de carbono ou suplementos nutricionais vem sendo estudada para a produção dos PHAs (Eggink *et al.*, 1992; Choi e Lee, 1999b; Marangoni *et al.*, 2000; Kahar *et al.*, 2004). Os óleos vegetais são fontes de carbono renováveis e de baixo custo, e são incorporados pelas células e metabolizados a acetil-CoA via β -oxidação dos ácidos graxos. (Fukui e Doi, 1998). A suplementação do meio de cultura com ácidos graxos, como o ácido oléico, fornece precursores para a síntese dos ácidos graxos e libera acetil-CoA para a síntese de polímero, aumentando assim o rendimento do processo (Lee *et al.*, 1995).

Este trabalho teve como objetivo estudar a produção de polihidroxibutirato a partir de resíduo da indústria processadora de maçãs (bagaço de maçã), assim como testar a suplementação do meio de cultura com ácido oléico e óleo de soja.

2. Material e Métodos

2.1 Microrganismo e meio de cultura

A cepa utilizada foi *Ralstonia eutropha* DSM 545, por sua grande capacidade de acúmulo de polímero e possibilidade de crescimento em glicose como fonte de carbono (mutante espontâneo). Inicialmente, as células foram cultivadas em um meio complexo, caldo nutriente (NB), contendo peptona de carne (5,0 g.L⁻¹) e extrato de carne (3 g.L⁻¹). O substrato utilizado nos experimentos foi o extrato aquoso obtido a partir do bagaço de maçã. Para tanto, o bagaço foi seco em estufa com circulação de ar a 50-60°C por 24 horas e triturado. A extração do material solúvel presente no bagaço seco foi feita em frascos erlenmeyers aletados utilizando a relação 1:9 de bagaço seco e triturado para água destilada. Após a extração (60°C por 5 horas, 150 rpm), o material foi centrifugado (3500 rpm por 5 min) e o líquido foi filtrado em papel filtro qualitativo. Foi determinada a concentração de açúcares redutores e a solução adicionada ao meio final para obter uma concentração de 30 g.L⁻¹ de açúcares redutores. A esta solução foi adicionada a fonte de nitrogênio, (NH₄)₂SO₄, na concentração de 5,0 g.L⁻¹ no pré-inóculo e 2,3 g.L⁻¹ no meio de cultura final. Após autoclavado, uma solução estéril de fosfato foi asepticamente adicionada para se obter

uma concentração final de $8,5 \text{ g.L}^{-1}$ de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 .

2.2 Condições de cultivo

Os experimentos foram conduzidos em frascos aletados de 1000 mL, contendo 300 mL do meio de cultura e incubados a 150 rpm em agitador rotatório (*shaker*) por aproximadamente 24 horas. A temperatura foi de 30°C para todos os experimentos. O meio de cultura foi inoculado com 10% (v/v) da pré-cultura anterior. O pH foi mantido em 7,0 pela adição manual de NaOH (10%) ou HCl (10%).

2.3 Adição de suplementos

No início da fase de produção, um pulso de cada suplemento selecionado foi adicionado a fim de se obter uma concentração equivalente a $0,3 \text{ g}_{\text{ac. oleico}} \cdot \text{L}^{-1}$ no meio, conforme estudos realizados por Marangoni *et al.*, (2000). Foram adicionados ácido oléico puro, e óleo de soja, com um conteúdo em ácido oléico de aproximadamente 25%.

2.4 Determinações analíticas

Para as determinações analíticas, amostras foram retiradas a cada 2h, para as análises descritas abaixo.

2.4.1 Biomassa

A densidade celular foi determinada por turbidimetria a 600 nm e a concentração celular através de análise gravimétrica, onde amostras de 2mL do meio de cultura foram centrifugadas e os precipitados foram lavados duas vezes com água destilada e colocados em estufa a 100°C até peso constante.

2.4.2 Fonte de carbono

A concentração de açúcar redutor residual foi medida pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959), que determina a concentração de açúcares redutores.

2.4.3 Nitrogênio residual

A concentração de nitrogênio residual, na forma de íons amônio, foi determinada por um kit Uréia-PP (Gold Analisa Diagnóstica) através de método enzimático-colorimérico.

2.4.4 Dosagem de P(3HB)

Amostras de células para análise de polímero foram obtidas de forma semelhante àquelas para análise de biomassa, com a diferença que foram congeladas, ao invés de secas, para subsequente análise e foram preparadas conforme descrito por Squio *et al.*, (2003). Poli(3-hidroxiбутирато) (Sigma) foi usado como padrão externo. Os metil-ésteres resultantes da reação de metanólise foram quantificados pela injeção de $1 \mu\text{L}$ em cromatógrafo a gás (CG-90) equipado com uma coluna de sílica fundida (Supercowax-10 - $0,53 \text{ mm} \times 30 \text{ m}$). As temperaturas de injeção, detecção e coluna utilizadas foram 190 , 230 e 90°C , respectivamente.

2.5 Análise cinética

Os fatores de conversão de substrato em polímero ($Y_{P(3HB)/S}$) e substrato em biomassa residual ($Y_{Xr/S}$) foram obtidos a partir do coeficiente angular do gráfico do componente analisado pelo consumo de substrato.

A produtividade foi calculada pela diferença entre a concentração de polímero em um instante t e a concentração inicial de polímero, dividida pelo intervalo de tempo correspondente, ou seja, $\text{produtividade}_{\text{pol}} = (\text{pol}_t - \text{pol}_i) / (t_t - t_i)$. Os dados experimentais foram ajustados pelo software LISSAGE desenvolvido pelo "Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse", França.

3. Resultados e Discussão

Na Figura 1 estão apresentadas as curvas de crescimento de *Ralstonia eutropha* nas culturas realizadas, expressas pelo logaritmo neperiano da biomassa medida pela absorbância ($\ln X/X_0$), para todas as culturas. Através da leitura da absorbância do meio de cultivo, é possível conhecer o crescimento da bactéria durante a cultura para verificar o momento de limitação (início da fase estacionária). As velocidades específicas de crescimento na fase exponencial (μ_{max}), foram determinadas pela regressão linear das curvas de $\ln X/X_0$ e os valores obtidos foram de 0,20; 0,24 e $0,22 \text{ h}^{-1}$, para as culturas sem suplementação, com suplementação de ácido oléico e suplementação de óleo de soja.

Os resultados de biomassa total (X_t), polímero [P(3HB)], biomassa residual [$X_r = X_t - P(3HB)$], nitrogênio residual (NH_4^+) e consumo de açúcar para as culturas realizadas com extrato aquoso obtido a partir do bagaço de maçã, estão apresentados nas Figuras 1a, b e c para os cultivos sem

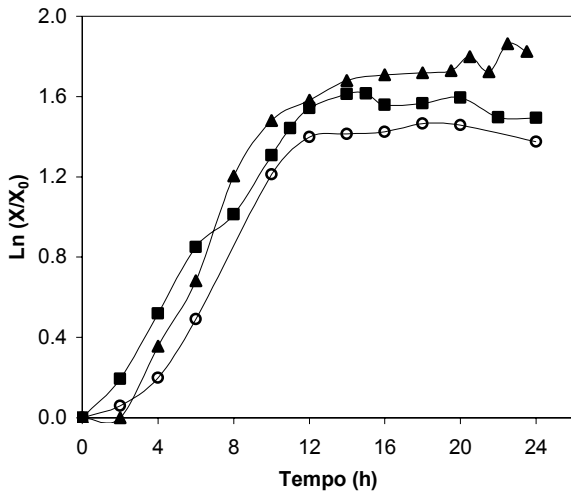


Figura 1: Curvas de crescimento de *R. eutropha* expresso em Ln da absorbância em função do tempo para as culturas sem suplementação (○); suplementado com ácido oléico (▲), suplementado com óleo de soja (■).

suplementação, com suplementação de ácido oléico, e com suplementação óleo de soja, respectivamente. Para que ocorra o acúmulo de PHAs por *R. eutropha*, há a necessidade da limitação de um nutriente essencial para o crescimento celular. O início da fase de produção é marcado pela carência da fonte de nitrogênio, representado pela linha pontilhada (Figura 2).

Um resumo dos dados obtidos nas culturas é apresentado na Tabela 1, onde se observa que a suplementação do meio de cultura com ácido oléico ou óleo de soja favoreceu o acúmulo de P(3HB). Os conteúdos de polímero no total de células secas foram de 14,3; 34,4 e 21,8% para as culturas sem suplementação e com adição de ácido oléico e óleo de soja, respectivamente. A adição dos suplementos nutricionais não só aumentou o conteúdo de polímero no interior das células como também o fator de conversão de substrato em polímero ($Y_{P(3HB)/S}$). Os valores de $Y_{P(3HB)/S}$ encontrados foram 0,14 e 0,08 $g_{P(3HB)} \cdot g_S^{-1}$, para as culturas com suplementação de ácido oléico e óleo de soja, sendo que o primeiro foi quase três vezes maior comparado à cultura sem suplementação (0,05 $g_{P(3HB)} \cdot g_S^{-1}$). O aumento no conteúdo de P(3HB) acumulado, e do fator de conversão de substrato em polímero também foi verificado por Lee *et al.*, 1995). Os autores realizaram a suplementação do meio de cultura com ácido oléico em cultivos com *Escherichia coli* recombinante. Isto pode ser explicado pela disponibilidade de mais acetil-CoA e/ou NADPH para a síntese de P(3HB). Acetil-CoA que normalmente pode ser utilizado para a síntese

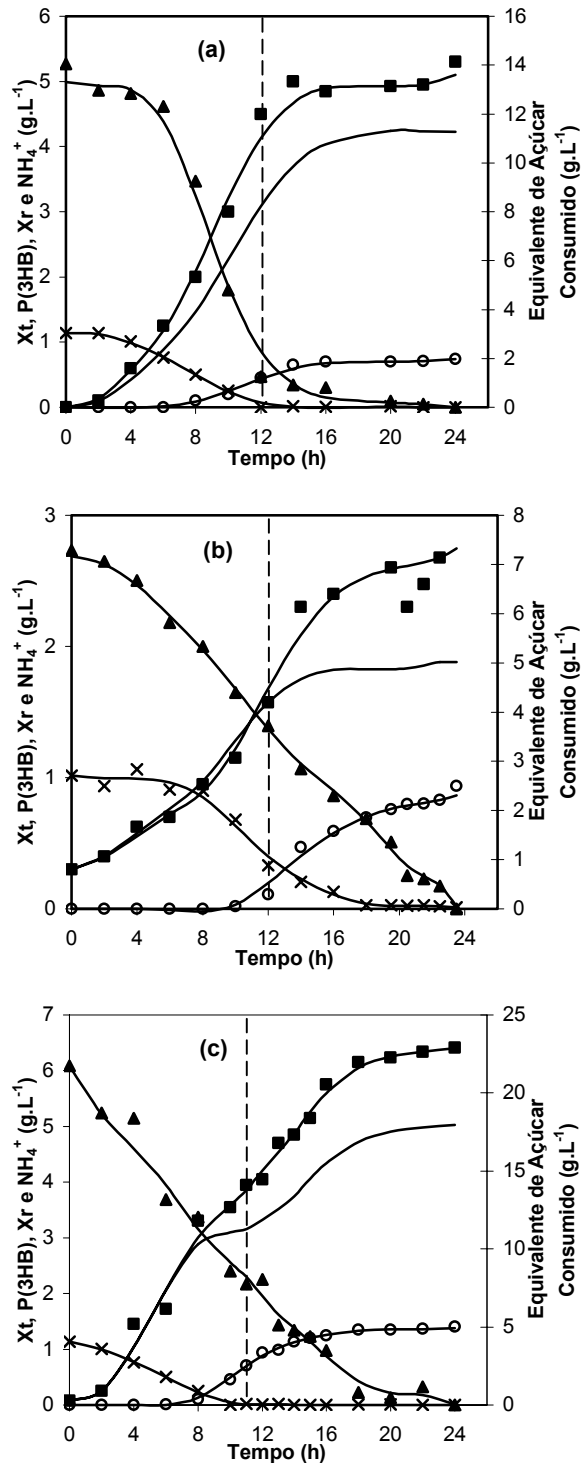


Figura 2: Evolução da biomassa total (■), P(3HB) (○), biomassa residual (—), nitrogênio residual (×) e consumo de açúcar (▲) em função do tempo para as culturas sem suplementação (a); com suplementação de ácido oléico (b); com suplementação de óleo de soja (c). A linha pontilhada indica o início da fase de produção.

Tabela 1: Dados gerais obtidos nas culturas

Culturas	Xt ^a (g.L ⁻¹)	P(3HB) (g.L ⁻¹)	Xr ^b (g.L ⁻¹)	P(3HB) (%)	Y _{P(3HB)/S} ^c	Y _{Xr/S} ^d
Sem suplementação	5,10	0,73	4,37	14,3	0,05	0,29
Suplementação com ácido oléico	2,70	0,93	1,77	34,4	0,14	0,22
Suplementada com óleo de soja	6,41	1,40	5,01	21,8	0,08	0,23

^a Biomassa total^b Biomassa residual [Xr = Xt - P(3HB)]^c Fator de conversão de substrato em P(3HB) (g P(3HB)/g s)^d Fator de conversão de substrato em Xr (g Xr/g s)

de ácidos graxos torna-se disponível para a biossíntese de P(3HB) pela adição de ácido oléico, que fornece estes precursores. Do mesmo modo, mais NADPH pode ser poupado pela adição de ácido oléico, o que é benéfico para a síntese do polímero.

As produtividades de P(3HB) durante toda a cultura e durante a fase de produção foram calculadas e estão apresentadas nas Figuras 3a e b, respectivamente. Embora a cultura suplementada com ácido oléico tenha apresentado maior conteúdo de polímero acumulado e maior fator de conversão de substrato em P(3HB), a cultura com adição de óleo de soja apresentou maiores produtividades, principalmente no início da fase de produção de P(3HB). Em ambas as culturas suplementadas as produtividades foram superiores às encontradas na cultura sem suplementação. As produtividades máximas obtidas foram de 0,09; 0,10 e 0,22 g.L⁻¹.h⁻¹ para as culturas sem suplementação e com suplementações de ácido oléico e óleo de soja, respectivamente.

A busca por substratos alternativos, ou por estratégias de cultivo que otimizem o processo de produção dos PHAs, tem sido o foco de diversas pesquisas. Eggink *et al.*, 1992) foi um dos primeiros autores a utilizar ácido oléico como única fonte de carbono para a produção de P(3HB) por *R. eutropha*. Os autores obtiveram mais de 65% de polímero acumulado, significando quase o dobro do obtido quando utilizados carboidratos como fonte de carbono. Seguindo esta mesma linha, vários autores utilizaram óleos vegetais como substrato para a síntese de PHAs (Fukui e Doi, 1998; Majid *et al.*, 1999; Taguchi *et al.*, 2003; Kahar *et al.*, 2004).

O bagaço de maçã é um subproduto da indústria processadora de maçãs, que vem sendo utilizado principalmente como ração animal. Devido ao fato de conter elevado teor de açúcares redutores caracteriza-se como uma fonte de carbono interessante para o crescimento de microrganismos (Streit, 2004). Assim, seu uso na produção de

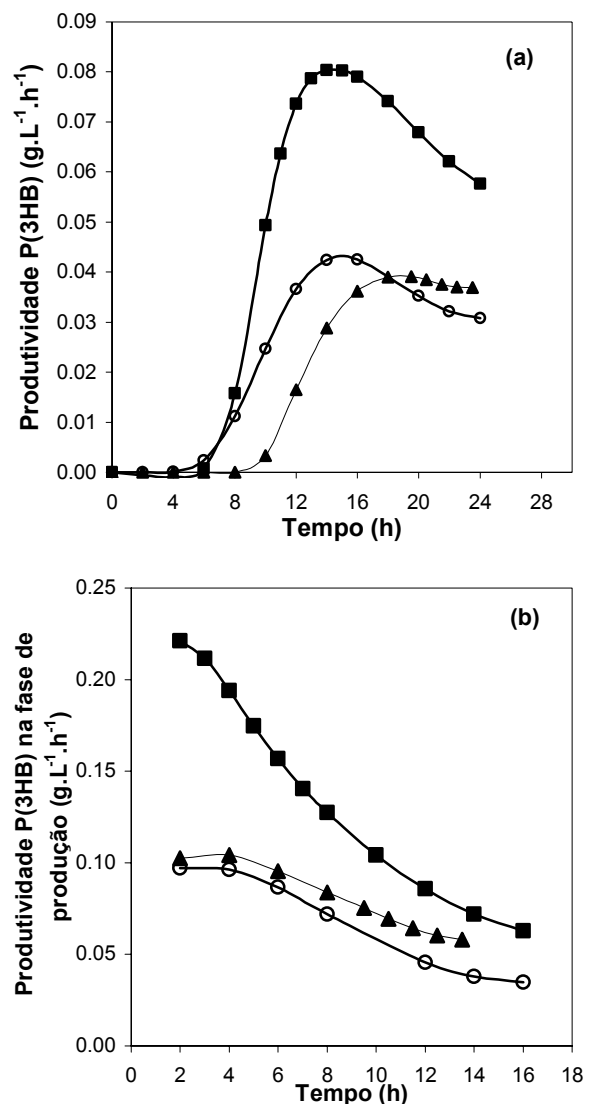


Figura 3: Produtividade de P(3HB) em toda a cultura (a) e na fase de produção (b) para as diferentes culturas: sem suplementação (○); suplementado com ácido oléico (▲), suplementado com óleo de soja (■).

polihidroxiálcanoatos torna-se muito atraente visto que é uma matéria-prima com baixo custo, contribuindo para a redução do preço final destes biopolímeros.

Em um trabalho recente, Lee e Gilmore, (2005) utilizaram resíduo da indústria de sorvetes para a produção de P(3HB). O resíduo consiste do sorvete restante da troca de sabor, tendo em sua composição aproximadamente 10% de gorduras, sendo 65% saturadas, e 20% de açúcares. O cultivo foi realizado com *R. eutropha* H16, obtendo um acúmulo final de 87,9% de P(3HB). Os autores utilizaram um substrato que contém açúcar e ácidos graxos como fonte de carbono. Como já discutido e apresentado, a combinação destas duas fontes de carbono aumenta o fator de conversão de substrato em polímero e o conteúdo de polímero acumulado. O açúcar é metabolizado diretamente pela via glicolítica e os ácidos graxos são obtidos da hidrólise dos triglicérides e metabolizados através da via de β -oxidação dos ácidos graxos.

4. Conclusão

Mostrou-se neste trabalho, que é possível a produção de PHAs utilizando bagaço de maçã como substrato. Embora a quantidade de polímero acumulado tenha sido baixa (14%), através da adição de suplementos nutricionais ao meio de cultura, obteve-se um aumento do conteúdo de P(3HB) acumulado, atingindo os valores de 34% com adição de ácido oléico e 22% com adição de óleo de soja.

A suplementação não apenas favoreceu o aumento do conteúdo de polímero, como a produtividade e o rendimento do processo. Estudos futuros de estratégias de alimentação de nutrientes e suplementos nutricionais, e em maior escala (biorreator) são necessários para se obter maiores quantidades de polímero.

Referências

- Berovic, M. e Ostroversnik, H. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 47-53, 1997.
- Braunegg, G., Lefebvre, G. e Genser, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 65, p. 127-161, 1998.
- Choi, J. e Lee, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 13-21, 1999a.
- Choi, J. e Lee, S. Y. High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4363-4368, 1999b.
- Christen, P., Bramorski, A., Revah, S. e Soccol, C. R. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 211-215, 2000.
- Doi, Y. **Microbial Polyesters**. ed., v. New York: VHC Publishers, Inc., 1990.
- Du, G. C., Chen, J., Yu, J. e Lun, S. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 200-205, 2001.
- Eggink, G., Van Der Wal, H., Huijberts, G. N. M. e De Waard, P. Oleic acid as a substrate for poly-3-hydroxyalkanoate formation in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas putida*. **Industrial Crops and Products**, v. 1, p. 157-163, 1992.
- Fukui, T. e Doi, Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 333-336, 1998.
- Kahar, P., Tsuge, T., Taguchi, K. e Doi, Y. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. **Polymer Degradation and Stability**, v. 83, p. 79-86, 2004.
- Khanna, S. e Srivastava, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607-619, 2005.
- Kim, B. S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 27, p. 774-777, 2000.
- Lee, K. M. e Gilmore, D. F. Formulation and process modeling of biopolymer (polyhydroxyalkanoates: PHAs) production from industrial wastes by novel crossed experimental design. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 229-246, 2005.
- Lee, S. Y., Lee, Y. K. e Chang, H. N. Stimulatory effects of amino acids and oleic acid on poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, p. 177-180, 1995.
- Majid, M. I. A., Akmal, D. H., Few, L. L., Agustien, A., Toh, M. S., Samian, M. R., Najimudin, N. e Azizan, M. N. Production of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Erwinia* sp. USMI-20. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 95-104, 1999.

- Marangoni, C., Furigo Jr, A. e Aragão, G. M. F. Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1635-1638, 2000.
- Marangoni, C., Furigo Jr, A. e Aragão, G. M. F. The influence of substrate source on the growth of *Ralstonia eutropha* aiming at the production of polyhydroxyalkanoate. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18, p. 175-180, 2001.
- Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 426-428, 1959.
- Ramsay, B. A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dubé, B., Bataille, P. e Ramsay, J. Production of poly(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2093-2098, 1990.
- Squio, C. R. e Aragão, G. M. F. Estratégias de cultivo para a produção dos plásticos biodegradáveis (poli3-hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bactérias. **Química Nova**, v. 27, p. 615-622, 2004.
- Squio, C. R., Marangoni, C., Vecchi, C. S. e Aragão, G. M. F. Phosphate feeding strategy during production phase improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) storage by *Ralstonia eutropha*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 257-260, 2003.
- Streit, F. **Estudo do aproveitamento do bagaço de maçã para produção de quitosana fúngica**. Florianópolis, 2004. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina.
- Sudesh, K., Abe, H. e Doi, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 1503-1555, 2000.
- Taguchi, S., Nakamura, H., Kichise, T., Tsuge, T., Yamato, I. e Doi, Y. Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) from renewable carbon sources in recombinant *Ralstonia eutropha* using mutants of original PHA synthase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 107-113, 2003.

4.2.1 Conclusão

O uso de resíduo amiláceo para a produção de P(3HB) mostrou-se muito interessante, visto que a quantidade de polímero acumulada foi de aproximadamente 46%; 50%; 56% para as culturas, sem suplementação, com suplementação de ácido oléico, e com suplementação de óleo de soja, respectivamente. A produção de P(3HB) obtida quando se utilizou bagaço de maçã foi menor quando comparada ao resíduo amiláceo. A quantidade de polímero acumulada foi de 14% e quando se adicionaram os suplementos nutricionais o acúmulo de polímero atingiu 34% com adição de ácido oléico, e 22% com suplementação com óleo de soja.

Como verificado em outros estudos, a suplementação do meio de cultura com ácidos graxos, ou óleos vegetais, aumenta não só o conteúdo de polímero acumulado como também a produtividade e o fator de conversão de substrato em polímero. No resíduo amiláceo, o óleo de soja foi o suplemento que causou um maior aumento no conteúdo de polímero acumulado, enquanto que para o bagaço de maçã a adição de ácido oléico foi melhor.

CAPÍTULO V - CONCLUSÕES E SUGESTÕES

O objetivo deste trabalho foi estudar condições de cultura para diminuição dos custos de produção de polihidroxialcanoatos, utilizando substratos de baixo custo, como resíduos das indústrias de alimentos. Avaliou-se a capacidade de crescimento de *Ralstonia eutropha* em resíduos das indústrias processadoras de maçã e amilácea como fonte de carbono, e modelos matemáticos primários que possam descrever o crescimento da bactéria. Estudou-se também a produção de P(3HB) nestas duas fontes de carbono e o uso de suplementos nutricionais como o ácido oléico e o óleo de soja.

Com os resultados obtidos foi possível concluir que:

- A bactéria *R. eutropha* apresentou capacidade de crescimento nos resíduos da indústria processadora de maçãs (bagaço de maçã) e indústria amilácea. As velocidades específicas máximas de crescimento foram de $0,24 \text{ h}^{-1}$ para o bagaço de maçã e $0,23 \text{ h}^{-1}$ para o resíduo amiláceo, suplementados apenas com as fontes de nitrogênio e fósforo, próximas a encontrada no meio padrão (glicose/frutose) e $0,27 \text{ h}^{-1}$.
- Os três modelos primários de crescimento testados (Gompertz, Gompertz modificado e Logístico) ajustaram-se às curvas de crescimento da bactéria, sendo que o Modelo Logístico apresentou melhores resultados na análise estatística.
- O uso de resíduo amiláceo hidrolisado para a produção de P(3HB) mostrou-se muito interessante, visto que a quantidade de polímero acumulada foi de aproximadamente 46%. O uso de suplementos nutricionais contribuiu para o aumento da quantidade de polímero acumulada e da produtividade.
- Os conteúdos de P(3HB) e produtividade máxima em polímero, obtidos para as culturas, com suplementação de ácido oléico, e com suplementação de óleo de soja foram, respectivamente 50,5% e $0,37 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$; 56,7% e $0,49 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

- A produção de P(3HB) obtida quando se utilizou bagaço de maçã foi menor quando comparada ao resíduo amiláceo. A quantidade de polímero acumulada foi de 14% e quando se adicionaram os suplementos nutricionais o acúmulo de polímero atingiu 34% com adição de ácido oléico, e 22% com suplementação com óleo de soja.

- Como verificado em outros estudos, a suplementação do meio de cultura com ácidos graxos, ou óleos vegetais, aumenta não só o conteúdo de polímero acumulado como também a produtividade e o fator de conversão de substrato em polímero. No resíduo amiláceo, o óleo de soja foi o suplemento que causou um maior aumento no conteúdo de polímero acumulado, enquanto que para o bagaço de maçã a adição de ácido oléico foi melhor.

Baseado nos resultados obtidos, é possível fazer algumas sugestões:

- Estudar um modelo cinético que descreva não só o crescimento celular como o acúmulo de polímero nos resíduos testados.

- Testar o resíduo de alguma indústria amilácea, visto que com o meio sintético obteve-se bons resultados.

- Estudar estratégias de alimentações de nutrientes, como alimentação de fosfato ou nitrogênio na fase de produção de polímero a fim de aumentar o conteúdo acumulado, no caso do resíduo da indústria processadora de maçã.

- Realizar a produção do copolímero, P(3HB-co-3HV), utilizando os resíduos testados como fonte de carbono, e avaliar a quantidade de 3HV produzida.

- Testar outros óleos vegetais e em diferentes concentrações de ácidos graxos, assim como outros suplementos que permitam maiores concentrações de biomassa e conseqüentemente de polímero.

- Estudar o crescimento do microrganismo utilizando óleos vegetais como fonte de carbono principal.

- Testar outros microrganismos que tenham a capacidade de utilizar sacarose como fonte de carbono.

CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMPE, F. **Métabolism du benzoate chez *Alcaligenes eutrophus*: quels mécanismes physiologiques régulent la biodégradation des composés aromatique?** Toulouse, 1995. 237 f. These (Doctorat spécialité: Microbiologie - Biotechnologie) - L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.

ANDERSON, A. J. e DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**, v. 54, p. 450-472, 1990.

ANH, W. S., PARK, S. J. e LEE, S. Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3624-3627, 2000.

ARAGÃO, G. M. F. **Production de polyhydroxyalkanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures.** Toulouse, 1996. 162 f. These (Doctorat spécialité: Biologie et Génétique Moléculaires et Cellulaires - Biotechnologie) - L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.

ARAGÃO, G. M. F., LINDLEY, N. D., URIBELARREA, J. L. e PAREILLEUX, A. Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 937-942, 1996.

BARANYI, J. e ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 277-294, 1994.

BEAULIEU, M., GOULET, J., BEAULIEU, Y., MÉLINARD, J. e PANDIAN, S. Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 165-169, 1995.

BEROVIC, M. e OSTROVERSNIK, H. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 47-53, 1997.

BITAR, A. e UNDERHILL, S. Effect of ammonium supplementation on production of poly-3-hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in batch culture. **Biotechnology Letters**, v. 12, p. 563-568, 1990.

BONONI, A. e SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. v. 2. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001. p. 123-178.

BRANDL, H., GROSS, R. A., LENZ, R. W. e FULLER, R. C. Pseudomonas oleovorans as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1977-1982, 1988.

BRAUNEGG, G., LEFEBVRE, G. e GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 65, p. 127-161, 1998.

BRAUNEGG, G., SONNLEITNER, B. e LAFFERTY, R. M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p. 29-37, 1978.

BUCHANAN, R. L., WHITING, R. C. e DAMERT, W. C. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. **Food Microbiology**, v. 14, p. 313-326, 1997.

BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Trends in Biotechnology**, v. 5, p. 246-250, 1987.

CARVALHO, J. C. M. e SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. v. 2. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001. p. 205-218.

CHOI, J. e LEE, S. Y. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. **Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 335-342, 1997.

CHOI, J. e LEE, S. Y. Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, p. 546-553, 1999a.

CHOI, J. e LEE, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 13-21, 1999b.

CHOI, J. e LEE, S. Y. High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4363-4368, 1999c.

CHRISTEN, P., BRAMORSKI, A., REVAH, S. e SOCCOL, C. R. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 211-215, 2000.

DALGAARD, P. e KOUTSOUMANIS, K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. **Journal of Microbiological Methods**, v. 43, p. 183-196, 2001.

DAWES, E. A. e SENIOR, P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, v. 10, p. 135-266, 1973.

DE SMET, M. J., EGGINK, G., WITHOLD, B. e DAWES, E. A. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. **Journal of Bacteriology**, v. 56, p. 3354-3359, 1983.

DOI, Y. **Microbial Polyesters**. ed., v. New York: VHC Publishers, Inc., 1990.

DOI, Y., KAWAGUCHI, Y., KIM, J. H. e LEBEAULT, J. M. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 103-108, 1992.

DOI, Y., KUNIOKA, M., NAKARUMA, Y. e SOGA, K. Biosynthesis of copolyesters by *Alcaligenes eutrophus* H16 from ¹³C-labelled acetate and propionate. **Macromolecules**, v. 20, p. 2988-2991, 1987.

DOI, Y., TAMAKI, A., KUNIOKA, M. e SOGA, K. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 330-334, 1988.

DU, G. C., CHEN, J., YU, J. e LUN, S. Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 59-65, 2001a.

DU, G. C., CHEN, J., YU, J. e LUN, S. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 200-205, 2001b.

ERKMEN, O. Predictive modelling of *Listeria monocytogenes* inactivation under high pressure carbon dioxide. **LWT - Food Science and Technology**, v. 33, p. 514-519, 2000.

ERKMEN, O. Mathematical modeling of *Escherichia coli* inactivation under high-pressure carbon dioxide. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p. 39-43, 2001.

ERKMEN, O. e ALBEN, E. Mathematical modeling of citric acid production and biomass formation by *Aspergillus niger* in undersized semolina. **Journal of Food Engineering**, v. 52, p. 161-166, 2002.

FERREIRA, L. D. **Utilização da microbiologia preditiva na avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas em presunto fatiado**. Florianópolis, 2004. f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina.

FUKUI, T. e DOI, Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 333-336, 1998.

GANZVELD, K. J., VAN HAGEN, A., VAN AGTEREN, M. H., KONING, W. e UITERKAMP, A. J. M. Upgrading of organic waste: production of the copolymer poly-3-hydroxybutyrate-co-valerate by *Ralstonia eutrophus* with organic waste as sole carbon source. **Journal of Cleaner Production**, v. 7, p. 413-419, 1999.

GOMEZ, J. G. C. e BUENO NETTO, C. L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 17, p. 24-29, 1997.

GOMEZ, J. G. C. e BUENO NETTO, C. L. Produção de poliésteres bacterianos. In: LIMA, U. D. A. **Biotecnologia Industrial**. v. 3. São Paulo: Editora Edgar Blucher, 2001. p. 219-248.

GOSTOMISKI, P. A. e BUNGAY, H. R. Effect of glucose and NH_4^+ levels on poly(3-hydroxybutyrate) production and growth in a continuous culture of *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Progress**, v. 12, p. 234-239, 1996.

GRODZINZKI, J. J. Biomedical application of functional polymers. **Reactive & Functional Polymers**, v. 39, p. 99-138, 1999.

GROTHER, E., MOO-YOUNG, M. e CHISTI, Y. Fermentation optimization for the production of poly(β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 25, p. 132-141, 1999.

HAHN, S. K., CHANG, Y. N., KIM, B. S. e CHANG, H. N. Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of hypochlorite solution and chloroform. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 256-261, 1994.

HAJMEERA, M. e BASHEER, I. Comparison of logistic regression and neural network-based classifiers for bacterial growth. **Food Microbiology**, v. 20, p. 43-55, 2003.

HASSAN, M. A., SHIRAI, Y., KUSUBAYASHI, KARIM, M. I. A., NAKANISHI, K. e HASHIMOTO, K. The production of polyhydroxyalkanoate from anaerobically treated palm oil mill effluent by *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, p. 485-488, 1997.

HAYWOOD, G. W., ANDERSON, A. J. e DAWES, E. A. The importance of PHB-synthase substrate specificity in poly-hydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 57, p. 1-6, 1989.

HOLMES, P. A. Applications of PHB - A microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physical Technology**, v. 16, p. 32-36, 1985.

ISHIZAKI, A., TANAKA, K. e TAGA, N. Microbial production of poly-D-3-hydroxybutyrate from CO₂. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 6-12, 2001.

KAHAR, P., TSUGE, T., TAGUCHI, K. e DOI, Y. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. **Polymer Degradation and Stability**, v. 83, p. 79-86, 2004.

KIM, B. S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 27, p. 774-777, 2000.

KOYAMA, N. e DOI, Y. Continuous production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 281-284, 1995.

LEE, I. Y., KIM, M. K., CHANG, H. N. e PARK, Y. H. Regulation of poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis by nicotinamide nucleotide in *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 131, p. 35-39, 1995a.

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

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

LEE, S. Y. *E. coli* moves into the plastic age. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 17-18, 1997.

LEE, S. Y. e CHANG, H. N. High cell density cultivation of *Escherichia coli* using sucrose as a carbon source. **Biotechnology Letters**, v. 15, p. 971-974, 1993.

LEE, S. Y. e CHANG, H. N. Production of Poly(hydroxyalkanoic acid). **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 52, p. 27-58, 1995.

LEE, S. Y. e CHOI, J. Effect of fermentation performance on the economics of (poly-3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 387-393, 1998.

LEE, S. Y. e CHOI, J. High level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *E. coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4363-4368, 1999.

LEE, S. Y., CHOI, J. e WONG, H. H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 31-36, 1999.

LEE, S. Y., LEE, K. M., CHANG, H. N. e STEINBUCHER, A. Comparison of recombinant *Escherichia coli* strains for synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) and morphological changes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 1337-1347, 1994.

LEE, S. Y., LEE, Y. K. e CHANG, H. N. Stimulatory effects of amino acids and oleic acid on poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, p. 177-180, 1995b.

LIU, F., LI, W., RIDGWAY, D. e GU, T. Production of poly- β -hydroxybutyrate on molasses by recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 345-348, 1998.

LÓPEZ, S., PRIETO, M., DIJKSTRA, J., DHANOA, M. S. e FRANCE, J. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 289-300, 2004.

MADISON, L. L. e HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 21-53, 1999.

MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substratos de baixo custo e ácido propiônico**. Florianópolis, 2000. 191 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina.

MARANGONI, C., FURIGO JR, A. e ARAGÃO, G. M. F. Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1635-1638, 2000.

MARANGONI, C., FURIGO JR, A. e ARAGÃO, G. M. F. The influence of substrate source on the growth of *Ralstonia eutropha* aiming at the production of polyhydroxyalkanoate. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18, p. 175-180, 2001.

MARANGONI, C., FURIGO JR, A. e ARAGÃO, G. M. F. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 137-141, 2002.

MCMEEKIN, T. A. e ROSS, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 133-153, 2002.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 426-428, 1959.

MIYAKE, M., ERATA, M. e ASADA, Y. A thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, capable of accumulating poly- β -hydroxybutyrate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, p. 512-514, 1996.

MOLITORIS, H. P., MOSS, S. T., KONING, G. J. M. e JENDROSSEK, D. Scanning electron microscopy of polyhydroxyalkanoate degradation by bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 1996.

NONATO, R. V., MANTELATTO, P. E. e ROSSELL, C. E. V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 1-5, 2001.

OEDING, V. e SCHLEGEL, H. G. β -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. **Biochemical Journal**, v. 134, p. 239-248, 1973.

PACHIONE, R. Biodegradável: Indústria ensaia os primeiros passos. **Revista Plástico Moderno**. Disponível em: <<http://www.plastico.com.br/revista/pm355/biodegradavel1.htm>>. Acesso em: 15/11/2004.

PAGE, W. J. Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 149-158, 1992.

PAGE, W. J. e KNOSP, O. Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1334-1339, 1989.

PARK, S. J., CHOI, J. e LEE, S. Y. Engineering of *Escherichia coli* fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 36, p. 579-588, 2005.

POIRIER, Y. Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism. **Progress in Lipid Research**, v. 41, p. 131-155, 2002.

POIRIER, Y., DENNIS, D., KLOMPARENS, K. e SOMERVILLE, C. Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. **Science**, v. 256, p. 520-523, 1992.

POIRIER, Y., NAWRATH, C. e SOMERVILLE, C. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers in bacteria and plants. **Biotechnology**, v. 13, p. 142-150, 1995.

POZO, C., MARTÍNEZ-TOLEDO, M. V., RODELAS, B. e GONZÁLEZ-LÓPEZ. Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechín (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source. **Journal of Biotechnology**, v. 97, p. 125-131, 2002.

PREUSTING, H., KINGMA, J. e WITHOLD, B. Physiology and formation of *Pseudomonas oleovorans* in continuous two-liquid-phase cultures. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 13, p. 770-780, 1991.

RAMSAY, B. A., LOMALIZA, K., CHAVARIE, C., DUBÉ, B., BATAILLE, P. e RAMSAY, J. Production of poly(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2093-2098, 1990a.

RAMSAY, J., BERGER, E., VOYER, R., CHAVARIE, C. e RAMSAY, B. A. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. **Biotechnology Techniques**, v. 8, p. 589-594, 1994.

RAMSAY, J., HASSAN, M. A., RAMSAY, B. A. e CHAVARIE, C. Recovery of poly- β -hydroxybutyric acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment. **Biotechnology Techniques**, v. 4, p. 221-226, 1990b.

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

RUAN, W., CHEN, J. e LUN, S. Production of biodegradable polymer by *A. eutrophus* using volatile fatty acids from acidified wastewater. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 295-299, 2003.

RUSENDI, D. e SHEPPARD, J. D. Hydrolysis of potato processing waste for the production of poly- β -hydroxybutyrate. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 191-196, 1995.

RYU, H. W., HAHN, S. K., CHANG, Y. N. e CHANG, H. N. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55, p. 28-32, 1997.

SARIKAYA, E., HIGASA, T., ADACHI, M. e MIKAMI, B. Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 711-715, 2000.

SIM, S. J., SNELL, K. D., HOGAN, S. A., STUBBE, J., RHA, C. K. e SINSKEY, A. J. PHA synthase activity controls the molecular-weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 63-67, 1997.

SQUIO, C. R. **Estratégias de alimentação e utilização de suplementos nutricionais na produção de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha***. Florianópolis, 2003. 161 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina.

SQUIO, C. R., MARANGONI, C., VECCHI, C. S. e ARAGÃO, G. M. F. Phosphate feeding strategy during production phase improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) storage by *Ralstonia eutropha*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 257-260, 2003.

STEINBUCHER, A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: BYROM, D. **Biomaterials: novel materials from biological sources**. v. New York: Stockton, 1991. p. 123-213.

STEINBUCHER, A. e FUCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyesters production. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 419-427, 1998.

STEINBUCHER, A. e LUTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 81-96, 2003.

STEINBUCHER, A. e VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 219-228, 1995.

STREIT, F. **Estudo do aproveitamento do bagaço de maçã para produção de quitosana fúngica**. Florianópolis, 2004. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina.

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

SUZUKI, T., YAMANE, T. e SHIMIZU, S. Kinetics and effect of nitrogen source feeding on production of poly- β -hydroxybutyric acid by fed-batch culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 366-369, 1986.

TANAKA, K., ISHIZAKI, A., KANAMARU, T. e KAWANO, T. Production of poly(D-3-hydroxybutyrate) from CO₂, H₂, and O₂ by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 45, p. 268-275, 1995.

TOBAJAS, M. e GARCIA-CALVO, E. Comparison of analysis methods for determination of kinetic parameters in batch culture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 845-851, 2000.

TSUGE, T. Metabolic improvements and use inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 579-584, 2002.

VANEECHOUTTE, M., KÄMPFER, P., DE BAERE, T., FALSEN, E. e VERSCHRAEGEN, G. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts *et al.* 1990) comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 317-327, 2004.

WACHENHEIM, D. E., PATTERSON, J. A. e LADISCH, M. R. Analysis of the logistic function model: derivation and applications specific to batch cultured microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 157-164, 2003.

WANG, F. e LEE, S. Y. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3703-3706, 1997.

WHITING, R. C. Microbial modeling in foods. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 35, p. 464–494, 1995.

WONG, H. H. e LEE, S. Y. Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 30-33, 1998.

YU, J. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 105-112, 2001.

ZHANG, H., BIAS, V. O., GONYER, K. e DENNIS, D. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1198-1205, 1994.

ANEXOS

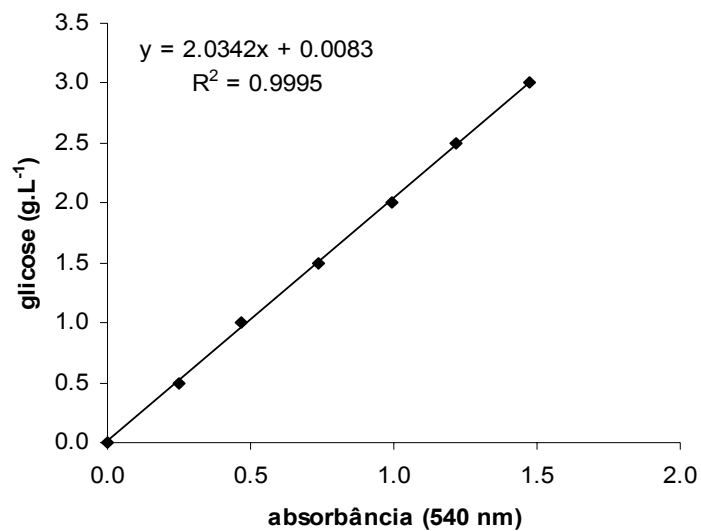


Figura 4: Curva padrão para determinação da concentração de açúcares redutores.

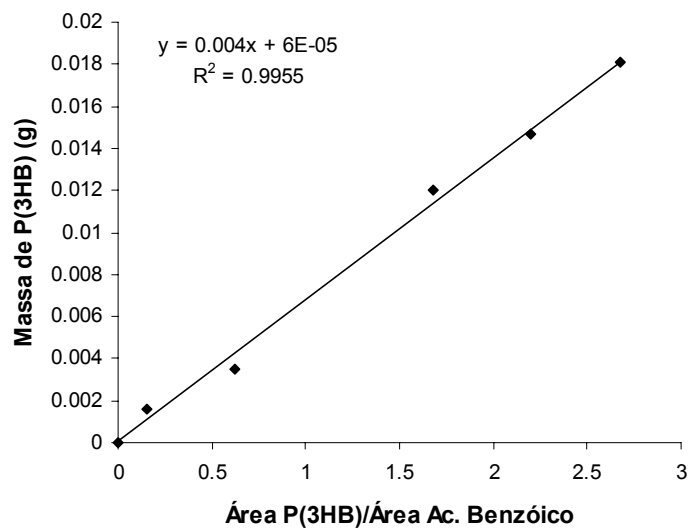


Figura 5: Curva padrão para determinação de P(3HB).

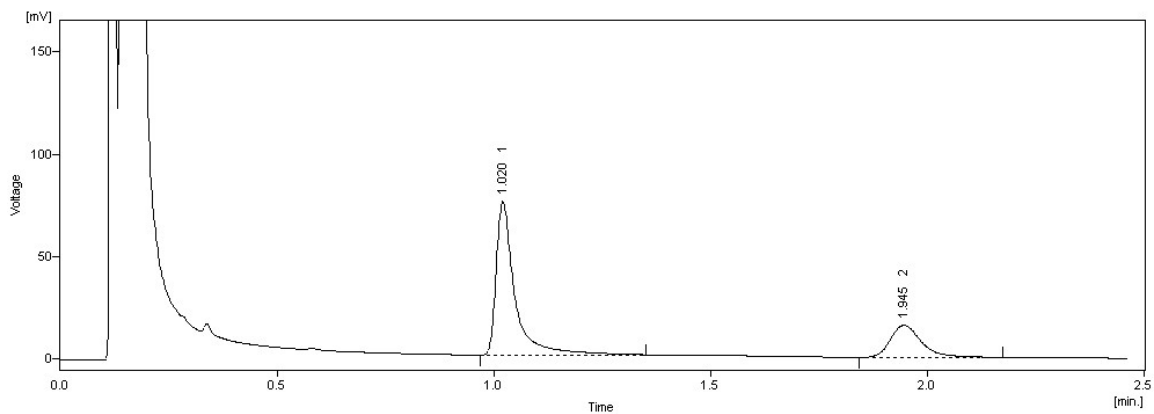


Figura 6: Cromatograma referente a análise de P(3HB).