



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

PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR
***CUPRIAVIDUS NECATOR*, EM BATELADA SEQUENCIAL COM**
RECICLO EXTERNO DE CÉLULAS, E MODELAGEM DO
PROCESSO A PARTIR DA ANÁLISE DE FLUXOS
METABÓLICOS

MÉLODI SCHMIDT

FLORIANÓPOLIS
2015

Mélodi Schmidt

**PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR
CUPRIAVIDUS NECATOR, EM BATELADA SEQUENCIAL COM
RECICLO EXTERNO DE CÉLULAS, E MODELAGEM DO
PROCESSO A PARTIR DA ANÁLISE DE FLUXOS
METABÓLICOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de doutor em Engenharia de Alimentos.

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

Coorientador: Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Schmidt, Mélodi

Produção de polihidroxialcanoatos por *Cupriavidus necator*, em baletada sequencial com reciclo externo de células, e modelagem do processo a partir da análise de fluxos metabólicos / Mélodi Schmidt ; orientadora, Gláucia Maria Falcão de Aragão ; coorientador, Willibaldo Schmidell. - Florianópolis, SC, 2015.
226 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Produção de polihidroxialcanoatos. 3. Reciclo externo de células. 4. Modelagem metabólica. I. Aragão, Gláucia Maria Falcão de. II. Schmidell, Willibaldo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**“PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR
CUPRIAVIDUS NECATOR, EM BATELADA SEQUENCIAL COM
RECICLO EXTERNO DE CÉLULAS, E MODELAGEM DO
PROCESSO A PARTIR DA ANÁLISE DE FLUXOS
METABÓLICOS”**

Por

Mélodi Schmidt

Tese julgada para obtenção do Título de Doutor em Engenharia de Alimentos, área de Concentração de Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.



Florianópolis, 02 de outubro de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais
que sempre acreditaram em mim e me
apoiaram em todas as decisões.

AGRADECIMENTOS

Diversas pessoas contribuíram de forma direta ou indireta para que este trabalho se tornasse possível. Gostaria de agradecer:

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos por ter me proporcionado a oportunidade de desenvolver este trabalho.

À CAPES, pelo aporte financeiro através de bolsa de estudos tanto no período realizado no Brasil, quanto no período de Doutorado sanduíche na França.

Ao Instituto Nacional de Ciências Aplicadas (INSA de Toulouse - Fr) por ter aberto suas portas para realização do Doutorado sanduíche.

Aos professores e pesquisadores José Gregório Cabrera Gomez, Diogo Ardaillon Simões, Jaciane Lutz Ienczak, Luismar Marques Porto e Agenor Furigo Júnior por terem aceitado avaliar este trabalho e por tê-lo engrandecido com suas sugestões.

À Gláucia, por ter aceitado me orientar e se empenhado muito para a concretização deste trabalho. Foram inúmeros momentos de conversas e ensinamentos, tanto no âmbito profissional quanto pessoal. Com o passar do tempo você se tornou muito mais do que minha orientadora, e é muito bom saber que posso contar contigo!

Ao Willi, que sempre teve muita paciência e contribuiu muito com seu vasto conhecimento durante a realização deste trabalho, e que sempre tinha uma história interessante para contar.

Ao professor Jean-Louis, que aceitou me orientar durante o período sanduíche, não mediu esforços para que eu fosse capaz de desenvolver um modelo baseado na bioquímica do processo (que até este momento era um total desconhecido para mim) e foi muito compreensivo com as minhas dificuldades no francês.

Foi um experiência extremamente gratificante ter a oportunidade de trabalhar com estes três maravilhosos profissionais, que me mostraram que se você realmente ama o que faz, você é capaz de obter ótimos resultados, e o cansaço acaba por ser um pequeno efeito colateral. Vocês serão meus eternos exemplos de profissionalismo!

Ao grupo PHB: Jaci, Kelin, Kellen e Pâmela, por todos os momentos de incentivo, as longas conversas, o auxílio na execução dos experimentos e os ensinamentos trocados. Aos alunos de iniciação científica que passaram pelo grupo, Will, Fran, Lauren, Thais, Caetano, Eduardo, Nathália, Hélia, Déia, Jorge, Murilo e Camila, vocês foram simplesmente fundamentais!

A toda equipe do INSA de Toulouse que me recebeu de braços abertos, especialmente à Rana e ao Carlos que foram meus companheiros estrangeiros e tornaram meus dias mais alegres.

À Martina e ao Daniel que se tornaram, de certa forma, minha família no período que passei na França.

Às professoras Regina Vasconcelos Antônio e Débora de Oliveira por terem cedido seus equipamentos e tornado a quantificação dos PHAs possível. Ao professor Luismar Marques Porto que sempre nos salvou quando alguma peça do reator deu problema.

À Denise, que sempre esteve presente e disposta a auxiliar em todos os problemas que surgiam no laboratório. Muito obrigada pela paciência e dedicação!

Aos colegas do ENGEBIO, os quais não citarei nomes para não deixar ninguém de fora, obrigada pelos momentos de descontração, pelas conversas e por dividir as angustias e as conquistas do dia-a-dia. Vou sentir muita falta da hora do café!

A todos os amigos que me apoiaram ao longo destes quatro anos e meio. De forma especial à Naira e a Ieda que me acompanham a mais de 10 anos e a Kelin e a Kellen que se tornaram muito mais do que colegas de grupo. A distância pode nos separar, mas o carinho que sinto por vocês vai ser sempre o mesmo!

Ao André, que foi essencial neste período. Passou comigo por todos os piores e melhores momentos, nunca me deixou desanimar e sempre soube como me arrancar um sorriso.

Aos meus pais que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em todas as decisões, mesmo que isso significasse ficar longe. Vocês são e serão para sempre meus pilares de sustentação e meus exemplos de honestidade, caráter e superação!

À minha irmã que me aguenta todos os dias e não deve mais suportar me ouvir falar sobre PHB. Obrigada por estar sempre do meu lado e por ter me dado a sobrinha canina mais linda e preguiçosa!

RESUMO

Os Polihidroxialcanoatos (PHAs), com destaque para o Poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) e o Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (P(3HB-co-3HV)), são poliésteres biodegradáveis, produzidos intracelularmente por muitos microrganismos. A bactéria *Cupriavidus necator* destaca-se por ser capaz de acumular mais de 80 % de sua massa seca em polímero e assimilar diferentes fontes de carbono. O custo de produção desses polímeros ainda é elevado e a utilização de substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais, aparece como alternativa para diminuição dos custos. Resíduos agroindustriais, entretanto, apresentam baixa ou moderada concentração de carbono, exigindo estratégias de cultivo como a batelada sequencial com reciclo externo de células para garantir a obtenção de processos com alta produtividade. Modelos estruturados, que levam em conta as reações metabólicas envolvidas no processo, têm tido utilização destacada em processos biotecnológicos como uma ferramenta na predição de condições de cultivo que maximizem a produção do produto. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV), por *C. necator*, utilizando substrato com baixa concentração de glicose e adição de ácido propiônico, em cultivos realizados em batelada sequencial com reciclo externo de células, conduzidos sob exaustão ou limitação de nitrogênio ao longo da fase de produção. Além disso, pretendeu-se desenvolver e validar um modelo fenomenológico estruturado, baseado na Análise de Fluxos Metabólicos (AFM), para auxiliar na compreensão do comportamento metabólico de *C. necator* e obter condições de processo que maximizem a produção de P(3HB), a partir de glicose, no sistema com reciclo externo de células. Os resultados mostraram que a alimentação de nitrogênio em concentração limitante durante a fase de produção, no sistema batelada sequencial com reciclo externo de células, aumentou a produtividade do processo, frente aos resultados obtidos a partir da exaustão de nitrogênio durante a fase de produção neste mesmo sistema. Na produção de P(3HB-co-3HV), verificou-se que a relação entre as unidades 3HV/3HB aumentou ao longo de toda a fase de produção. O modelo fenomenológico foi construído a partir de 17 metabólitos chave e 15 reações estequiométricas. Equações que descrevem a inibição pela concentração inicial de glicose e nitrogênio foram também consideradas no modelo. O modelo foi validado para diferentes estratégias de cultivo: batelada, batelada alimentada, batelada sequencial com e sem reciclo de células e alimentação de nitrogênio na fase de produção. Um cultivo em modo

batelada sequencial com reciclo externo de células, alimentação de nitrogênio na fase de produção e concentrações iniciais de substrato não inibitórias foi realizado. A produtividade volumétrica ($1,35 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi 35 % superior à obtida por Ienczak et al. (2015) que utilizaram sistema em batelada sequencial com reciclo de células. Estes resultados mostraram que a estratégia proposta no presente trabalho é eficiente na obtenção de alta densidade celular ($86,3 \text{ g}_{\text{xt}}.\text{L}^{-1}$) e produtividade de processo, e que o modelo fenomenológico estruturado desenvolvido pode ser muito útil na predição de condições de maximização da produção de P(3HB) por *C. necator*, a partir de glicose.

Palavras-chave: Poli(3-hidroxiбутирато), Poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiуалерато), *Cupriavidus necator*, Reciclo externo de células, Análise de Fluxos Metabólicos, Modelos estruturados.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs), highlighting the Poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB)) and the Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P(3HB-co-3HV)), are biodegradable polyesters produced intracellularly by many microorganisms. The bacterium *Cupriavidus necator* stands out due its ability to accumulate more than 80 % of its dry mass in polymer and, assimilate different carbon sources. These biopolymers present high production cost and the utilization of low cost substrates, as agroindustrial wastes, is an alternative to reduce this cost. However, the agroindustrial wastes present moderate or low carbon concentration, requiring culture strategies as the repeated batch with external cell recycle to ensure the achievement of high process productivity. Structured models, which take into account the metabolic reactions involved in the process, have been largely applied in biotechnological process as a tool in predicting culture conditions that can maximize the product production. The aim of the present work was to evaluate the P(3HB) and P(3HB-co-3HV) production, by *C. necator*, using substrate with low glucose concentration and propionic acid addition, in repeated batch cultures with external cell recycle, conducted in exhaustion or limitation of nitrogen during the production phase. Also, it was intended to develop and to validate a structured phenomenological model, based in the Metabolic Flux Analysis (MFA), to help in the comprehension of the metabolic behavior of *C. necator* and in obtaining process conditions that maximize the P(3HB) production, from glucose, in the system with external cell recycle. The results showed that the limited nitrogen feeding during the production phase, in the repeated batch system with external cell recycle, increased the process productivity, compared to the results obtained from the nitrogen exhaustion during the production phase in the same system. In the P(3HB-co-3HV) production, it was verified that the relation between the 3HV/3HB units increased during all the production phase. The phenomenological model was built considering 17 key metabolites and 15 stoichiometric reactions. Equations that can describe the growth inhibition by the initial concentration of glucose and nitrogen were also considered in the model. The model was validated to different culture strategies: batch, fed batch, repeated fed batch with or without cell recycle and nitrogen feeding during the production phase. One repeated batch culture with external cell recycle, nitrogen feeding during the production phase, and not inhibitory initial glucose and nitrogen concentrations, was

performed. The volumetric productivity ($1.35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) obtained was 35 % higher than the results reported by Ienczak et al. (2015), which applied a repeated batch system with external cell recycle. These results showed that the strategy proposed in the present work is efficient in obtaining high cell density ($86.3 \text{ g}_{\text{Xt}}\cdot\text{L}^{-1}$) and process productivity, and, the phenomenological model developed can be useful in predicting conditions that maximize the P(3HB) production by *C. necator*, from glucose.

Keywords: Poly(3-hydroxybutyrate), Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), *Cupriavidus necator*, External cell recycle, Metabolic Flux Analysis, Structured models.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1: Estrutura geral dos PHAs para diferentes monômeros. 46
- Figura 2.2: Catabolismo dos carboidratos em *C. necator* - Em cinza a via Entner-Doudoroff e suas enzimas: EDD, gliconato-6-fosfato desidratase; EDA, 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato aldolase; (*) a existência desta via ainda não foi comprovada (GND, gliconato-6P-desidrogenase); Nomenclatura das demais enzimas em cinza: HK, hexoquinase; GK, hexoquinase; PGI, fosfoglicose isomerase; G6PD, glicose-6-fosfato desidrogenase; FBPA, frutose bifosfato aldolase; FBPP, frutose bifosfato fosfatase; G3PD, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PGK, fosfoglicerato quinase; PGM, fosfoglicerato mutase; ENO, enolase; PK, piruvato quinase; PDH, piruvato desidrogenase; abreviação PPP para a via das pentoses fosfato, TCA para via do ácido cítrico e PTS para o sistema de transporte da fosfotransferase; NagC, proteína da membrana externa (porina), NagE, proteína do sistema açúcar fosfotransferase (presente na membrana), NagF, proteína do sistema açúcar fosfotransferase (presente no citosol).
..... 52
- Figura 2.3: Assimilação do Propionil-CoA pela β -oxidação. As enzimas envolvidas na reação são acil-CoA desidrogenase (1), enoil-CoA hidratase (2), 3-hidroxiubutiril-CoA hidrolase (3), 3-hidroxipropanoato desidrogenase (4) e metilmalonato semialdeído desidrogenase (5). As enzimas 3 e 4 não foram identificadas para *C. necator*..... 53
- Figura 2.4: Esquema da via de assimilação do ácido propiônico em *C. necator* (considerando apenas o ciclo do metil citrato). Em cinza as enzimas envolvidas nas diferentes vias, sendo: PK, piruvato quinase e PDH, piruvato desidrogenase. Abreviação MCC para a via do ciclo do metil-citrato e TCA para via do ciclo do ácido cítrico. 54
- Figura 2.5: Esquema da cadeia respiratória em *Cupriavidus necator*... 55
- Figura 2.6: Biossíntese de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) por *Cupriavidus necator*..... 57
- Figura 2.7: Evolução da velocidade específica de produção (q_p) em função da variação da velocidade específica de crescimento (μ_{xT}) inferiores a $0,008 \text{ h}^{-1}$ (a) e entre $0,02$ e $0,2 \text{ h}^{-1}$ (b)..... 59

Figura 2.8: Representação de uma matriz metabólica S , em que o termo s_{ij} representa o coeficiente estequiométrico do composto x_i na reação r_j	67
Figura 2.9: Equação do balanço mássico escrita sob forma matricial...	69
Figura 3.1: Exemplo de curva padrão obtida após metanólise e utilizada para quantificação de PHA por cromatografia gasosa. Unidades de HB (○) e unidades HV (●).....	81
Figura 3.2: Esquema de um sistema reacional homogêneo.	83
Figura 3.3: Ilustração para explicar o método dinâmico utilizado para determinar $k_{L,a}$ e QO_2	88
Figura 4.1: Descrição das etapas e cultivos realizados para cada parte do presente trabalho	90
Figura 4.2: Correlação entre a DO_{600} e a concentração de biomassa por gravimetria	92
Figura 4.3: Esquema ilustrativo do aparato experimental utilizado para os cultivos visando a produção de PHA por <i>C. necator</i> a partir da alimentação com substrato contendo moderada concentração da fonte de carbono.....	94
Figura 4.4: Evolução da biomassa total (X_t (●)), P(3HB) (▲), biomassa residual (X_r (—)) e proteína (◇) para o cultivo visando a produção de P(3HB) com exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de produção com reciclo de células. As linhas contínuas representam os ajustes aos dados experimentais realizados com auxílio do <i>software</i> Lissage. A linha pontilhada representa o momento da limitação da fonte de nitrogênio ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$).....	97
Figura 4.5: (a) Concentração de glicose (▲) e de nitrogênio (○); (b) Evolução da velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ_{X_r} (—)) e de produção de P(3HB) (q_p (---)) ao longo do tempo para o cultivo visando a produção de P(3HB) com exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. A flecha indica o momento da limitação da fonte de nitrogênio ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$).	98
Figura 4.6: Evolução da velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2 (●)), coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_{L,a}$ (▲)), biomassa residual (X_r (—)) e velocidade específica de crescimento celular (μ_{X_r} (---)) ao longo do tempo para o cultivo visando	

a produção de P(3HB) com exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. As linhas contínuas representam um ajuste aos dados experimentais. 100

Figura 4.7: Dados de biomassa total (X_t (●)), P(3HB) (▲), biomassa residual (X_r (—)) e proteína (◇) para o cultivo visando a produção de P(3HB) com limitação da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. As linhas contínuas representam os ajustes aos dados experimentais realizados com auxílio do *software* Lissage. A linha pontilhada representa o momento da limitação da fonte de nitrogênio ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$). 102

Figura 4.8: (a) Concentração de glicose (▲) e de nitrogênio (○); (b) Evolução da velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ_{Xr} (—)) e de produção de P(3HB) (q_p (---)) ao longo do tempo para o cultivo visando a produção de P(3HB) com limitação da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. A flecha indica o momento da limitação da fonte de nitrogênio ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$). 103

Figura 4.9: Correlação entre q_p e μ_{Xr} para os cultivos conduzidos em exaustão da fonte de nitrogênio (▲) e em limitação da fonte de nitrogênio (○) durante a fase de produção. 105

Figura 4.10: Evolução da velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2 (●)), coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La} (▲)), biomassa residual (X_r (—)) e velocidade específica de crescimento celular (μ_{Xr} (---)) ao longo do tempo para o cultivo visando a produção de P(3HB) com limitação da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. As linhas contínuas representam o ajuste aos dados experimentais. 107

Figura 4.11: (a) Dados de biomassa total (X_t (●)), P(3HB-co-3HV) (▲), biomassa residual (X_r (—)) e proteína (◇); (b) Evolução da produção de P(3HB-co-3HV) (▲), unidades (3HB) (◇) e 3HV (●) para o cultivo visando a produção de P(3HB-co-3HV) com exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. As linhas contínuas representam os ajustes aos dados experimentais realizados com auxílio do *software* Lissage. A linha pontilhada representa o momento da limitação da fonte de nitrogênio ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$). 108

Figura 4.12: (a) Concentração de glicose (▲) e de nitrogênio (○); (b) Evolução da velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ_{Xr} (—)) e de produção de P(3HB-co-3HV) (q_p (---)) ao longo do

tempo para o cultivo visando a produção de P(3HB-co-3HV) com exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. A flecha indica o momento da limitação da fonte de nitrogênio ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$)...... 110

Figura 4.13: Evolução da velocidade específica de consumo de oxigênio (Q_{O_2} (●)), coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$ (▲)), biomassa residual (X_r (—)) e velocidade específica de crescimento (μ_{X_r} (---)) ao longo do tempo para o cultivo visando a produção de P(3HB-co-3HV) com exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. As linhas contínuas representam o ajuste aos dados experimentais..... 111

Figura 4.14: (a) Dados de biomassa total (X_t (●)), P(3HB-co-3HV) (▲), biomassa residual (X_r (—)) e proteína (\diamond); (b) Evolução da produção de P(3HB-co-3HV) (▲), unidades 3HB (\diamond) e 3HV (●) para o cultivo visando a produção de P(3HB-co-3HV) com limitação da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. As linhas contínuas representam os ajustes aos dados experimentais realizados com auxílio do *software* Lissage. A linha pontilhada representa o momento da limitação de nitrogênio ($0,1 \text{ g}_N.L^{-1}$). 113

Figura 4.15: (a) Concentração de glicose (▲) e de nitrogênio (○); (b) Evolução da velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ_{X_r} (—)) e de produção de P(3HB-co-3HV) (q_p (---)) ao longo do tempo para o cultivo visando a produção de P(3HB-co-3HV) com limitação da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. A flecha indica o momento da limitação da fonte de nitrogênio ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$)...... 115

Figura 4.16: Evolução da velocidade específica de consumo de oxigênio (Q_{O_2} (●)), coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$ (▲)), biomassa residual (X_r (—)) e velocidade específica de crescimento (μ_{X_r} (---)) ao longo do tempo para o cultivo visando a produção de P(3HB-co-3HV) com limitação da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. As linhas contínuas representam o ajuste aos dados experimentais..... 116

Figura 4.17: Correlação entre a velocidade específica de produção de P(3HB-co-3HV) (q_p) e a velocidade específica de crescimento (μ_{X_r}) para as culturas em exaustão (▲) e alimentação de nitrogênio (○), durante a fase de produção. 117

Figura 4.18: Relação entre a incorporação de unidades 3HV e 3HB durante a fase de produção para as culturas conduzidas em exaustão de

nitrogênio (\circ) e limitação de nitrogênio (Δ) durante a fase de produção.
..... 117

Figura 4.19: Fator de conversão de glicose em Xt ($Y_{Xt/G}$) (a), glicose em Xr ($Y_{Xr/G}$) (b) e glicose em P(3HB) ($Y_{P/G}$) (c) ((\bullet) fase de crescimento, (\circ) fase de produção em (b) e (c)) para o cultivo batelada sequencial com reciclo de células e exaustão de nitrogênio durante a fase de produção de P(3HB). 120

Figura 4.20: Fator de conversão de glicose em Xt ($Y_{Xt/G}$) (a), glicose em Xr ($Y_{Xr/G}$) (b) e glicose em P(3HB) ($Y_{P/G}$) (c) ((\bullet) fase de crescimento, (\circ) fase de produção em (b) e (c)) para o cultivo batelada sequencial com reciclo de células e alimentação de nitrogênio durante a fase de produção de P(3HB). 121

Figura 4.21: Fator de conversão de glicose em Xt ($Y_{Xt/G}$) (a), glicose em Xr ($Y_{Xr/G}$) (b) e glicose em PHA ($Y_{Pr/G}$) (c) ((\bullet) fase de crescimento, (\circ) fase de produção em (b) e (c)) para o cultivo batelada sequencial com reciclo de células e exaustão de nitrogênio durante a fase de produção de P(3HB-*co*-3HV). 122

Figura 4.22: Fator de conversão de glicose em Xt ($Y_{Xt/G}$) (a), glicose em Xr ($Y_{Xr/G}$) (b) e glicose em PHA ($Y_{Pr/G}$) (c) ((\bullet) fase de crescimento, (\circ) fase de produção em (b) e (c)) para o cultivo batelada sequencial com reciclo de células e alimentação de nitrogênio durante a fase de produção de P(3HB-*co*-3HV). 123

Figura 4.23: Fator de conversão de nitrogênio em Xr ($Y_{Xr/N}$) (a) e fósforo em Xr ($Y_{Xr/P}$) (b) para o cultivo com reciclo de células e exaustão de nitrogênio durante a fase de produção de P(3HB): (\bullet) fase de crescimento. 124

Figura 4.24: Fator de conversão de nitrogênio em Xr ($Y_{Xr/N}$) (a) e fósforo em Xr ($Y_{Xr/P}$) (b) para o cultivo com reciclo de células e alimentação de nitrogênio durante a fase de produção de P(3HB): fase de crescimento (\bullet) e produção (\circ). 125

Figura 4.25: Fator de conversão de nitrogênio em Xr ($Y_{Xr/N}$) (a) e fósforo em Xr ($Y_{Xr/P}$) (b) para o cultivo com reciclo de células e exaustão de nitrogênio durante a fase de produção de PHA (\bullet) fase de crescimento. 126

Figura 4.26: Fator de conversão de nitrogênio em Xr ($Y_{Xr/N}$) (a) e fósforo em Xr ($Y_{Xr/P}$) (b) para o cultivo com reciclo de células e

alimentação de nitrogênio durante a fase de produção de PHA: fase de crescimento (●) e de produção (○)..... 126

Figura 4.27: Esquema das etapas envolvidas no desenvolvimento de um modelo fenomenológico, baseado na Análise de Fluxos Metabólicos. 131

Figura 4.28: Rede metabólica resumida para produção de P(3HB) por *C. necator*, a partir de glicose considerando 17 intermediários metabólicos e 15 reações (q). As flechas em pontilhado representam os intermediários metabólicos que são precursores de Xr..... 132

Figura 4.29: Relações estequiométricas consideradas na rede metabólica simplificada para produção de P(3HB) por *C. necator*, a partir de glicose. A estequiometria da biomassa é dada em mol.g_{Xr}⁻¹..... 139

Figura 4.30: Matriz estequiométrica considerada no modelo fenomenológico para produção de P(3HB) por *C. necator*, a partir de glicose. Os coeficientes estequiométricos da biomassa apresentam unidade de mol.g_{Xr}⁻¹..... 140

Figura 4.31: (a) Dados experimentais obtidos por Aragão (1996) para a relação entre a velocidade específica de produção de P(3HB) (q_P) em função da porcentagem de P(3HB) intracelular para *C. necator*, utilizando glicose como fonte de carbono; (b) Dados experimentais obtidos por Aragão (1996) (●), ajuste da equação proposta aos dados experimentais (—), equação de ajuste proposta e valores dos parâmetros utilizados na equação (P_{crit} e k_{P(3HB)}). 143

Figura 4.32: Representação do comportamento das equações de ativação e inibição frente a concentração dos metabólitos para a reação q1. (a) Ativação por glicose, (b) inibição por glicose-6P e (c) inibição por NADH..... 146

Figura 4.33: Representação do comportamento das equações de ativação e inibição frente a concentração dos metabólitos para a reação q2. (a) Ativação por glicose-6P e (b) inibição por NADPH..... 146

Figura 4.34: Representação do comportamento das equações de ativação e inibição frente a concentração dos metabólitos para a reação q3. (a) Ativação por triose-P e (b) inibição por NADPH. 147

Figura 4.35: Representação do comportamento da equação de ativação pela concentração de triose-P para a reação q4. (a) e de ativação pela concentração de piruvato para a reação q5 (b)..... 147

Figura 4.36: Representação do comportamento das equações de ativação e inibição frente a concentração dos metabólitos para a reação q6. (a) Ativação por Acetil-CoA, (b) inibição por NADH, (c) ativação por oxaloacetato e (d) inibição por NADPH.	148
Figura 4.37: Representação do comportamento das equações de ativação e inibição frente a concentração dos metabólitos para a reação q7. (a) Ativação por Acetil-CoA e (b) ativação por NADPH.	149
Figura 4.38: Representação do comportamento da equação de ativação pela concentração de isocitrato para as reações q8. (a) e q9 (b).	149
Figura 4.39: Representação do comportamento da equação de ativação pela concentração de α -cetoglutarato para a reação q10. (a) e ativação pela concentração de NADPH para a reação q11 (b).	150
Figura 4.40: Representação do comportamento das equações de ativação e inibição frente a concentração dos metabólitos para a reação q12. (a) Ativação por NADH e (b) ativação por O ₂	150
Figura 4.41: Representação do comportamento da equação de ativação frente a concentração de ATP para a reação q13.	151
Figura 4.42: Representação do comportamento das equações de ativação e inibição frente a concentração dos metabólitos para a reação q14. (a) Ativação por piruvato e (b) inibição por oxaloacetato.	151
Figura 4.43: Representação do comportamento das equações de ativação e inibição frente a concentração dos metabólitos para a reação q15. (a) Inibição por ATP, (b) ativação por O ₂ , (c) ativação por NH ₃ e (d) ativação por S.	152
Figura 4.44: Resultados cinéticos obtidos pela simulação de um cultivo batelada para produção de P(3HB) por <i>C. necator</i> a partir de glicose, com exaustão de nitrogênio na fase de produção: (a) X _t , P(3HB) e X _r (g.L ⁻¹); (b) glicose e nitrogênio (g.L ⁻¹); (c) oxigênio dissolvido (mgO ₂ .L ⁻¹); (d) velocidade específica de crescimento (μ_{X_r} (h ⁻¹)), velocidade específica de produção de P(3HB) (q_p (g _{Pr} .g _{X_r} ⁻¹ .h ⁻¹) e velocidade específica de consumo de glicose (q_{glic} (g _{glic} .g _{X_r} ⁻¹ .h ⁻¹)); (e) concentração dos metabólitos intracelulares (mol.g _{X_r} ⁻¹); (f) concentração intracelular de ATP, NADH e NADPH (mol.g _{X_r} ⁻¹); (g) e (h) velocidades específicas reacionais (q (mol.g _{X_r} ⁻¹ .h ⁻¹)).	154

Figura 4.45: Resultados cinéticos obtidos pela simulação de um processo em batelada para produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose, com limitação em oxigênio e exaustão de nitrogênio na fase de produção: (a) Xt, P(3HB) e Xr (g.L⁻¹); (b) glicose e nitrogênio (g.L⁻¹); (c) oxigênio dissolvido (mgO₂.L⁻¹); (d) velocidade específica de crescimento (μ_{Xr} (h⁻¹)), velocidade específica de produção de P(3HB) (q_P (g_{Pr}.g_{Xr}⁻¹.h⁻¹) e velocidade específica de consumo de glicose (q_{glic} (g_{glic}.g_{Xr}⁻¹.h⁻¹)); (e) concentração dos metabólitos intracelulares (mol.g_{Xr}⁻¹); (f) concentração intracelular de ATP, NADH e NADPH (mol.g_{Xr}⁻¹); (g) e (h) velocidades específicas reacionais (q (mol.g_{Xr}⁻¹.h⁻¹)). ... 156

Figura 4.46: Resultados obtidos pela predição do modelo fenomenológico comparados aos dados experimentais para um processo em modo batelada para produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose, com exaustão de nitrogênio na fase de produção: (a) Xt (●), P(3HB) (▲) e Xr (◇) (g.L⁻¹); (b) glicose (■) e nitrogênio (○) (g.L⁻¹); (c) velocidade específica de crescimento (μ_{Xr} (x) (h⁻¹)), velocidade específica de produção de P(3HB) (q_P (○) (g_{Pr}.g_{Xr}⁻¹.h⁻¹)). As linhas contínuas representam a predição do modelo. 159

Figura 4.47: Resultados obtidos pela predição do modelo fenomenológico e experimentalmente para um processo em modo batelada sequencial com reciclo externo de células para produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose, com exaustão de nitrogênio na fase de produção: (a) Xt (● ; ---), P(3HB) (▲ ; ...) e Xr (◇ ; —) (g.L⁻¹); (b) glicose (■ ; ---) e nitrogênio (○ ; —) (g.L⁻¹); (c) velocidade específica de crescimento (μ_{Xr} (x ; —) (h⁻¹)), velocidade específica de produção de P(3HB) (q_P (○ ; ---) (g_{Pr}.g_{Xr}⁻¹.h⁻¹)). Obs: o primeiro símbolo representa os dados experimentais e o segundo, a predição do modelo. 161

Figura 4.48: Exemplo para obtenção da velocidade específica de crescimento celular através do coeficiente angular da relação entre ln(Xr/Xr₀) e o tempo (t), sendo $\mu_{Xri} = 0,237 \text{ h}^{-1}$ 164

Figura 4.49: Relação entre a concentração inicial de glicose e a velocidade específica inicial de crescimento (μ_{Xri}) para *C. necator* (●); ajuste da equação de Yang e Humphrey com n igual a 3 (—) e 4 (---), impondo μ_{Xrmax} de 0,25 h⁻¹ e Ks de 0,15 g.L⁻¹ 168

Figura 4.50: Correlação entre os dados preditos pelo modelo de Yang e Humphrey e os dados observados experimentalmente e gráfico de resíduos para o ajuste da Equação de Yang e Humphrey, com n de 3 (a)

e 4 (b), aos dados experimentais de concentração inicial de glicose versus velocidade específica inicial de crescimento ($\mu_{X_{ri}}$) para a bactéria *C. necator*. 170

Figura 4.51: Relação entre a concentração inicial de nitrogênio e a velocidade específica inicial de crescimento ($\mu_{X_{ri}}$) para *C. necator* (●); ajuste da equação de Yang e Humphrey com n igual a 2 (---) e 3 (—), impondo $\mu_{X_{rmax}}$ de 0,25 h⁻¹ e Ks de 0,1 g.L⁻¹ (7 x 10⁻³ mol.L⁻¹). 171

Figura 4.52: Correlação entre os dados preditos modelo de Yang e Humphrey e os dados observados experimentalmente e gráfico de resíduos para o ajuste da Equação de Yang e Humphrey, com n de 2 (a) e 3 (b), aos dados experimentais de concentração inicial de nitrogênio versus velocidade específica inicial de crescimento ($\mu_{X_{ri}}$) para a bactéria *C. necator*. 172

Figura 4.53: Predição do modelo fenomenológico, que considera a inibição pelas concentrações de glicose e nitrogênio em μ_{X_r} , dos dados experimentais de um processo em modo batelada para produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose, com exaustão de nitrogênio na fase de produção: (a) X_t (●), P(3HB) (▲) e X_r (◇) (g.L⁻¹); (b) glicose (■) e nitrogênio (○) (g.L⁻¹). As linhas contínuas representam a predição do modelo fenomenológico. 174

Figura 4.54: Resultados obtidos pela predição do modelo fenomenológico, considerando a inibição da velocidade de crescimento pelas concentrações de glicose e nitrogênio, e experimentalmente para um processo em modo batelada sequencial com reciclo externo de células para produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose, com exaustão de nitrogênio na fase de produção: (a) X_t (● ; —), P(3HB) (▲ ; —) e X_r (◇ ; —) (g.L⁻¹); (b) glicose (■ ; ---) e nitrogênio (○ ; —) (g.L⁻¹). Obs: o primeiro símbolo representa os dados experimentais e o segundo, a predição do modelo. 176

Figura 4.55: Resultados obtidos pela predição do modelo, considerando a inibição da velocidade de crescimento pelas concentrações de glicose e nitrogênio, e experimentalmente para um cultivo em modo batelada alimentada visando a produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose, com exaustão de nitrogênio na fase de produção: (a) X_t (● ; —), P(3HB) (▲ ; —) e X_r (◇ ; —) (g.L⁻¹); (b) glicose (■ ; ---) e nitrogênio (○ ; —) (g.L⁻¹). Obs: o primeiro símbolo representa os dados experimentais e o segundo, a predição do modelo. 178

Figura 4.56: Resultados obtidos pela predição dos cultivos realizados em condições iniciais que inibem ou não o crescimento celular visando a produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose, em exaustão de nitrogênio, a partir do modelo que considera a inibição de μ_{Xr} pelas concentrações iniciais de glicose e nitrogênio: (a) e (e) concentração dos metabólitos intracelulares (mol.g_{Xr}^{-1}); (b) e (f) concentração intracelular de ATP, NADH e NADPH (mol.g_{Xr}^{-1}); (c), (d), (g) e (h) velocidades específicas reacionais (q ($\text{mol.g}_{Xr}^{-1}.\text{h}^{-1}$)). As figuras (a), (b), (c) e (d) representam o cultivo com reciclo de células e as figuras (e), (f), (g) e (h) o cultivo batelada alimentada. 179

Figura 4.57: Resultados obtidos pela predição do modelo, considerando a inibição de μ_{Xr} pelas concentrações de glicose e nitrogênio, e experimentalmente para um cultivo batelada sequencial com reciclo de células visando a produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose, com alimentação de nitrogênio na fase de produção: (a) X_t (\bullet ; ---), P(3HB) (\blacktriangle ; ---) e X_r (\diamond ; ---) (g.L^{-1}); (b) glicose (\blacksquare ; ---) e nitrogênio (\circ ; ---) (g.L^{-1}); (c) velocidade específica de crescimento (μ_{Xr} (x ; ---)) (h^{-1}), velocidade específica de produção de P(3HB) (q_p (\circ ; ---)) ($\text{g}_{Pr}.\text{g}_{Xr}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Obs: o primeiro símbolo representa os dados experimentais e o segundo, a predição do modelo. 182

Figura I. 1: Macro “FLUX” e seu menu principal. 208

Figura I. 2:Ícone *Edition* do menu principal. 208

Figura I.3: Ícone *Data* do menu principal. 208

Figura I.4: Ícone *Calculs* do menu principal. 209

Figura I.5: Ícone *Visualisation* do menu principal. 209

Figura I.6: Esquema para adicionar e renomear macromoléculas. 210

Figura I.7: Janela de trabalho para criação da rede anabólica. 211

Figura I.8: Janela de trabalho para criação da rede catabólica. 212

Figura I.9: Esquema para adição de composto no gráfico da rede metabólica através da janela *Reseau Catabolique*. 212

Figura I.10: Representação da lista de reações da rede metabólica apresentada em “*Reseau*” 213

Figura I.11: Janela de trabalho para composição da biomassa. 213

Figura I.12: Representação dos dados fornecidos na planilha <i>Estim.Flux</i>	214
Figura I.13: Janela de trabalho do item <i>Data – Mesures</i>	215
Figura I.14: Janela aberta em caso de não convergência do cálculo. ...	216
Figura I.15: Resultados para as velocidades líquidas de reação e fluxos de troca.	217
Figura I.16: Resumo dos resultados gráficos.	218
Figura I.17: Janela da opção do menu principal <i>scenario</i>	218
Figura I.18: Esquema das reações consideradas no catabolismo de <i>C. necator</i> durante o consumo de glicose para produção de P(3HB). Os números em vermelho representam as reações listadas na Tabela I-2.	221
Figura II.1: Metabolismo hipotético para produção de X e biomassa a partir de glicose.	223
Figura II.2: Influência dos valores de k (A) e n (B) nas funções de ativação/inibição por um metabólito, em diferentes concentrações. ...	224
Figura II.3: Esquema das matrizes e dos vetores da massa molar para o metabolismo hipotético. A massa molar da biomassa e do produto está representada por Y e X, respectivamente. Quando o valor da massa molar é 1 implica em o resultado ser expresso em mol.L ⁻¹	225
Figura II. 4: Sistema reacional considerado para o balanço material, sendo Q _E e Q _S as vazões de entrada e de saída, C _i ^{abi} e C ^{abi} as concentrações dos metabólitos abióticos na entrada e na saída, respectivamente.	226

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Propriedades físicas de diferentes PHAs comparados ao polipropileno.	48
Tabela 2.2: Resumo dos resultados de acúmulo de P(3HB) (%), biomassa total (X_t (g.L^{-1}), produtividade em P(3HB) ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), fonte de carbono utilizada e concentração da solução estoque (g.L^{-1}), apresentadas por diferentes autores para produção de P(3HB) por microrganismos, com o objetivo de obter elevada densidade celular ...	66
Tabela 4.1: Concentração de glicose, nitrogênio e fósforo no meio de cultivo e nos frascos de alimentação, para os cultivos em modo batelada sequencial com reciclo externo de células.	93
Tabela 4.2: Resultados obtidos para os fatores de conversão de glicose em X_t ($Y_{XU/G}$), glicose em X_r ($Y_{Xr/G}$), nitrogênio em X_r ($Y_{Xr/N}$), fósforo em X_r ($Y_{Xr/P}$), glicose em PHA ($Y_{Pr/G}$), para os cultivos visando a produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) com exaustão e alimentação constante da fonte de nitrogênio durante a fase de produção.	119
Tabela 4.3: Resultados obtidos para velocidade específica máxima de crescimento (μ_{Xrmax}) e velocidade específica máxima de produção de PHA (q_{Pmax}), para os cultivos visando a produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) com exaustão e alimentação constante da fonte de nitrogênio durante a fase de produção.	127
Tabela 4.4: Resultados obtidos para porcentagem de acúmulo de polímero (% PHA) e porcentagem de unidades 3HB (% 3HB) e 3HV (% 3HV) para os cultivos visando a produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) com exaustão e alimentação constante da fonte de nitrogênio durante a fase de produção.	127
Tabela 4.5: Produtividade global (Prod), produtividade de fase de produção (Prod_P), Produção mássica global (Prod_M) e produção mássica de fase de produção (Prod_MP) para os cultivos visando a produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) com exaustão e alimentação constante da fonte de nitrogênio durante a fase de produção.	128
Tabela 4.6: Velocidades específicas máximas obtidas para as reações consideradas no modelo fenomenológico em diferentes situações.	138
Tabela 4.7: Índices estatísticos obtidos para o ajuste da Equação de Yang e Humphrey, com n de 3 e 4, aos dados experimentais de μ_{Xri} versus concentração inicial de glicose.	169

Tabela 4.8: Índices estatísticos obtidos para o ajuste da Equação de Yang e Humphrey, com n de 2 e 3, aos dados experimentais de μ_{Xri} versus concentração inicial de nitrogênio.	171
Tabela I.1: Precursores que constituem as macromoléculas da biomassa ativa. A abreviação apresentada refere-se a como o precursor é chamado no macro.	210
Tabela I.2: Reações consideradas no catabolismo de <i>C. necator</i> durante o consumo de glicose para produção de P(3HB).	220

LISTA DE ABREVIATURAS

^{13}C	Isótopo estável do elemento químico carbono
3HB	3-hidroxi butirato
3HHx	3-hidroxi hexanoato
3HV	3-hidroxi valerato
AP	Ácido propiônico
ADP	Adenosina difosfato
AFM	Análise de Fluxos Metabólicos
akg	α -cetoglutarato
AMP	Adenosina monofosfato
ART	Açúcares redutores totais
ATP	Adenosina trifosfato
C	Carbono
CN	Caldo nutriente
CoA	Coenzima A
CoASH	Coenzima A não ligada a um grupo acil
CS	Citrato sintase
CSTR	<i>Continuous stirred tank reactor</i>
D	Vazão específica de alimentação
DNS	Dinitrosalicílico
DO ₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm
ED	Entner-Doudoroff
EDA	2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato aldolase
EDD	Gliconato-6-fosfato desidratase
EM	Enzima málica
ENO	Enolase
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
FADH	Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
FBPA	Frutose bifosfato aldolase
FBPP	Frutose bifosfato fosfatase
FID	Detector de ionização de chama
FE	Fator de exatidão
FLUX	Macro do Excel para a Análise de Fluxos Metabólicos

G	Glicose
G3PD	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G6PD	Glicose-6-fosfato desidratase
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada com espectro de massa
GK	Glicoquinase
H ⁺	Íon hidrogênio
HCD	Alta densidade celular (<i>High Cell Density</i>)
HK	Hexoquinase
KDPG	2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato
KT	β-cetotiolase
M	Matriz estequiométrica
MCC	Via do ciclo metil-citrato
mcl-PHA	Polihidroxialcanoatos com monômeros de cadeia média
Mg	Magnésio
MM	Vetor massa molar
MM1	Meio mineral
MSE	Erro médio quadrático
N	Nitrogênio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NagC	Proteína da membrana externa (porina)
Nag E	Proteína do sistema açúcar fosfotransferase (presente na membrana)
Nag F	Proteína do sistema açúcar fosfotransferase (presente no citosol)
NMR	Ressonância Magnética Nuclear (<i>Nuclear magnetic resonance</i>)
OAA	Oxaloacetato
OD	Oxigênio dissolvido
O ₂	Oxigênio

P	Fósforo
P(3HB)	Poli(3-hidroxiбутирато)
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	Poli(3-hidroxiбутирато- <i>co</i> -3-hidroxi valerato)
P(3HB- <i>co</i> -3HHx)	Poli(3-hidroxiбутирато- <i>co</i> -3-hidroxi hexanoato)
P(3HV)	Poli(3-hidroxi valerato)
PDH	Piruvato desidrogenase
PEP	Fosfoenolpiruvato
PGI	Fosfoglicose isomerase
PGK	Fosfoglicerato quinase
PGM	Fosfoglicerato mutase
PHAs	Polihidroxi alcanoatos
Pi	Fosfato inorgânico
PK	Piruvato quinase
PNPB	Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel
PPi	Difosfato inorgânico
PPP	Via das pentoses fosfato
PTS	Sistema de transporte da fosfotransferase
Pr	Produto (P(3HB), P(3HB- <i>co</i> -3HV))
R ²	Coefficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
S	Substrato
scl-PHA	Polihidroxi alcanoatos com monômeros de cadeia curta
TAU	Tempo de relaxação
TCA	Ciclo do ácido cítrico
Triose-P	Gliceraldeído-3P
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
X	Biomassa
Xi	Metabólito intracelular

LISTA DE SÍMBOLOS

bi	Transporte líquido de xi para fora do sistema metabólico definido ($\mu\text{mol}_{xi} \cdot \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
CO	Concentração de oxigênio no meio líquido ($\text{g}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1}$)
C _{SO}	Concentração de saturação de O ₂ dissolvido no líquido ($\text{g}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1}$)
C _i	Concentração do composto i na entrada do sistema ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
C _{iE}	Concentração do composto i na saída do sistema ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
K _I	Constante de inibição pelo substrato ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ou $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
K _N	Constante de saturação em nitrogênio ($\text{g}_N \cdot \text{L}^{-1}$ ou $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
k _{La}	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1})
K _S	Constante de saturação ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ou $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
m _S	Coefficiente de manutenção celular ($\text{g}_X \cdot \text{g}_S^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
Prod	Produtividade global em PHA ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
Prod _M	Produção global em PHA ($\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$)
Prod _{MP}	Produção de PHA na fase de produção ($\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$)
Prod _P	Produtividade de PHA na fase de produção ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
q	Velocidade específica reacional ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ou $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
q _{3HB}	Velocidade específica de produção de 3HB ($\text{g}_{3\text{HB}} \cdot \text{g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
q _{3HV}	Velocidade específica de produção de 3HV ($\text{g}_{3\text{HV}} \cdot \text{g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
q _{3HBmax}	Velocidade específica máxima de produção de 3HB ($\text{g}_{3\text{HB}} \cdot \text{g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
q _{3HVmax}	Velocidade específica máxima de produção de 3HV ($\text{g}_{3\text{HV}} \cdot \text{g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
Q _E	Vazão de entrada ($\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$)
q _{glic}	Velocidade específica de consumo de glicose ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ou $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
q _{liq}	Velocidade específica líquida reacional ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ou $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
q _{max}	Velocidade específica máxima reacional ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ou $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
QO ₂	Velocidade específica de respiração celular ($\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
QO ₂ Xr	Velocidade de respiração celular ($\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
q _P	Velocidade específica de produção de PHA ($\text{g}_{\text{Pr}} \cdot \text{g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

Q_{Pmax}	Velocidade específica máxima de produção de PHA ($g_{Pr} \cdot g_{Xr}^{-1} \cdot h^{-1}$)
q_s	Velocidade específica de consumo de substrato ($g_s \cdot g_{Xr}^{-1} \cdot h^{-1}$)
Q_s	Vazão de saída (L.h ⁻¹)
r_i	Velocidade de formação ou consumo do composto i ($g_i \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)
t	Tempo (h)
t_0	Tempo inicial (h)
t_{0P}	Tempo de início da fase de produção (h)
V	Volume (L)
V_i	Volume inicial (L)
V_{ad}	Volume de substrato adicionado (L)
V_D	Velocidade de degradação de xi ($\mu mol_{xi} \cdot g_{biomassa}^{-1} \cdot h^{-1}$)
V_{ret}	Volume amostrado (L)
V_s	Velocidade de produção de xi ($\mu mol_{xi} \cdot g_{biomassa}^{-1} \cdot h^{-1}$)
x_i	Metabólito intracelular ($\mu mol_{xi} \cdot g_{biomassa}^{-1}$)
X_r	Biomassa residual (g)
X_t	Biomassa total (g)
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de substrato em produto ($g_{Pr} \cdot g_s^{-1}$)
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato em célula ($g_{Xr} \cdot g_s^{-1}$)
$Y_{Xr/F}$	Fator de conversão de fósforo em biomassa residual ($g_{Xr} \cdot g_P^{-1}$)
$Y_{Xr/G}$	Fator de conversão de glicose em biomassa residual ($g_{Xr} \cdot g_G^{-1}$)
$Y_{Xt/G}$	Fator de conversão de glicose em biomassa total ($g_{Xt} \cdot g_G^{-1}$)
$Y_{Xr/N}$	Fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual ($g_{Xr} \cdot g_N^{-1}$)
μ	Velocidade específica de crescimento celular (h ⁻¹)
μ_{max}	Velocidade específica máxima de crescimento celular (h ⁻¹)
μ_{Xr}	Velocidade específica de crescimento de biomassa residual (h ⁻¹)
μ_{Xri}	Velocidade específica inicial de crescimento de biomassa residual (h ⁻¹)
μ_{Xrmax}	Velocidade específica máxima de crescimento biomassa residual (h ⁻¹)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	39
1.1 OBJETIVO GERAL	41
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
1.3 DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO	43
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	45
2.1 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs).....	45
2.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE PHAs	49
2.2.1 <i>Cupriavidus necator</i> e seu metabolismo	50
2.2.1.1 Metabolismo dos carboidratos.....	50
2.2.1.2 Metabolismo do ácido propiônico.....	53
2.2.1.3 Cadeia de transporte de elétrons – fosforilação oxidativa	54
2.2.1.4 Vias de produção de NADPH na assimilação de glicose e ácido propiônico	56
2.2.1.5 Metabolismo da biossíntese de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) por <i>C. necator</i>	56
2.2.1.6 Mecanismo de regulação da produção de PHAs	58
2.3 Substratos de baixo custo na produção de PHAs	61
2.4 Obtenção de elevada densidade celular e produtividade de processo	62
2.4.1 Estratégias de produção.....	62
2.4.2 Análise de Fluxos Metabólicos (AFM)	65
2.4.3 Modelagem matemática	72
2.4.3.1 Modelos não estruturados.....	73
2.4.3.2 Modelos estruturados	75
3. Material e métodos	79
3.1 Microrganismos e meio de cultivo	79
3.2 cultivos	79
3.3.1 Amostragem	79
3.3.2 Determinação da concentração de biomassa	80
3.3.3 Determinação de açúcares redutores totais, nitrogênio e fósforo .80	
3.3.4 Determinação da concentração de PHA	80

3.3.5 Determinação da proteína intracelular	82
3.4 Tratamento dos dados	82
3.4.1 Produtividade global de PHA (Prod)	84
3.4.2 Produtividade na fase de produção de PHA (Prod_P)	84
3.4.3 Produção mássica de PHA (Prod_M)	85
3.4.4 Produção mássica de PHA na fase de produção (Prod_MP).....	85
3.4.5 Velocidades específicas de crescimento celular e produção de PHA	85
3.4.6 Fatores de conversão.....	86
3.4.7 Determinação do oxigênio dissolvido.....	86
3.4.8 Transferência de oxigênio durante o cultivo: determinação do k_{La} e QO_2	86
4. Resultados e discussões	89
4.1 Produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) por <i>C. necator</i> em batelada sequencial com reciclo externo de células e alimentação de nitrogênio, em concentração limitante, durante a fase de produção.....	91
4.1.1 Metodologia para produção de PHAs em modo batelada sequencial com reciclo externo de células com e sem alimentação de nitrogênio na fase de produção	91
4.1.1.1 Metodologia para produção de PHAs em modo batelada sequencial com reciclo externo de células sem alimentação (exaustão) de nitrogênio na fase de produção.....	91
4.1.1.2 Metodologia para produção de PHAs em modo batelada sequencial com reciclo externo de células e alimentação de nitrogênio na fase de produção.....	96
4.1.2 Resultados da produção de PHA em modo batelada sequencial com reciclo externo de células com e sem alimentação de nitrogênio na fase de produção	96
4.1.2.1 Produção de P(3HB) em modo batelada sequencial com reciclo externo de células e exaustão de nitrogênio na fase de produção	96
4.1.2.2 Produção de P(3HB) com alimentação de nitrogênio durante a fase de produção	101
4.1.2.3 Produção de P(3HB-co-3HV) em exaustão de nitrogênio durante a fase de produção.....	107
4.1.2.4 Produção de P(3HB-co-3HV) com alimentação da fonte de nitrogênio durante a fase de produção	112

4.1.2.5 Dados cinéticos e fatores de conversão de substratos em Xr e em PHA.....	119
4.2 Construção de um modelo fenomenológico baseado na Análise de Fluxos Metabólicos para produção de P(3HB) por <i>Cupriavidus necator</i> a partir de glicose	129
4.2.1 Metodologia para desenvolvimento do modelo fenomenológico	130
4.2.1.1 Determinação da estequiometria da biomassa.....	132
4.2.2 Metodologia para o cultivo em modo batelada	134
4.2.3 Resultados para construção do modelo fenomenológico	134
4.2.4 Simulações utilizando o modelo proposto.....	153
4.2.5 Validação do modelo proposto.....	158
4.3 Incorporação de restrições ao modelo fenomenológico e posterior validação	162
4.3.1 Metodologia utilizada para incorporação de restrições ao modelo e posterior validação	163
4.3.1.1 Cultivos em <i>shaker</i> para o estudo de inibição.....	163
4.3.1.2 Cultivos para validação do modelo com a incorporação das inibições	164
4.3.1.2.1 Cultivo em modo batelada alimentada	164
4.3.1.2.2 Cultivo em batelada sequencial com reciclo externo de células e alimentação em nitrogênio	165
4.3.1.3 Metodologia para modelagem da inibição por substrato.....	166
4.3.2 Resultado da incorporação de restrições ao modelo fenomenológico e posterior validação.....	168
4.3.2.1 Definição das equações de restrição.....	168
4.3.3 Validação do modelo fenomenológico para diferentes estratégias de cultivo	173
5. CONCLUSÕES.....	185
6. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	187
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	189
APÊNDICE I.....	207
I. Análise de Fluxos Metabólicos de <i>C. necator</i> – Macro Excel.....	207
I.1 Estrutura e funcionamento do macro “FLUX”	207
I.1.1 Menu principal.....	208

I.1.1.1 <i>Edition</i>	208
I.1.1.2 <i>Data</i>	208
I.1.1.3 <i>Calculs</i>	209
I.1.1.4 <i>Visualisation</i>	209
I.1.1.5 <i>Scenario e Quitter</i>	209
I.1.2 Construção da rede metabólica	209
I.1.2.1 Macromoléculas	209
I.1.2.2 Rede anabólica	210
I.1.2.3 Rede catabólica	211
I.1.2.4 Edição da rede (<i>Listing réactions</i>)	212
I.1.3 Características da biomassa	213
I.1.3.1 Dados cinéticos	213
I.1.3.2 Composição da biomassa e demanda anabólica em precursores	214
I.1.4 Fluxo de troca - <i>Mesures</i>	214
I.1.5 Construção do código de cálculo	215
I.1.6 Inicialização e cálculo	216
I.1.7 Resultados	216
I.1.7.1 <i>Scenario</i>	217
I.2 REDE METABÓLICA UTILIZADA PARA construção do modelo fenomenológico	219
APÊNDICE II	223
II.1 Modelo fenomenológico	223

1. INTRODUÇÃO

Os polímeros de origem petroquímica vêm sendo aplicados nas mais diversas áreas (SILVA et al., 2007). Estes polímeros possuem cadeias carbônicas de elevada massa molar, o que dificulta seu processo de degradação biológica, e torna seu descarte um problema ambiental (RAMADAS et al., 2009). Os polímeros biodegradáveis vêm surgindo como alternativa para algumas aplicações dos polímeros petroquímicos.

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres termoplásticos biodegradáveis produzidos intracelularmente por um grande número de microrganismos (ANDERSON; DAWES, 1990; LEE, 1996a). Dentre os PHAs, o Poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) e o seu copolímero Poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) (P(3HB-*co*-3HV)), destacam-se devido a algumas características similares às do polipropileno (RAMSAY, 1994).

A bactéria *Cupriavidus necator* tem sido amplamente estudada na produção de PHAs, pela capacidade de acumular mais de 80 % de sua massa seca em polímero (GROUSSEAU et al., 2013; HOLMES, 1985). A produção de PHAs por este microrganismo ocorre em duas etapas: na primeira etapa, caracterizada como fase de crescimento, todos os nutrientes essenciais ao crescimento celular devem estar disponíveis; na segunda etapa, caracterizada como fase de produção, um dos nutrientes essenciais é limitado (por exemplo, nitrogênio, fósforo, oxigênio, etc.) no meio de cultivo e a fonte de carbono mantida em excesso (ANDERSON; DAWES, 1990; RAMSAY et al., 1990).

Os altos custos de produção dos PHAs limitam sua aplicação. A busca pela redução dos custos de produção destes biopolímeros pode ser alcançada através da obtenção de alta concentração celular, que promove maiores produtividades, uma vez que a concentração de polímero, por ser um produto intracelular, está diretamente relacionada à concentração celular (GRAGE et al., 2009). Outra possibilidade é a utilização de substratos de baixo custo, como os resíduos agroindustriais que apresentam, de forma geral, moderadas concentrações de açúcares redutores totais (ART), por exemplo, bagaço de maçã, com cerca de 85 g.L⁻¹ (RODRIGUES, 2005), melação cítrica com cerca de 80 g.L⁻¹ (ARAGÃO et al., 2009) e soro de leite com aproximadamente 40 g.L⁻¹ (AHN; PARK; LEE, 2001). Deve-se também mencionar o melhoramento da capacidade de uma cepa produzir um determinado produto, seja por modificação genética ou por otimização de um processo biotecnológico (IWATANI; YAMADA; USUDA, 2008; THIRUMALA; REDDY, 2012), e ainda, técnicas de *downstream* que

sejam mais eficientes e possuam impacto ambiental reduzido (QUINES et al., 2015).

Estratégias que utilizam substratos de baixo custo para produção de alta concentração celular têm sido pouco relatadas em trabalhos científicos (AHN; PARK; LEE, 2001; KULPREECHA et al., 2009; WONG; LEE, 1998), devido à dificuldade operacional de se trabalhar com substratos que apresentam baixas concentrações de carbono, tendo em vista a elevada quantidade de substrato que necessita ser adicionada ao reator para realizar o cultivo.

Trabalho anterior realizado por (IENCZAK et al., 2015) avaliou a utilização de substrato com moderada concentração da fonte de carbono (90 g.L^{-1}), em um sistema com reciclo externo de células, com o objetivo de obter elevada concentração celular para produção de P(3HB). Os resultados encontrados mostraram elevado acúmulo de biopolímero (68,8 %) e produtividade global ($1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Entretanto, ao final do cultivo os autores obtiveram concentração de biomassa total igual a $61,6 \text{ g.L}^{-1}$, valor inferior aos considerados alta densidade celular (acima de 100 g.L^{-1}) (IENCZAK; SCHMIDELL; ARAGÃO, 2013; RYU et al., 1997).

A produção de PHAs é conduzida, na maior parte das vezes, sob condições de exaustão do nutriente limitante. Entretanto, estudos têm mostrado que a adição deste nutriente, em concentrações limitantes, durante a fase de produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV), pode aumentar a produtividade em polímero, em culturas conduzidas em modo batelada alimentada (ARAGÃO et al., 1996; GROUSSEAU et al., 2013; LEE et al., 1993).

Estratégias de cultivo que aumentem a produtividade do processo podem ser obtidas através da Análise de Fluxos Metabólicos (AFM), definida como a quantificação dos fluxos no metabolismo de um determinado organismo, sob condições definidas, que aparece como uma ferramenta aplicável na análise de vias metabólicas com o objetivo de aumentar a eficiência da biossíntese de produtos de interesse, como é o caso da produção de PHAs (SHIMIZU, 2002). A AFM permite a construção de modelos matemáticos estruturados, que levam em conta as alterações de composição dos microrganismos, permitindo descrever o estado das células e sua adaptação às mudanças do meio ambiente (BONOMI; SCHMIDELL, 2001; ROELS, 1983). Os modelos estruturados são ótimas ferramentas para descrever o comportamento do metabolismo microbiano em sistemas dinâmicos e podem ser aplicados como preditivos, na busca de situações experimentais que levem, por exemplo, à maximização da formação do produto de interesse

(BIDEAUX; GOMA; URIBELARREA, 2008; SPOLJARIC et al., 2013).

A aplicação da AFM requer uma combinação de dados experimentais e modelos matemáticos, podendo ser dividida em três atividades chave: cultivos, medidas de consumo de substratos e formação de produtos e subprodutos e cálculos de fluxos através da estequiometria das reações metabólicas (RIASCOS; GOMBERT; PINTO, 2005). Em termos matemáticos, o problema está em se encontrar a solução para um sistema linear de equações algébricas, que representem a estequiometria das reações metabólicas consideradas (VARMA; PALSSON, 1994). A análise de fluxos metabólicos foi aplicada na produção de PHAs a partir de *Cupriavidus necator* (GROUSSEAU et al., 2013; SHI; NIKAWA; SHIMIZU, 1999; SHIMIZU, 2002). Modelos simplificados que levem em conta os resultados da AFM obtidos por estes autores podem ser propostos.

Frente ao exposto, verifica-se a importância de estudar técnicas produtivas que levem à maximização da produção de PHAs por *C. necator*, com consequente aumento de produtividade e redução do custo do produto final. A construção de modelos matemáticos estruturados é uma forma de facilitar a verificação do comportamento deste microrganismo frente às diferentes estratégias produtivas e, com isso, facilitar a escolha do processo que leve aos resultados desejados.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a produção de PHA, a partir de *Cupriavidus necator*, em cultivos com reciclo externo de células conduzidos sob exaustão ou limitação da fonte de nitrogênio ao longo da fase de produção, utilizando-se substrato com baixa concentração de carbono. Além disso, desenvolver e validar um modelo fenomenológico estruturado, baseado na Análise de Fluxos Metabólicos, para auxiliar na compreensão do comportamento metabólico de *C. necator* e obter condições de processo que maximizem a produção de P(3HB) a partir de glicose no sistema com reciclo externo de células.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a influência da alimentação de nitrogênio durante a fase de produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV), por *C. necator* a partir de glicose, sobre a cinética de produção desses polímeros em processo batelada sequencial com reciclo externo de células;

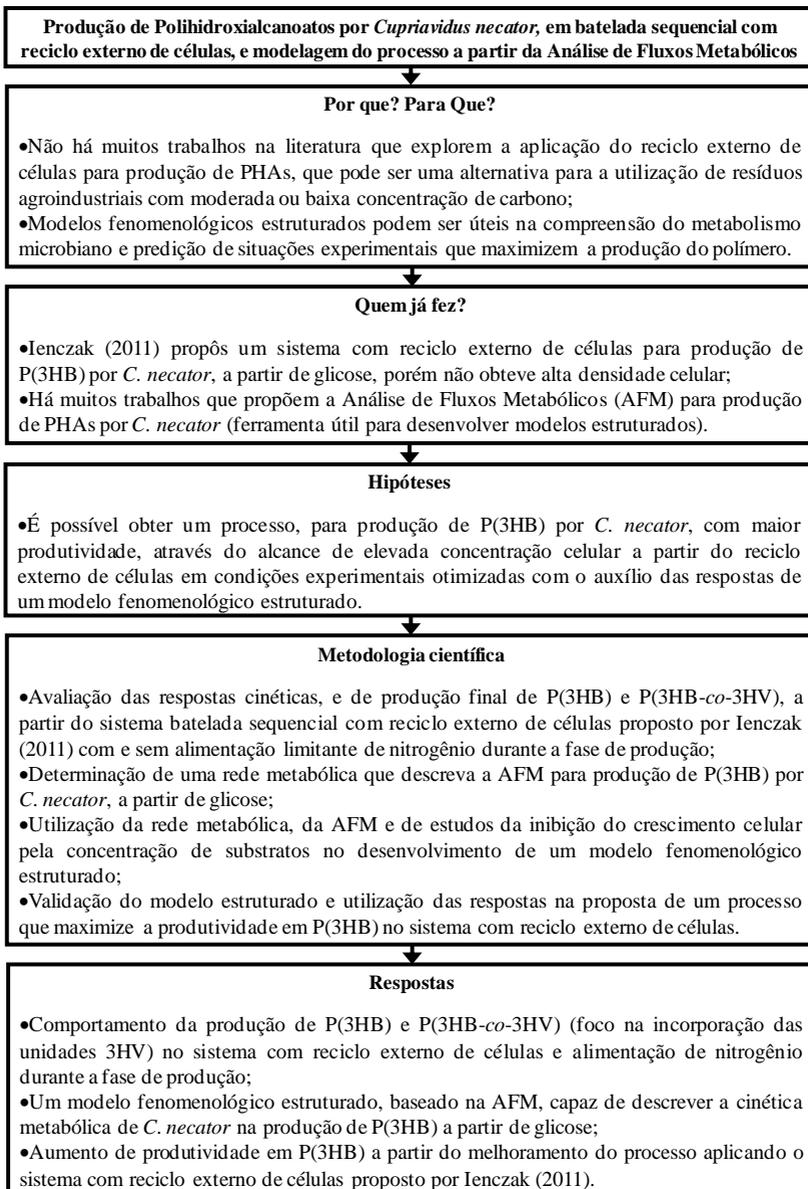
b) Selecionar os principais metabólitos e reações para Análise de Fluxos Metabólicos (AFM) na produção de P(3HB) por *C. necator*, a partir de glicose, e propor uma rede metabólica simplificada que descreva o processo e a estequiometria das reações envolvidas, incluindo a estequiometria para a obtenção da composição da biomassa;

c) Construir um modelo fenomenológico estruturado, baseado na rede metabólica simplificada, estabelecendo as velocidades específicas máximas, em função de equações de ativação e inibição por metabólitos e substratos;

d) Utilizar o modelo fenomenológico para prever a produção de P(3HB) por *C. necator* em glicose sob diferentes estratégias de cultivo, selecionando condições que elevem a produtividade do processo;

e) Validar o modelo fenomenológico para produção de P(3HB) por *C. necator*, nas condições estabelecidas em sistema com reciclo externo de células, utilizando substrato com baixa concentração de glicose.

1.3 DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO



2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os polímeros destacam-se como a segunda maior demanda dentre os derivados do petróleo (SILVA et al., 2007). Devido à sua versatilidade, o material plástico tem sido largamente empregado nas mais diversas aplicações, como na construção civil (tubos, conexões, esquadrias de janela, isolante térmico e acústico em lajes), na indústria de alimentos (embalagens) e na indústria automobilística (painéis de carros, com peças mais leves que colaboram na redução do consumo de combustível) (ABIPLAST, 2015). Conforme dados divulgados pela ABIPLAST em 2014, estima-se que a produção mundial de resinas plásticas seja de aproximadamente 250 milhões de toneladas por ano, sendo a participação brasileira neste contexto de apenas 2,6 % (6,5 milhões de toneladas). Uma das vantagens dos materiais plásticos, sua resistência à degradação biológica e química, é também o maior problema associado a estes materiais (FROST & SULLIVAN, 2004). A elevada massa molar dos polímeros petroquímicos, e a adição de plastificantes e aditivos a estes materiais, dificultam a ação das enzimas despolimerases, excretadas por microrganismos em condições ambientais favoráveis, e, conseqüentemente, sua biodegradação, resultando em um impacto negativo no meio ambiente (GU, 2003; RAMADAS et al., 2009; SHAH et al., 2008). Atualmente, 13,5 % do volume de material descartado nos aterros sanitários é composto por plásticos (ABIPLAST, 2015). Neste contexto, a utilização de polímeros biodegradáveis torna-se uma alternativa para minimizar esse problema ambiental.

2.1 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS)

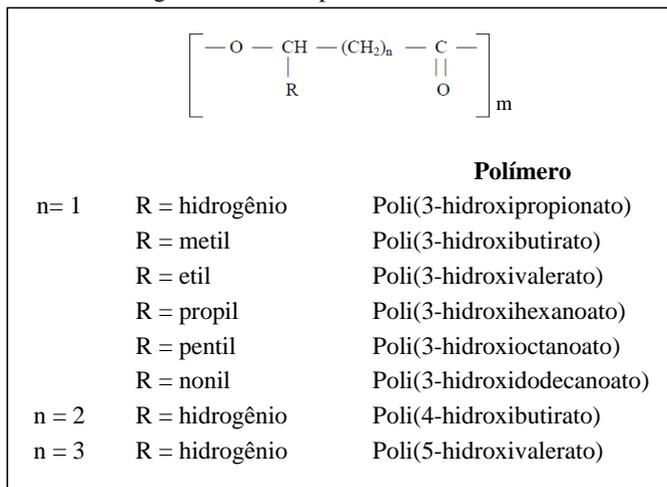
Os polihidroxicanoatos (PHAs) são biopolímeros biodegradáveis que podem ser produzidos por inúmeros microrganismos como forma de reserva energética. Os PHAs possuem massa molar elevada, por isso, apresentam características similares às dos polímeros derivados do petróleo. Além disso, podem ser produzidos a partir de matérias-primas renováveis, oferecendo a possibilidade de um ciclo fechado de produção. São completamente degradados a água e dióxido de carbono sob condições aeróbias e, a metano e água sob condições anaeróbias (KAHAR et al., 2004; REDDY et al., 2003).

Os PHAs são sintetizados intracelularmente e armazenados na forma de grânulos, podendo representar até 80 % da massa seca da célula. Sua composição monomérica depende tanto do microrganismo

utilizado, quanto da natureza da fonte de carbono (BASSAS et al., 2006; REDDY et al., 2003).

Mais de 150 diferentes unidades monoméricas já foram identificadas como constituintes dos PHAs (AGNEW; PFLEGER, 2013). Na Figura 2.1 é possível visualizar a estrutura geral dos PHAs mais comuns, sendo que o grupo químico substituído na posição “R” determina as propriedades do polímero formado. Quando um metil é substituído da posição “R”, tem-se o poli(3-hidroxiбутirato) (P(3HB)). Este é o PHA mais estudado devido às suas características termoplásticas e mecânicas similares às do polipropileno (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998; REDDY et al., 2003). O valor de “m” na estrutura geral dos PHAs pode variar de 100 a 30.000. Este valor influencia diretamente a massa molar do polímero e suas propriedades físicas (LEE, 1996a; SUDESH; ABE; DOI, 2000).

Figura 2.1: Estrutura geral dos PHAs para diferentes monômeros.



Fonte: Adaptado de Lee (1996a).

Quando a estrutura do PHA consiste de monômeros compostos de 3 a 5 carbonos, como os monômeros de 3HB e 3HV, estes são classificados como polímeros de cadeia curta (scl-PHA), enquanto monômeros compostos de mais de 6 carbonos formam os PHAs de cadeia média (mcl-PHA) (AGNEW; PFLEGER, 2013). Os mcl-PHA são mais amorfos do que os scl-PHA, e possuem propriedades elastoméricas que dependem da composição de sua cadeia polimérica (ASHBY; SOLAIMAN; FOGLIA, 2005). A capacidade do

microrganismo produzir scl-PHA ou mcl-PHA está associada à especificidade com o substrato da enzima PHA sintase presente em sua estrutura celular (ANDERSON; DAWES, 1990).

Devido às suas propriedades, o P(3HB) pode ser aplicado na medicina, agricultura, sistemas marinhos, embalagens, entre outros (CHEN, et al., 2001). Apesar de apresentar algumas propriedades mecânicas próximas às do polipropileno, como o módulo de Young (parâmetro mecânico que proporciona a medida da rigidez de um material sólido) e a resistência à tração, o P(3HB) é mais rígido e quebradiço, devido à sua elevada cristalinidade (LEE, 1996a). O copolímero poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (P(3HB-co-3HV)) é formado pela incorporação aleatória dos monômeros em que tanto unidades metil quanto etil são substituídas na posição "R". Este copolímero apresenta ponto de fusão e cristalinidade inferiores às do P(3HB), o que o torna mais moldável e, conseqüentemente, sua gama de aplicações é maior. A variação no conteúdo de unidades 3-hidroxi valerato (3HV) confere diferentes propriedades termomecânicas ao polímero, quanto maior a porcentagem de 3HV, menor a temperatura de fusão e maior a resistência à tração (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998; LEE, 1996a; LUZIER, 1992).

Para que as unidades de 3HV possam ser produzidas, um substrato com número ímpar de carbono precisa ser fornecido ao microrganismo como, por exemplo, ácido propiônico, ácido valérico e ácido nonanóico (ALIAS; TAN, 2005; DU et al., 2001a). Alias e Tan (2005) reportaram a produção de um copolímero composto de 93 % de unidades 3HV e 7 % de unidades 3HB, quando ácido valérico foi fornecido como único substrato, já quando ácido propiônico foi fornecido como único substrato a composição do polímero foi de 42 % de unidades 3HV e 58 % de unidades de 3HB, em cultivos com uma cepa de *Burkholderia cepacia* isolada do efluente de óleo de palma.

Outro copolímero que vêm sendo estudado é o poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato) (P(3HB-co-3HHx)). O P(3HB-co-3HHx) mistura as características dos scl-PHA e dos mcl-PHA, o que torna o polímero mais flexível e com menor ponto de fusão, quando comparado ao P(3HB-co-3HV) e ao P(3HB) (BUDDE et al., 2011; MIFUNE; NAKAMURA; FUKUI, (2010)). Este PHA é um dos que apresenta melhores características para aplicação na área médica (CHANG et al., 2014). As bactérias naturalmente produtoras deste PHA como, por exemplo *Aeromonas caviae*, normalmente não são capazes de acumular grandes quantidades de PHA. Por este motivo, estudos de recombinação genética, nos quais os genes responsáveis pela produção

das unidades de HHx da cepa naturalmente produtora são clonados em uma cepa capaz de produzir PHA em elevadas concentrações intracelulares, vêm sendo reportados na literatura (BUDDE et al., 2011).

A Tabela 2.1 apresenta um resumo com a comparação das principais propriedades físicas de diferentes PHAs e do polipropileno.

Tabela 2.1: Propriedades físicas de diferentes PHAs comparados ao polipropileno.

Polímero	% de HV/HHx	Temperatura de fusão (°C)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento de ruptura (%)
P(3HB)	-	177	43	5
P(3HB-co-HV)	10	150	25	20
P(3HB-co-HV)	20	135	20	100
P(3HB-co-HHx)	10	127	21	400
P(3HB-co-HHx)	17	120	20	800
Polipropileno	-	170	34	400

Fonte: CHANG et al. (2014).

Os PHAs vêm sendo amplamente aplicados nas áreas médica, de biomateriais e farmacêutica, nas quais produtos de grande especificidade, e na maioria das vezes de alto valor agregado, são necessários (CHEN; WU, 2005; JANA et al., 2014). Além disso, um estudo da degradação de P(3HB) em monômeros de 3HB, em culturas com *Pseudomonas mendocina*, foi realizado por Wang et al. (2015). Conforme os autores, os monômeros de 3HB opticamente ativos possuem alto valor agregado, uma vez que podem ser aplicados na síntese de compostos quirais, como aminoácidos, vitaminas e antibióticos.

Apesar das diversas aplicações reportadas na literatura, a aplicação dos PHAs em larga escala, como substituto dos polímeros petroquímicos, ainda não é possível devido ao seu alto custo de produção (AGNEW; PFLEGER, 2013). Silva et al. (2014) mostraram que é possível obter P(3HB) a partir de xilose com preço variando de US\$ 1,3-7,1/Kg (R\$ 4,55-24,85/Kg considerando o valor cambial de R\$ 3,5) em um processo produtivo associado à produção de açúcar e etanol. Conforme Raicher (2011) o preço de venda do P(3HB) não deve ultrapassar R\$ 4,50/Kg para que este polímero se encontre na mesma faixa de valores de comercialização dos polímeros derivados do petróleo.

Em 1992, a Cooperativa de produtores de cana-de-açúcar e álcool do estado de São Paulo (COOPERSUCAR-SP) estabeleceu um projeto de cooperação com o Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo S/A (IPT-SP), a fim de desenvolver pesquisas para a produção de P(3HB) e, em 1993 iniciou-se a construção de uma unidade piloto na Usina da Pedra, no município de Serrana-SP, que entrou em funcionamento em 1995 (RAICHER, 2011). Esta planta está ativa até os dias atuais e chama-se PHB Industrial S/A, que possui capacidade de produção de 50 toneladas de P(3HB)/ano (BIOCYCLE, 2015). Levando-se em consideração que a produção de polímeros petroquímicos no Brasil foi de 6,5 milhões de toneladas/ano em 2014, conforme dados divulgados pela ABIPLAST (2015), a produção de P(3HB) ainda é insignificante. Incentivos fiscais por parte do governo, ou a criação de uma lei que torne obrigatório o uso de determinada quantidade de PHAs pelas indústrias processadoras de polímeros, poderiam estimular a produção destes biopolímeros. Incentivo similar ao mencionado foi feito à produção de Biodiesel através do Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel (PNPB), lançado em 2003. Através do PNPB, a partir de 2008 tornou-se obrigatória a mistura de 2 % de biodiesel ao diesel fóssil, e este valor subiu para 5 % em 2010, o que fez com que a produção deste bioproduto aumentasse de 69 milhões de litros para 2,7 bilhões de litros entre 2007 e 2011 (BIODIESEL, 2015).

2.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE PHAS

São conhecidos mais de 300 microrganismos capazes de produzir PHAs, porém apenas alguns são considerados potenciais para produção industrial. Os microrganismos mais estudados são: *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Burkholderia sacchari*, além de linhagens recombinantes como, *Escherichia coli* e *Klebsiella aerogenes*. Estas bactérias foram selecionadas principalmente pela capacidade de acumularem altas concentrações de PHAs (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998; LEE, 1996a).

Os microrganismos produtores de PHAs podem ser divididos em dois grupos, sendo o primeiro composto por linhagens que necessitam da limitação de um nutriente essencial e excesso da fonte de carbono, como *C. necator* e *P. oleovorans* e, um segundo grupo capaz de acumular o polímero associado ao seu crescimento, sem a necessidade

de limitação nutricional, como *E. coli* recombinante e *A. latus* (LEE, 1996b).

2.2.1 *Cupriavidus necator* e seu metabolismo

Cupriavidus necator (anteriormente conhecida como *Hydrogenomonas eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* e *Wautersia eutropha* (VANDAMME; COENYE, 2004)) é um microrganismo Gram negativo que se apresenta na forma de bastonete de 0,5 por 1,8 a 2,6 μm (DAVIS; DOUDOROFF; STANIER, 1969).

Esse microrganismo é um dos que apresenta condições favoráveis à produção industrial de PHAs, por ser capaz de acumular até 80 % de sua massa seca em biopolímero, além de, utilizar diferentes tipos de substratos, como glicose, frutose, óleos vegetais e ácidos orgânicos (CHAKRABORTY; GIBBONS; MUTHUKUMARAPPAN, 2009; KAHAR et al., 2004; RAMSAY, 1994). A síntese do polímero ocorre em duas etapas: na primeira, procura-se favorecer ao máximo o crescimento celular com todos os nutrientes presentes no meio em concentrações adequadas, na segunda etapa interrompe-se o crescimento celular, através da limitação de um nutriente não fonte de carbono, estimulando o acúmulo de polímero nas células (GOMES; BUENO NETO, 1997). Esta bactéria é naturalmente capaz de acumular apenas scl-PHA, entre eles, Poli(3-hidroxi butirato), Poli(3-hidroxi valerato), Poli(4-hidroxi butirato) e seus copolímeros, conforme o substrato fornecido como fonte de carbono (LEE, 1996a). Para que outros PHAs sejam produzidos por *C. necator*, a aplicação da engenharia metabólica é necessária, como no caso da produção de P(3HB-co-3HHx) reportada por Budde et al. (2011).

Neste trabalho, será avaliada de forma mais aprofundada a utilização de glicose e ácido propiônico como fontes de carbono para produção de P(3HB) e de P(3HB-co-3HV). Portanto nesta revisão serão detalhados apenas o metabolismo de assimilação dos carboidratos e deste ácido orgânico, a cadeia respiratória, a biossíntese e a degradação destes biopolímeros.

2.2.1.1 Metabolismo dos carboidratos

Cepas selvagens de *Cupriavidus necator* são capazes de assimilar frutose pela via de Entner-Doudoroff, porém não são capazes de assimilar a glicose (GOTTSCHALK; EBERHARDT; SCHLEGEL, 1964). Apesar da cepa possuir as enzimas necessárias para metabolizar a

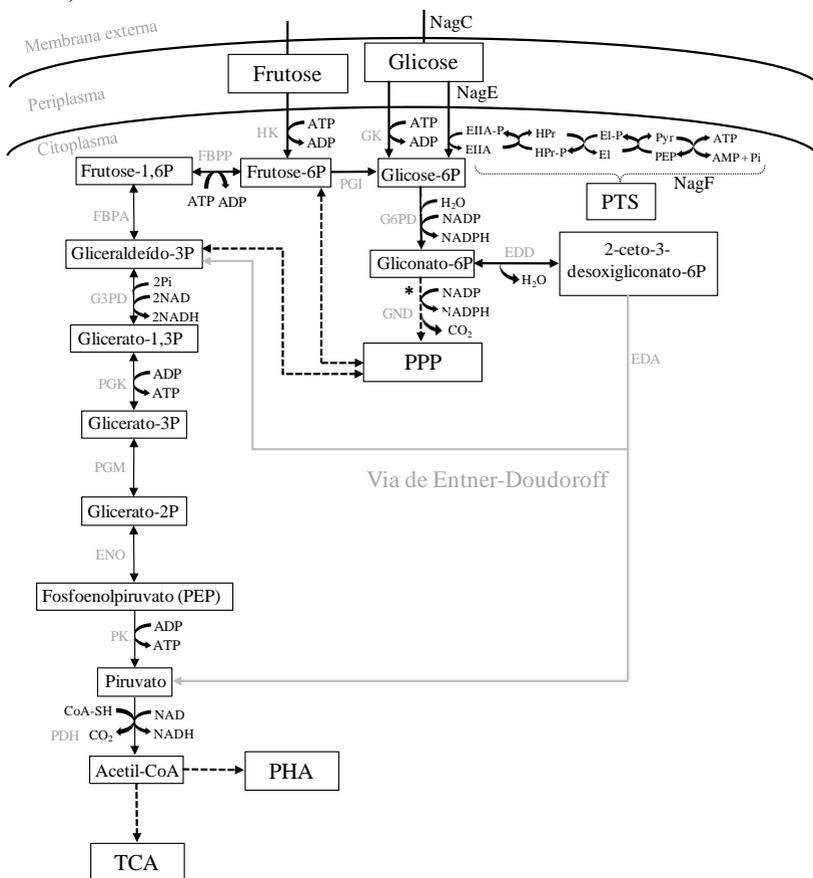
glicose em seu citoplasma, acredita-se que não exista um mecanismo natural de permeação da glicose através da parede celular (RABERG et al., 2011).

A cepa *C. necator* DSM 545 é uma mutante natural capaz de utilizar a glicose como fonte de carbono e, de acordo com o estudo realizado por Raberg e colaboradores (2011), a mutação possivelmente ocorreu na etapa de permeação da glicose pela parede celular. De acordo com estes autores, para que a glicose possa ser transportada para o interior da célula, há uma superexpressão das proteínas NagE, NagF e NagC, que fazem parte do sistema de transporte fosfotransferase *N*-acetilglicosamina específico (tipo PTS).

Orita e colaboradores (2012) estudaram a assimilação da glicose por cepas geneticamente modificadas e afirmam que, além do fato das cepas selvagens não possuírem o sistema de transporte da glicose, existe uma deficiência na etapa de fosforilação da glicose após sua permeação e, portanto, modificações também ocorrem nesta etapa do metabolismo.

Um esquema do catabolismo dos carboidratos em *Cupriavidus necator*, levando-se em consideração a permeação da glicose, baseada nos estudos de Raberg e colaboradores (2011) está apresentado na Figura 2.2.

Figura 2.2: Catabolismo dos carboidratos em *C. necator* - Em cinza a via Entner-Doudoroff e suas enzimas: EDD, gliconato-6-fosfato desidratase; EDA, 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato aldolase; (*) a existência desta via ainda não foi comprovada (GND, gliconato-6P-desidrogenase); Nomenclatura das demais enzimas em cinza: HK, hexoquinase; GK, hexoquinase; PGI, fosfoglicose isomerase; G6PD, glicose-6-fosfato desidrogenase; FBPA, frutose bifosfato aldolase; FBPP, frutose bifosfato fosfatase; G3PD, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PGK, fosfoglicerato quinase; PGM, fosfoglicerato mutase; ENO, enolase; PK, piruvato quinase; PDH, piruvato desidrogenase; abreviação PPP para a via das pentoses fosfato, TCA para via do ácido cítrico e PTS para o sistema de transporte da fosfotransferase; NagC, proteína da membrana externa (porina), NagE, proteína do sistema açúcar fosfotransferase (presente na membrana), NagF, proteína do sistema açúcar fosfotransferase (presente no citosol).



Fonte: Adaptado de Grousseau (2012).

2.2.1.2 Metabolismo do ácido propiônico

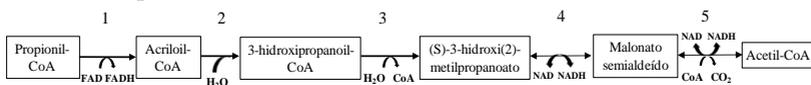
O ácido propiônico, quando adicionado na fase de produção, é utilizado como substrato para produção do copolímero P(3HB-co-3HV). A cepa também é capaz de consumir este substrato, quando presente na fase de crescimento a partir de três diferentes tipos de ativação da molécula de ácido propiônico:

- 1) Ácido Propiônico + Acetil-CoA \rightarrow Propionil-CoA + Acetato
- 2) Ácido Propiônico + CoA + ATP \rightarrow Propionil-CoA + AMP + PPI
- 3) Ácido Propiônico + ATP \rightarrow Propionil-P + ADP



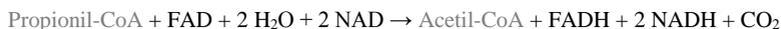
Após passar pela ativação, a assimilação do propionil-CoA pode ocorrer por três vias diferentes: β -oxidação, ciclo do metil-citrato (BRAMER; STEINBUCHER, 2001) ou via do succinil-CoA. Apesar do propionil-CoA poder ser assimilado pela via do Succinil-CoA, a enzima metilmalonil-CoA epimerase, responsável pela conversão do S-metilmalonil-CoA em R-metilmalonil-CoA não foi identificada em cepas de *Cupriavidus necator* (KEGG PATHWAY – propanoate metabolism (2015)). Da mesma forma, duas enzimas da via da β -oxidação (Figura 2.3) não foram identificadas em *C. necator*. Logo, não é possível afirmar que estas rotas são possíveis para esta cepa, e serão desconsideradas.

Figura 2.3: Assimilação do Propionil-CoA pela β -oxidação. As enzimas envolvidas na reação são acil-CoA desidrogenase (1), enoil-CoA hidratase (2), 3-hidroxi-butiril-CoA hidrolase (3), 3-hidroxi-propanoato desidrogenase (4) e metilmalonato semialdeído desidrogenase (5). As enzimas 3 e 4 não foram identificadas para *C. necator*.



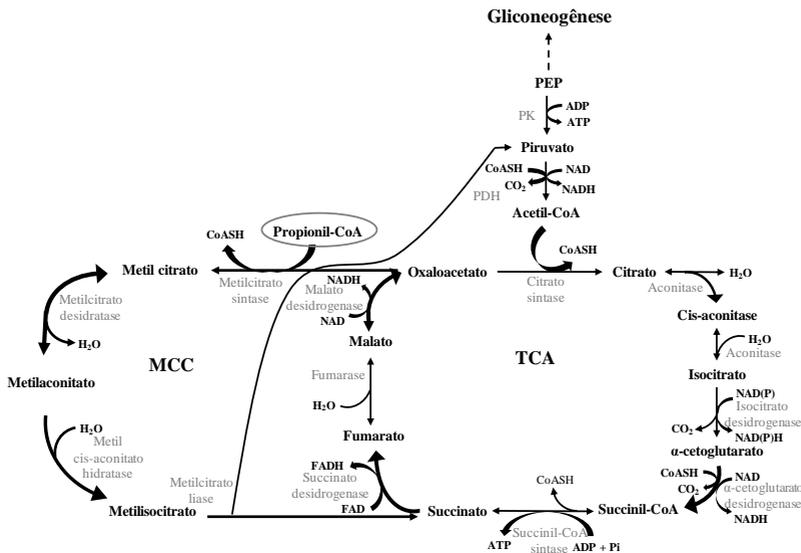
Fonte: KEGG PATHWAY – propanoate metabolism (2015).

Ciclo do metil-citrato: A partir desta via, o propionil-CoA é convertido a piruvato que, via gliconeogênese, alimenta a célula em precursores. O balanço global para a assimilação do ácido propiônico por esta via fica:



As rotas metabólicas envolvidas podem ser observadas na Figura 2.4. Após ativado, o propionil-CoA também pode ser utilizado diretamente na produção das unidades de 3HV, como será apresentado mais adiante.

Figura 2.4: Esquema da via de assimilação do ácido propiônico em *C. necator* (considerando apenas o ciclo do metil citrato). Em cinza as enzimas envolvidas nas diferentes vias, sendo: PK, piruvato quinase e PDH, piruvato desidrogenase. Abreviação MCC para a via do ciclo do metil-citrato e TCA para via do ciclo do ácido cítrico.



Fonte: Adaptado de Grousseau (2012); Bramer; Steinbüchel, 2001 e Lehninger; Nelson; Cox (2008).

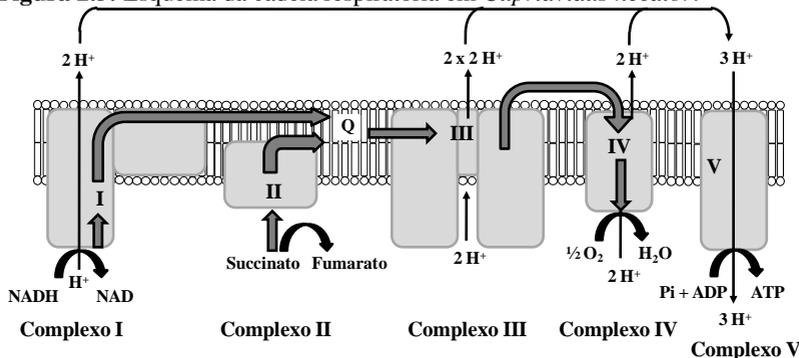
2.2.1.3 Cadeia de transporte de elétrons – fosforilação oxidativa

Na fosforilação oxidativa (Figura 2.5), cinco complexos enzimáticos estão envolvidos na produção de ATP. O Complexo I, também conhecido como NADH desidrogenase, transfere os elétrons fornecidos pelo NADH para a ubiquinona, formando o ubiquinol, que se difunde pela membrana interna até o Complexo III, em que voltará a ser oxidado a ubiquinona. No Complexo II, também conhecido como succinato desidrogenase, os elétrons do succinato são transferidos para a ubiquinona, formando o ubiquinol, que também será posteriormente oxidado a ubiquinona no Complexo III. O Complexo III, ou complexo

citocromo bc1, acopla a transferência de elétrons do ubiquinol para o citocromo c (Complexo IV), que transporta dois elétrons para o oxigênio molecular, reduzindo-o a H_2O (LEHNINGER et al., 2008).

Aproximadamente 200 kJ de energia são liberados pela oxidação de 1 mol de NADH, que são conservados no gradiente de prótons. Quando os prótons deslocam-se espontaneamente, a energia é disponibilizada para produzir trabalho. Esta energia eletroquímica direciona a síntese de ATP a partir de ADP e P_i (fósforo inorgânico) através da ATP sintase, ou Complexo V (LEHNINGER et al., 2008).

Figura 2.5: Esquema da cadeia respiratória em *Cupriavidus necator*.



Fonte: Adaptado de KEGG PATHWAY – oxidative phosphorylation (2015) e Lehninger et al., 2008.

As concentrações relativas de ATP e ADP controlam não só a transferência de elétrons, como também a fosforilação oxidativa e as velocidades do TCA, a oxidação do piruvato e a glicólise. Sempre que o consumo de ATP aumenta, a velocidade de transferência de elétrons e da fosforilação oxidativa aumenta. Simultaneamente, a velocidade da oxidação do piruvato via TCA aumenta, elevando desta forma o fluxo de elétrons da cadeia respiratória. Esses eventos podem, por sua vez, provocar um aumento na velocidade da glicólise, aumentando a velocidade de formação de piruvato. Quando a conversão de ADP em ATP diminui a concentração do ADP, o controle aceptor diminui a transferência de elétrons e, portanto, a fosforilação oxidativa. A glicólise e o TCA também diminuem, uma vez que o ATP é um inibidor alostérico da piruvato desidrogenase (LEHNINGER et al., 2008).

2.2.1.4 Vias de produção de NADPH na assimilação de glicose e ácido propiônico

Verifica-se nas Figuras 2.2 e 2.4 que existem três vias de produção de NADPH através da assimilação de glicose e ácido propiônico. Além das três vias apresentadas nestas Figuras, o NADPH também pode ser produzido na via glicolítica ou através da enzima transidrogenase. As cinco reações envolvidas na produção de NADPH são:

- 1) Conversão da glicose-6P à frutose-6P (via glicolítica);
- 2) Conversão da glicose-6P à gliconato-6P;
- 3) Conversão do gliconato-6P à ribulose-5P (via das pentoses fosfato);
- 4) Conversão do isocitrato à α -cetoglutarato (ciclo TCA);
- 5) Conversão de NADH à NADPH (transidrogenase).

Entretanto, as enzimas fosfofrutoquinase e gliconato-6P-desidrogenase, reponsáveis pelas reações 1 e 3, respectivamente, não foram identificadas em *C. necator* (GOTTSCHALK; EBERHART; SCHLEGEL, 1964). Lee et al. (1995) afirmam que a velocidade da enzima transidrogenase é baixa em *C. necator*. Desta forma, assume-se que o NADPH é produzido apenas pelas vias 2 e 4.

Hong et al. (2003) reportaram, ao estudar a produção de P(3HB) por *E. coli* recombinante, que a via de Entner-Doudoroff era preferida, durante a fase de produção de polímero, às vias glicolítica e das pentoses fosfato na assimilação da glicose. Os autores também afirmaram que a quantidade de NADPH produzido por esta via é suficiente para suprir a demanda deste cofator durante a produção de P(3HB).

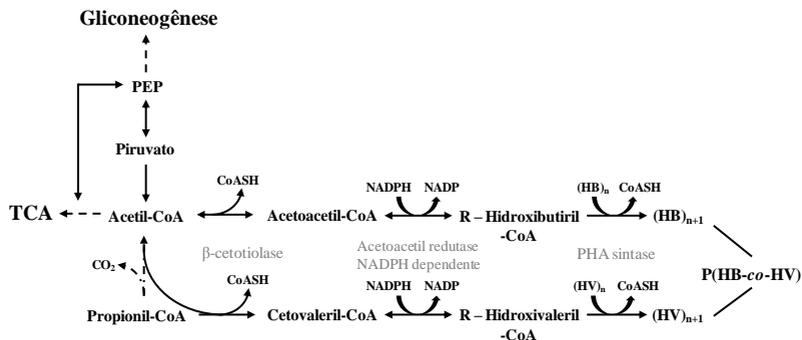
2.2.1.5 Metabolismo da biossíntese de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) por *C. necator*

O P(3HB) e o P(3HB-co-3HV) são geralmente sintetizados em três etapas pela ação sequencial de três enzimas (Figura 2.6), organizadas em um único *operon* (*phbCAB*), codificados pela PHA sintase, β -cetotiolase e NADPH dependente acetoacetil-CoA redutase, respectivamente (LEE, 1996a).

A primeira etapa é catalisada pela β -cetotiolase que liga duas moléculas de acetil-CoA, ou uma molécula de acetil-CoA e uma de propionil-CoA, para formar respectivamente um acetoacetil-CoA ou um cetovaleril-CoA. Dados reportados na literatura mostram que *C. necator*

produz pelo menos duas β -cetotiolases (HAYWOOD et al., 1988). Slater e colaboradores (1998) estudaram a especificidade da β -cetotiolase PhbA e verificaram que esta enzima não atua de forma eficiente na conversão do Acetil-CoA e Propionil-CoA em cetovaleril-CoA. Além disso, os autores provaram que *C. necator* expressa pelo menos mais duas β -cetotiolases: BktB e BktC que se mostraram ativas na produção do cetovaleril-CoA, porém a atividade da BktB foi bastante superior à atividade da BktC. Através destes resultados foi possível afirmar que a PhbA é responsável pela produção do acetoacetil-CoA, enquanto a BktB, pela produção do cetovaleril-CoA, durante a produção do copolímero P(3HB-co-3HV) por *C. necator*, quando ácido propiônico é adicionado ao meio de cultivo. As enzimas β -cetotiolases sofrem inibição por elevadas concentrações de CoASH, porém outros intermediários metabólicos, como ATP, ADP e oxaloacetato, em concentrações fisiológicas, não afetam a cinética desta enzima (OEDING; SCHLEGEL, 1973).

Figura 2.6: Biossíntese de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) por *Cupriavidus necator*.



Fonte: adaptado de Slater et al. (1998).

A segunda etapa é realizada pela ação da enzima acetoacetil redutase NADPH dependente, que reduz estereoespecificamente o acetoacetil-CoA em R-3-hidroxitubiril-CoA e o cetovaleril-CoA em R-3-hidroxitubiril-CoA. De acordo com Volova e colaboradores (2004), é a acetoacetil redutase que determina a velocidade específica de biossíntese do polímero.

A terceira etapa é realizada pela enzima PHA sintase, que realiza a conversão estereoseletiva do R-3-hidroxitubiril-CoA e do R-3-hidroxitubiril-CoA em PHA (HAYWOOD; ANDERSON; DAWES, 1988; SUDESH; ABE; DOI, 2000). A concentração de PHA sintase na

célula determina a massa molar do polímero e sua polidispersidade (SIM, et al., 1997).

O P(3HB) e o P(3HB-co-3HV) podem ser degradados pela célula a acetil-CoA por enzimas PHA despolimerases. Os genes que codificam estas enzimas sofrem inativação na presença de concentrações de carbono que permitem elevadas velocidades de crescimento (KESSLER; WITHOLT, 2001). Após a exaustão de um nutriente (fase estacionária de crescimento) a expressão dos genes das despolimerases é induzida, mesmo em elevadas concentrações de carbono, porém, a velocidade de degradação do polímero pode ser até 10 vezes inferior à velocidade de biossíntese enquanto carbono estiver disponível (DOI, et al., 1992).

2.2.1.6 Mecanismo de regulação da produção de PHAs

Para que a biossíntese de PHAs por *C. necator* ocorra em grande quantidade, é necessária a limitação de um nutriente essencial, não fonte de carbono, ao crescimento, como o N, P, Mg, O₂ entre outros. Durante a fase de crescimento, os carboidratos são metabolizados pela via de Entner-Doudoroff a piruvato, que é desidrogenado a acetil-CoA. O acetil-CoA entra no TCA, libera CoASH e é oxidado a CO₂, gerando energia em forma de ATP, NADH, NADPH, FADH e precursores biossintéticos. Ao ocorrer a limitação de um nutriente essencial, a produção de proteínas é cessada, o que provoca a elevação da concentração de NADH e NADPH, resultando na inibição da citrato sintase e isocitrato desidrogenase e, conseqüentemente, uma redução do TCA (e da liberação de CoASH) e indução da biossíntese de PHAs (IENCZAK; ARAGÃO, 2011).

As bactérias respondem de forma similar a maioria das limitações (BABEL; ACKERMANN; BREUER, 2001). Desta forma, os mecanismos de controle também devem ser similares. Quando o nutriente limitante é o O₂, os cofatores reduzidos não são mais reoxidados pela cadeia respiratória, a citrato sintase é inibida pelo NADH e pelo NADPH (LEE et al., 1995) e o TCA é reduzido, o acetil-CoA passa a ser acumulado e a concentração de CoASH diminui (BABEL; ACKERMANN; BREUER, 2001). A enzima β -cetotiolase, é então ativada e o carbono presente no meio passa a ser utilizado na produção de PHAs (OEDING; SCHLEGEL, 1973).

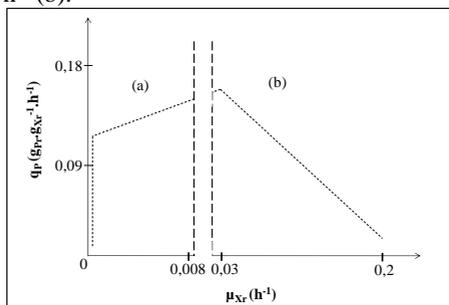
No caso de limitação em P ou N, os potenciais de utilização de acetil-CoA e NAD(P)H são reduzidos. Uma vez que a concentração de NAD(P)H aumenta, a citrato sintase é inibida, e da mesma forma que na limitação de O₂, o TCA é reduzido, a β -cetotiolase é ativada e a

produção de PHAs é induzida (BABEL; ACKERMANN; BREUER, 2001). A limitação do nitrogênio induz a produção do biopolímero, porém sua exaustão provoca uma perda considerável da atividade microbiana, o que prejudica a produção do polímero (DU et al., 2001a). Lee et al. (1993) estudaram a atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), β -cetotiolase (KT) e citrato sintase (CS) quando diferentes relações de carbono e nitrogênio (C/N) foram fornecidas para *C. necator*. De forma geral, a atividade enzimática da KT foi superior à atividade enzimática das G6PD e CS, sendo que sua atividade máxima foi medida logo após a exaustão do nitrogênio no meio de cultivo. A atividade da G6PD não foi influenciada pelas diferentes condições experimentais e a enzima CS sofreu inibição pela elevação da concentração de NAD(P)H após a exaustão do nitrogênio.

A literatura reporta que, no caso da limitação em fósforo, este nutriente pode ser transferido de um componente celular para outro, devido à reorganização celular (GROUSSEAU, 2012). Algumas bactérias são capazes de substituir parcialmente os fosfolipídios por lipídeos livres de fósforo durante a limitação por P (ZAVALETA-PASTOR et al., 2010). Além disso, a atividade da ATP sintase decresce e o TCA é restringido, promovendo a conversão do excesso de carbono em PHA (MARZAN; SCHMIZU, 2011).

Aragão (1996) mostrou que, durante a fase de produção induzida por uma limitação nutricional, dentro de uma faixa de velocidade específica de crescimento (μ_{Xr}) entre 0,001 e 0,03 h^{-1} , existe uma correlação linear entre μ_{Xr} e q_P (velocidade específica de produção de P(3HB)), em que q_P alcança valores máximos quando μ_{Xr} está próximo a 0,03 h^{-1} (Figura 2.7). Acima de 0,03 h^{-1} a correlação não é mais válida.

Figura 2.7: Evolução da velocidade específica de produção (q_P) em função da variação da velocidade específica de crescimento (μ_{Xr}) inferiores a 0,008 h^{-1} (a) e entre 0,02 e 0,2 h^{-1} (b).



Fonte: Adaptado de Aragão (1996).

Grousseau (2012) confirmou o comportamento obtido por Aragão (1996) utilizando ácidos orgânicos como fonte de carbono, entretanto o valor de μ_{Xr} em que q_p foi máximo foi levemente superior. Os valores de velocidade específica máxima de crescimento (μ_{Xrmax}) a partir de ácidos orgânicos é superior quando comparado ao μ_{Xrmax} a partir da glicose para *C. necator*. Desta forma, Grousseau (2012) propôs uma correlação entre o valor de μ_{Xr} em que q_p é máximo e μ_{Xrmax} , sendo $\mu_{Xr} = 0,15 \cdot \mu_{Xrmax}$. A partir desta correlação, sabendo-se o valor de μ_{Xrmax} para, é possível determinar qual valor de μ_{Xr} deve ser mantido a fim de manter q_p próximo ao seu valor máximo durante a fase de produção.

Quando ácido propiônico é fornecido como substrato, após ser convertido a propionil-CoA, o mesmo pode ser oxidado a acetil-CoA, é por este motivo que o copolímero P(3HB-co-3HV) é produzido mesmo quando este nutriente é adicionado como única fonte de carbono (DOI et al., 1987). Contudo, os precursores do propionil-CoA são substratos considerados caros, sua oxidação à acetil-CoA não é desejada, e por este motivo outra fonte de carbono, como a glicose, normalmente é adicionada ao meio de cultivo a fim de fornecer os precursores para que o acetil-CoA seja produzido por outras vias, e o ácido propiônico (ou outro precursor caro) direcionado preferencialmente para a produção de propionil-CoA. Outra forma de inibir a oxidação do propionil-CoA a acetil-CoA é conduzir a cultura em condição de limitação de oxigênio (LEFBVRE et al., 1997). Lefebvre et al. (1997) estudaram a produção de P(3HB-co-3HV) por *C. necator*, a partir de glicose e propionato de sódio, sob condição de dupla limitação: nitrogênio e oxigênio. Os autores verificaram que a dupla limitação reduziu a velocidade de formação das unidades de 3HB, porém não interferiu na velocidade de produção de 3HV, quando comparado a experimentos com limitação apenas da fonte de nitrogênio. A dupla limitação levou ao aumento na % de 3HV de 17,9 para 31,5 % quando comparada à limitação apenas em nitrogênio, sendo que o acúmulo final de P(3HB-co-3HV) foi de 75 % em ambos os casos.

De maneira geral, as condições necessárias à produção de PHAs são elevadas concentrações de NAD(P)H e elevada razão de NAD(P)H/NAD(P), uma baixa concentração de CoASH e elevada concentração de acetil-CoA. Estas condições inibem a degradação do polímero já produzido (DOI et al., 1990).

2.3 SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO NA PRODUÇÃO DE PHAs

A literatura reporta que até 40 % do custo total da produção de PHAs pode ser atribuído à fonte de carbono utilizada (CHOI; LEE, 1999). Uma forma de reduzir estes custos é a utilização de resíduos agroindustriais, cuja composição apresenta compostos orgânicos como: glicose, frutose, sacarose, glicerol, ácidos orgânicos, entre outros (ARAGÃO et al., 2009; MARTINEZ et al., 2015; SANTOS et al., 2014; SILVA et al., 2004; SUWANNASING; IMAI; KAEWKANNETRA, 2015).

Ahn, Park e Lee (2000) estudaram a produção de P(3HB) em modo batelada alimentada por *E. coli* recombinante, aplicando uma solução de soro de leite concentrada (280 g.L^{-1} de lactose) para alimentar o reator, obtendo 119 g.L^{-1} de Xt, com 80,5 % de P(3HB) e produtividade de $2,57 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Quando estes mesmos autores utilizaram uma solução de soro de leite contendo 210 g.L^{-1} de lactose, os resultados obtidos foram consideravelmente inferiores, com Xt e produtividade final de $83,1 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,15 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente. Os autores justificam que quando a concentração inferior foi alimentada ao biorreator, houve a necessidade de remoção de meio de cultivo ao longo do experimento, devido à limitação volumétrica, o que levou à redução da produtividade, tendo em vista a inexistência do reciclo de células.

O problema de limitação volumétrica reportado por Ahn, Park e Lee (2000) ocorre na maioria dos casos nos quais resíduos são aplicados na produção de PHAs. A maioria dos resíduos agroindustriais possui baixa, ou moderada, concentração da fonte de carbono, como é o caso da borra de café hidrolisada (50 g.L^{-1} de açúcares totais (OBRUCA et al., (2014))), resíduo da indústria de óleo de oliva ($11,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácidos orgânicos (MARTINEZ et al., (2015))), resíduo da indústria de abacaxi (105 g.L^{-1} de açúcares totais (SUWANNASING; IMAI; KAEWKANNETRA, 2015)), melão cítrico (80 g.L^{-1} de açúcares redutores totais (ART) (ARAGÃO et al. 2009)), vinhaça ($3,2 \text{ g.L}^{-1}$ de ART e $4,6 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol (ZANFONATO et al., 2014)), bagaço de maçã (85 g.L^{-1} (RODRIGUES, 2005)), soro de leite (40 g.L^{-1} (AHN; PARK; LEE, 2001)), entre outros. Muitas vezes concentrar estes resíduos, a fim de aumentar a concentração da fonte de carbono, não é possível já que outros compostos, que podem ser inibidores para a célula, também são concentrados, o que leva à redução das velocidades específicas de crescimento e produção do polímero e, consequentemente, da produtividade do processo (MARTINEZ et al., 2015; OBRUCA et al., 2014). Neste sentido, estratégias produtivas que

permitam a utilização destes resíduos, sem concentrá-los, que levem a elevadas produtividades e contornem os problemas volumétricos reportados, precisam ser estudadas.

2.4 OBTENÇÃO DE ELEVADA DENSIDADE CELULAR E PRODUTIVIDADE DE PROCESSO

Desenvolver estratégias produtivas que reduzam os problemas associados aos resíduos agroindustriais com baixa, ou moderada, concentração de carbono, na obtenção de culturas com alta densidade celular (do inglês *High cell density* (HCD)) é um desafio. Algumas ferramentas podem ser muito úteis neste contexto, como, a Análise de Fluxos Metabólicos (AFM), em que ao compreender o comportamento do metabolismo do microrganismo, frente a diferentes substratos, é possível estabelecer uma condição experimental otimizada em termos de consumo de substrato, produção de produto e redução de ciclos fúteis que levem à dissipação de energia, por exemplo. Além da AFM, outra ferramenta que vem sendo bastante aplicada na busca por processos biotecnológicos mais eficientes é a modelagem matemática, seja com modelos estruturados, ou com modelos não-estruturados. Pode-se ainda aliar a AFM e a modelagem matemática de forma a se obter modelos que prevejam condições experimentais otimizadas, além de descrever o provável comportamento metabólico do microrganismo nestas condições.

A aplicação do reciclo externo de células, seja em um processo contínuo ou batelada sequencial, é provavelmente a única estratégia que leve a HCD a partir de resíduos contendo baixa ou moderada concentração de carbono, visto os problemas físicos encontrados a partir da aplicação deste tipo de substrato. Logo, os modelos matemáticos baseados na AFM podem ser úteis na predição das condições de operação do sistema com reciclo externo de células que levem a maior produtividade do processo.

2.4.1 Estratégias de produção

Diferentes estratégias de produção já foram estudadas para a produção de PHAs, e dentre estas, a mais aplicada é batelada alimentada. Porém, muitos estudos vêm buscando novas estratégias de cultivo com o objetivo de aumentar a produtividade e o acúmulo de polímero intracelular através da obtenção de HCD no meio de cultivo (RIESEMBERG; GUTKE, 1999). De acordo com Choi e Lee (1999),

considerando uma produção anual fixa, o aumento da produtividade volumétrica do processo está diretamente relacionado com a redução de escala dos equipamentos necessários na planta, que reduz o custo final do produto. Os autores também defendem que o acúmulo intracelular do polímero possui grande influência no custo final, e que a economia obtida ao aumentar o teor de P(3HB) de 55 % para 65 % é quase a mesma que a economia obtida ao aumentar a produtividade volumétrica de 1 para 2 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Uma vez que o P(3HB) é um produto intracelular, aumentar o teor de polímero de 55 % para 65 % implica em, por exemplo, para 45 g de biomassa residual (X_r), aumentar a massa de polímero intracelular de 55 g para 83,5 g, ou seja, 28,5 g de P(3HB) serão produzidos a mais.

Para produção de PHAs, concentrações de biomassa seca total (X_t) acima de 100 g.L^{-1} e cerca de 30 g.L^{-1} de biomassa seca residual ($X_r = X_t - \text{P(3HB)}$) são consideradas altas concentrações celulares (ARAGÃO et al., 1996; IENCZAK; SCHMIDELL; ARAGÃO, 2013; RYU et al., 1997). As estratégias de alta concentração celular podem apresentar muitos inconvenientes, como, por exemplo, inibição pelo substrato, alta demanda de oxigênio durante o processo, formação de subprodutos inibidores do crescimento e aumento da viscosidade do meio de cultivo (AHN; PARK; LEE, 2000; LEE, 1996a; RIESENBERG; GUTKE, 1999).

Devido à complexidade do tema, verificou-se que estratégias para obtenção de HCD devem ser bem elaboradas. Cultivos contínuos sem reciclo de células (quando o substrato alimentado apresenta elevada concentração da fonte de carbono) ou com reciclo de células, descontínuos sequenciais e descontínuos alimentados são os principais modos de cultivo para a produção de PHAs em alta concentração celular (DU et al., 2001b; IENCZAK et al., 2015; IENCZAK; SCHMIDELL; ARAGÃO, 2013; ROCHA et al., 2008).

Muitos trabalhos na literatura reportam a produção de PHAs por *C. necator*, em elevadas produtividades, na ordem de 2 a 3 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, a partir de substratos com elevada concentração de carbono (acima de 500 g.L^{-1}) (ATLIÉ et al., 2011; KIM et al., 1994; RYU et al., 1997; SHANG; JIANG; CHANG, 2003). Entretanto, como já reportado, os resíduos agroindustriais possuem em sua maioria baixa, ou moderada, concentração da fonte de carbono. Estratégias usando substratos de baixo custo para produção de alta concentração celular têm sido pouco relatadas em trabalhos científicos (AHN; PARK; LEE, 2000; AHN; PARK; LEE, 2001; IENCZAK et al., 2015; WONG; LEE, 1998).

O sistema de batelada sequencial, que consiste na remoção de um volume de meio do biorreator para posterior alimentação do mesmo volume de meio rico em nutriente, foi avaliado para a produção de P(3HB), por *C. necator*, a partir de frutose (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005a). Dois ciclos de remoção/alimentação de meio (20 %) foram realizados ao longo do experimento. O meio de cultura de alimentação possuía 300 g.L^{-1} de frutose e $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrogênio. Ao final do processo, 49 g.L^{-1} de Xt e 25 g.L^{-1} de P(3HB) foram produzidos. Estes resultados são 3 vezes superior aos reportados para uma cultura em batelada. O problema associado com este sistema, é que as células são removidas do biorreator juntamente com o meio de cultivo, o que reduz a produtividade do processo.

Um cultivo contínuo para produção de P(3HB) a partir de frutose, por *C. necator*, foi avaliado por Khanna e Srivastava (2008). A solução de alimentação do sistema foi uma solução contendo 90 g.L^{-1} de frutose (concentração que pode ser encontrada em muitos resíduos agroindustriais) e $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrogênio. A vazão específica de alimentação (D) foi igual a $0,1 \text{ h}^{-1}$, não houve limitação de nenhum nutriente que estimulasse a produção de P(3HB) (N, P, S, O_2 , etc.) nem aplicação do sistema de reciclo externo de células. Os valores de Xt e P(3HB) obtidos no estado estacionário foram de 27,7 e $5,5 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, levando a uma produtividade de $0,55 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Conforme os autores, para obter maiores concentrações de P(3HB) no estado estacionário valores de D muito menores precisam ser empregados, o que leva à redução da produtividade do processo.

Ahn et al. (2001) obtiveram acúmulo de 87 % de polímero, e produtividade em P(3HB) de $4,6 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, ao utilizar estratégia batelada sequencial com reciclo externo de células para obtenção de alta concentração celular com *Escherichia coli* recombinante. Apesar do ótimo desempenho, o substrato utilizado (soro de leite) apresentava elevada concentração de carbono, 280 g.L^{-1} de lactose. Ienczak et al. (2015) utilizaram estratégia similar para produção de P(3HB) por *C. necator*, e alcançaram acúmulo de 68,8 % e $1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de produtividade. Com o objetivo de simular um resíduo agroindustrial, o substrato utilizado por estes autores foi uma solução de glicose e frutose (1:1) em concentração de 90 g.L^{-1} .

A Tabela 2.2 apresenta um resumo de alguns trabalhos reportados na literatura. É possível observar que a produtividade do processo está relacionada com a concentração da fonte de carbono alimentada ao biorreator, em que as maiores produtividades foram observadas quando concentrações mais elevadas da fonte de carbono foram utilizadas.

Observa-se também que o sistema batelada sequencial com reciclo externo de células apresenta boa eficiência na produção de P(3HB) a partir de resíduos com baixa, ou moderada, concentração de carbono, quando comparado aos demais regimes avaliados.

2.4.2 Análise de Fluxos Metabólicos (AFM)

A Análise de Fluxos Metabólicos (AFM) é uma ferramenta que auxilia a elucidar a velocidade das reações das vias metabólicas intracelulares, utilizando-se de técnicas computacionais baseadas nos balanços de massa, que levam em conta restrições estequiométricas acopladas a medidas experimentais extracelulares como as velocidades específicas de crescimento e de produção do produto (VALLINO; STEPHANOPOLOS, 1993).

A aplicação da AFM requer uma combinação de dados experimentais e modelos matemáticos, podendo ser dividida em três atividades chave: cultivos, medidas de consumo de substratos e formação de produtos e cálculos de fluxos através da estequiometria das reações metabólicas (RIASCOS; GOMBERT; PINTO, 2005). Em termos matemáticos, o problema está em encontrar a solução para um sistema linear de equações algébricas, as quais representam a estequiometria das reações metabólicas consideradas (VARMA; PALSSON, 1994).

Esta técnica é baseada na lei fundamental de conservação da massa. Ela é realizada sobre certas condições de regime permanente e requer apenas as informações sobre a estequiometria das vias metabólicas, demanda anabólica e alguns parâmetros específicos da cepa estudada (EDWARDS; PALSSON, 1998; SAVINELL; PALSSON, 1992).

As necessidades anabólicas são baseadas na composição da biomassa. Quatro grupos de macromoléculas são considerados como representantes da composição celular: proteínas, nucleotídeos, lipídeos e polissacarídeos. O modelo é construído com as vias de biossíntese que conduzem a estes quatro compostos, e as vias metabólicas necessárias para fornecer a energia e os intermediários de biossíntese (SAVINELL; PALSSON, 1992; VARMA; PALSSON, 1994). Se a quantidade de polímeros da biomassa é conhecida, a quantidade de monômeros pode ser deduzida e então os fluxos de precursores, indispensáveis ao crescimento, podem ser calculados (BIDEAUX, 2000).

O desenvolvimento deste tipo de modelo demanda, de forma geral, cinco etapas (VANROLLEGHEM; HEIJNEN, 1998).

Tabela 2.2: Resumo dos resultados de acúmulo de P(3HB) (%), biomassa total (X_t (g.L^{-1})), produtividade em P(3HB) ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), fonte de carbono utilizada e concentração da solução estoque (g.L^{-1}), apresentadas por diferentes autores para produção de P(3HB) por microrganismos, com o objetivo de obter elevada densidade celular.

Micro-organismo	Estratégia	P(3HB) (%)	X_t (g.L^{-1})	Produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Concentração da solução estoque (g.L^{-1})	Fonte de carbono	Referência
<i>C. necator</i>	Batelada alimentada	81,5	221	3,75	800	Glicose	Ryu et al. 1997
<i>C. necator</i>	Batelada alimentada	73,8	164	2,42	700	Glicose	Kim et al. 1994
<i>C. necator</i>	Batelada alimentada	67	208	3,1	700	Glicose	Shang, Jiang; Chang, 2003
<i>C. necator</i>	Batelada alimentada (reatores em série)	77	81	1,85	500	Glicose	Atlié et al. 2011
<i>B. sacchari</i>	Batelada alimentada	56	148	2,18	560; 280; 46	Glicose; Xilose; Arabinose	Cesário et al. 2014
<i>C. necator</i>	Batelada sequencial	51	49	0,42	300	Frutose	Khanna; Srivastava, 2005a
<i>E. coli</i> recombinante	Batelada alimentada	80,5	119	2,57	280	Lactose	Ahn; Park; Lee, 2000
<i>E. coli</i> recombinante	Batelada sequencial com reciclo externo	87	194	4,6	280	Lactose	Ahn; Park; Lee, 2001
<i>C. necator</i>	Contínuo	20	27,7	0,55	90	Frutose	Khanna; Srivastava, 2008
<i>C. necator</i>	Batelada sequencial com reciclo externo	68,8	61,6	1,0	90	Glicose e frutose (1:1)	Jenczak et al., 2015

Em que, V_S e V_D referem-se à velocidade de síntese metabólica e à degradação do metabólito x_i , respectivamente, e b_i é o transporte líquido para fora do sistema metabólico definido (necessidade anabólica (estimado a partir da composição celular) menos o fluxo de absorção/excreção na célula (determinado experimentalmente)).

Combinando os balanços mássicos para “m” compostos, uma equação matricial é obtida (Equação 2.2).

$$\frac{dX}{dt} = S \cdot v - b \quad 2.2$$

Sendo, X um vetor de dimensão “m” da quantidade de metabólito por célula ($\mu\text{mol.gbiomassa}^{-1}$), v o vetor de “n” fluxos metabólicos, S a matriz estequiométrica de dimensões $m \times n$, e b o vetor da demanda metabólica.

As constantes de tempo características das transições metabólicas são muito pequenas, quando comparadas às constantes de tempo do crescimento celular e da dinâmica do processo e, então, os balanços mássicos de transição podem ser considerados em regime permanente ($dX/dt = 0$) (EDWARD; PALSSON, 1998; SAVINELL; PALSSON, 1992) (Equação 2.3).

$$S \cdot v = b \quad 2.3$$

Pode-se admitir, que os compostos que não realizam troca com o exterior da célula estão em regime pseudo-estacionário (ROELS, 1983). Se a fração molar do composto na célula é muito pequena (como é geralmente para o caso do ATP, NADH, NADPH e precursores), a velocidade de acúmulo é nula (BIDEAUX, 2000), ou seja, o valor de b_i é nulo para um metabólito j intracelular. No vetor b, apenas os valores dos compostos de troca com o exterior da célula são desconhecidos. Todos os termos do vetor v são desconhecidos. A equação do balanço mássico pode ser escrita então de forma matricial (Figura 2.9).

A equação do balanço de fluxo, representada na Figura 2.9, é tipicamente indeterminada ($m < n$) e não pode ser resolvida por eliminação de Gauss. Assim, informações suplementares são úteis para poder resolver o sistema para todos os fluxos metabólicos (EDWARDS; PALSSON, 1998).

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para resolver esta equação. Alguns pesquisadores utilizam medidas de fluxos extracelulares para determinar o sistema, enquanto outros utilizam medidas de fluxos intracelulares para determinar a distribuição dos fluxos. Uma forma de determinar os fluxos intracelulares é a condução

de experimentos utilizando substratos enriquecidos com ^{13}C , em que a fração dos metabólitos pode ser medida por ressonância magnética nuclear (NMR) ou cromatografia gasosa acoplada com espectro de massa (GC-MS) (EDWARDS; PALSSON, 1998; IWATANI; YAMADA; USUDA 2008).

Figura 2.9: Equação do balanço mássico escrita sob forma matricial.

$$\begin{pmatrix} s_{11} & s_{12} & \dots & s_{1n} & -1 & 0 & \dots & 0 \\ s_{21} & s_{22} & \dots & s_{2n} & 0 & -1 & \dots & -1 \\ \vdots & \vdots & & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ s_{m1} & s_{m2} & \dots & s_{mn} & 0 & 0 & \dots & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} v_1 \\ \vdots \\ v_n \\ r_i \\ \vdots \\ r_m \end{pmatrix} = (S_{mn} - I_m) R_{n+m} = 0$$

A medida dos fluxos intracelulares é difícil de ser realizada. Assim, uma abordagem mais geral para analisar a distribuição dos fluxos da rede metabólica implica na utilização de técnicas de otimização linear, que permitem escolher uma única solução possível para o sistema de equações do balanço de massa. Na verdade, juntar a estequiometria e as reações permite estimar as restrições sobre as quantidades de nutrientes específicos que são úteis para o crescimento e o metabolismo, e assim, determinar a distribuição dos nutrientes nas vias metabólicas. De forma geral, as restrições são fixadas e permitem reduzir o grau de liberdade do sistema de equações, que representam a célula, de uma infinidade de soluções à um grupo de expressões algébricas resultantes dos balanços mássicos (VARMA, PALSSON, 1994).

Através da otimização linear, uma solução particular pode ser encontrada ao se fixar um objetivo e procurar seu valor máximo ou mínimo no domínio definido pela estequiometria (SAVINELL; PALSSON, 1992). Savinell e Palsson (1992) mostraram que a otimização linear pode fornecer informações úteis sobre os objetivos do metabolismo celular, as interações dos nutrientes com as necessidades da célula, os rendimentos em energia e biomassa e, a sensibilidade do crescimento às limitações das diferentes reações.

Segunda etapa: Definição do modelo a partir do metabolismo proposto.

Nesta etapa, verifica-se a consistência de todas as reações com relação às limitações termodinâmicas: as reações irreversíveis devem ter

uma direção de fluxo coerente com as leis da termodinâmica para todas as condições existentes. A verificação dos sinais de todas as velocidades de reação deve ser realizada para se evitar que a velocidade reacional não respeite as leis da termodinâmica (VANROLLEGHEM; HEIJNEN, 1998).

Terceira etapa: Estimativa dos parâmetros desconhecidos.

Alguns coeficientes estequiométricos do metabolismo podem permanecer desconhecidos após a avaliação dos dados bioquímicos disponíveis na literatura. Deve-se então atribuir valores a estes parâmetros, ajustando-se o modelo aos dados experimentais de diferentes situações (VANROLLEGHEM; HEIJNEN, 1998).

Quarta etapa: Verificação dos parâmetros estimados.

A verificação dos coeficientes estimados na terceira etapa é realizada através da conferência, por exemplo, dos valores positivos para a razão P/O e manutenção, e das limitações termodinâmicas (VANROLLEGHEM; HEIJNEN, 1998).

Quinta etapa: Validação do modelo.

A validação do modelo é realizada ao verificar se os parâmetros estimados através de condições experimentais, diferentes das utilizados na etapa três, conferem com os resultados experimentais (VANROLLEGHEM; HEIJNEN, 1998).

A análise de fluxos metabólicos foi aplicada na produção de PHAs, a partir de *Cupriavidus necator*, para diferentes substratos, como lactato, acetato e butirato (GROUSSEAU et al., 2013; KATOH et al., 1999; SHI; SHIRAISHI; SHIMIZU, 1997; SHIMIZU, 2002). Grousseau et al. (2013) aplicaram a AFM para compreender o comportamento de *C. necator* crescendo e produzindo P(3HB), a partir de ácido butírico. Os autores impuseram uma limitação em fósforo para induzir a produção do polímero e forneceram este nutriente em condições limitantes durante algumas horas da fase de produção. Na etapa final do cultivo o acúmulo do polímero se deu em condição de exaustão em fósforo. Através da AFM os autores simularam o rendimento limite em P(3HB) (considerando que nenhum subproduto era produzido) quando NADPH é produzido por diferentes vias (ciclo do ácido cítrico (TCA), enzima málica (EM) e Entner-Doudoroff (ED)), e verificaram que quando o NADPH é produzido pelo TCA ou pela EM, o rendimento em P(3HB) é de 0,67 Cmol.Cmol⁻¹, e que quando o NADPH é produzido pela ED, o rendimento limite é de 0,89 Cmol.Cmol⁻¹. Logo, o direcionamento da produção de NADPH pela ED leva a maiores rendimentos em P(3HB), a partir de ácido butírico. Este direcionamento ocorre quando um crescimento celular residual é mantido durante a fase

de produção, já que a via de ED é necessária para a produção de precursores metabólicos do crescimento. Esta afirmação foi confirmada pelos autores, pois, quando a velocidade específica de crescimento foi mantida em $0,05 \text{ h}^{-1}$ durante a fase de produção, o rendimento limite experimental em P(3HB) foi de $0,82 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$ e, quando não houve crescimento celular ($\mu_{Xr} = 0 \text{ h}^{-1}$), o rendimento experimental foi de $0,7 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$.

Lopes (2010) utilizou simulações a partir da Análise de Fluxos Metabólicos para otimizar a produção de P(3HB) a partir de xilose por *Bacillus* sp. MA3.3 e *Burkholderia sacchari* IPT101, e verificou que, através da utilização desta ferramenta para o redirecionamento dos fluxos metabólicos, foi possível aumentar acúmulo e rendimento de P(3HB). Mendonça et al. (2013) aplicaram a AFM para encontrar a distribuição de fluxos que levasse à maior conversão teórica de glicose e ácido hexanóico em P(3HB-co-3HHx) por *B. sacchari*. Os resultados mostraram que a conversão das fontes de carbono em polímero foi próxima à máxima conversão teórica, porém, apenas 2 % do ácido hexanóico foi convertido em unidades 3HHx. Os autores propõem que diferentes frações de glicose e ácido hexanóico devem ser avaliadas a fim de melhorar essa conversão.

Katoh et al. (1999) aplicaram a AFM para verificar a influência do NH_3 na produção de biomassa celular de *C. necator* e na produção de P(3HB) a partir de lactato. Os autores verificaram que, em excesso de NH_3 o NADPH produzido no TCA foi utilizado preferencialmente na conversão do α -cetoglutarato em ácido glutamínico, enquanto em concentrações limitantes de NH_3 , o NADPH foi direcionado para a produção de P(3HB), com consecutiva redução dos fluxos do ciclo do glioxilato.

Gombert et al. (2001) construíram um modelo metabólico para *Saccharomyces cerevisiae*, visando verificar a influência da concentração de glicose no crescimento do microrganismo. Dois experimentos foram realizados pelos autores, um em sistema batelada e excesso de glicose, no qual a cepa cresceu com μ de $0,37 \text{ h}^{-1}$ e outro em sistema contínuo com baixa concentração de glicose, no qual a cepa cresceu com μ de $0,1 \text{ h}^{-1}$. Os autores verificaram os fluxos dos metabólitos intracelulares através da técnica de enriquecimento da glicose com ^{13}C . A partir do resultado da AFM, foi possível verificar que na cultura em batelada, 16,2 de cada 100 moléculas de glicose consumidas pela célula entraram na via das pentoses fosfato, enquanto no cultivo contínuo 44,2 de cada 100 moléculas entraram nesta via.

Também verificaram que o TCA não opera como um ciclo em excesso de glicose.

O melhoramento da capacidade de uma cepa produzir um determinado produto é um dos maiores problemas encontrados na otimização de um processo biotecnológico. A engenharia metabólica é uma ferramenta importante para construção de microrganismos mais eficientes, porém para aplicar esta ferramenta, é necessária a obtenção de informações sobre as vias metabólicas e sua regulação (IWATANI; YAMADA; USUDA, 2008).

Zhao et al. (2015) utilizaram informações da AFM para entender a distribuição dos fluxos na cepa *Enterobacter aerogenes*, durante a produção de H_2 a partir da glicose, e usaram estas informações para aplicar a engenharia genética na tentativa de melhorar a produção do H_2 . Dois mutantes foram obtidos pelos autores, um com deleção do gene responsável pela produção do lactato e outro com a deleção do gene responsável pela produção do etanol (a produção do lactato e do etanol consome NADH, que é fundamental estar em excesso no interior da célula para a obtenção de H^+ pelas vias do formato e do NADH, nesta cepa). Posteriormente, os autores aplicaram novamente a AFM para entender a divisão dos fluxos nos mutantes obtidos. O mutante com a deleção do gene responsável pela produção de etanol não apresentou melhoria na eficiência da produção de H_2 e a AFM revelou que a via do formato foi inibida neste caso, e apenas a via do NADH foi responsável pela produção do H_2 .

2.4.3 Modelagem matemática

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 (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

O principal objetivo da modelagem matemática de processos biotecnológicos é prever o comportamento dinâmico e estacionário destes processos, prever condições operacionais ótimas e auxiliar no controle de processos. Uma vez que as reações bioquímicas são muito mais complexas do que as reações puramente químicas, devido ao meio

de cultivo complexo e à conversão dos reagentes em produto que ocorre, normalmente, em baixas velocidades, pois, o microrganismo precisa sintetizar os catalisadores das reações, encontra-se grande dificuldade na formulação de modelos matemáticos que representem adequadamente estes processos (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

Para que um modelo seja capaz de prever com precisão um processo biotecnológico, uma descrição completa das vias e interações metabólicas pertinentes ao desenvolvimento microbiano deveria ser realizada, o que é praticamente impossível. Felizmente, muitas simplificações podem ser feitas utilizando uma média das várias interações em questão, sem afetar de forma significativa o resultado final. Assim, na elaboração de modelos de processos biotecnológicos, são, geralmente, introduzidas simplificações, de maneira a se obter modelos passíveis de serem manuseados e generalizados (ROELS, 1983).

Os chamados “modelos fenomenológicos” baseiam-se na formulação de hipóteses e correlações teóricas ou empíricas para explicar os fenômenos e o comportamento das variáveis de processo, observados experimentalmente. Estes modelos devem levar em conta os preceitos de conservação da massa, e de princípios físico-químicos, para fornecer resultados mais realísticos do que os modelos puramente empíricos. Porém, é frequente o cálculo de parâmetros a partir de equações empíricas (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

Além das equações de balanço de massa baseadas em princípios físico-químicos e termodinâmicos, equações de velocidade de transporte de solutos, geração ou consumo de espécies normalmente são consideradas e obtidas a partir de resultados experimentais. As equações que representam as velocidades de transporte, geração e consumo, não podem ser generalizadas, pois são específicas para cada tipo de bioprocessos (BONOMI; SCHMIDELL, 2001). Os modelos fenomenológicos são divididos, com relação ao número de componentes usados na representação celular, em dois grupos principais: modelos estruturados e modelos não estruturados (ROELS, 1983).

2.4.3.1 Modelos não estruturados

Os modelos não estruturados, também conhecidos como modelos tipo “caixa preta”, são baseados na observação cinética macroscópica do biorreator. O material celular é representado por uma única variável, normalmente a concentração da biomassa no meio, sem levar em conta

sua composição, ou considerar alterações de composição na previsão do comportamento cinético do processo (BIDEAUX, 2000).

Para estudar a dinâmica de um processo biotecnológico, deve-se buscar identificar os processos que alteram o estado das populações envolvidas, que fenômenos ambientais afetam as velocidades de alteração de estado das populações e como estas velocidades são afetadas, além de como o ambiente é afetado pelas alterações do estado das populações (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

Estes modelos geralmente são baseados na equação de Monod (MONOD, 1942) (Equação 2.4):

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_S + [S]} \quad 2.4$$

Sendo μ a velocidade específica de crescimento da biomassa (X), μ_{\max} a velocidade específica máxima de crescimento e K_S a constante de saturação.

As constantes que aparecem nessas equações são empíricas e podem ser determinadas por linearização dos dados experimentais. Equações similares podem ser escritas para o consumo dos substratos e produção dos produtos (ROELS, 1983). No caso do consumo de substrato, uma das equações mais aplicadas é a equação de Pirt (1966) (Equação 2.5).

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_S \quad 2.5$$

Sendo q_S a velocidade específica de consumo de substrato, $Y_{X/S}$ o fator de conversão de substrato em biomassa (X) e m_S o coeficiente de manutenção celular a partir do substrato (S).

Os dados baseados nas equações cinéticas de Monod e Pirt fornecem resultados satisfatórios em nível macroscópico (ROELS, 1983). Muitos outros modelos que visam melhorar o modelo de Monod já foram propostos na literatura, como é o caso do crescimento inibido pelo próprio substrato proposto por Andrews (1968) (Equação 2.6).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_S + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}} \quad 2.6$$

Sendo K_I uma constante de inibição.

Para a formação do produto associada ao crescimento, a equação clássica está representada na Equação 2.7 (ROELS, 1983).

$$q_P = \frac{\mu}{Y_{P/S}} \quad 2.7$$

Com q_P sendo a velocidade específica de formação do produto e $Y_{P/S}$ o fator de conversão de substrato em produto (P).

Os modelos não estruturados fornecem resultados corretos se os mecanismos intracelulares estão em regime permanente, ou em regime transiente se o único produto for a biomassa. Se mudanças ambientais afetarem estes mecanismos, o modelo não reflete mais a realidade. A compreensão da transformação dos substratos em produto no interior do metabolismo não pode ser obtido (ROELS, 1983).

2.4.3.2 Modelos estruturados

Os modelos estruturados levam em conta as alterações de composição dos microrganismos, permitindo descrever o estado das células e sua adaptação às mudanças do meio ambiente (BONOMI; SCHMIDELL, 2001). Eles podem ser utilizados no lugar dos modelos não estruturados, por exemplo, nos casos em que as constantes de tempo das alterações ambientais são da ordem de grandezas dos mecanismos de adaptação intracelular do microrganismo (ROELS, 1983). Somente nas condições de crescimento balanceado, que na prática são obtidos apenas em sistemas contínuos, é que a formulação de modelos não estruturados é perfeitamente justificada, caso contrário, apenas a concentração total da biomassa não é suficiente para uma representação adequada dos dados experimentais (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

O inconveniente destes modelos é que eles podem necessitar de complexas e numerosas moléculas constituintes da biomassa, além de ser difícil de verificá-los experimentalmente devido ao número elevado de componentes (ROELS, 1983).

É por estas razões que os primeiros modelos estruturados utilizados eram simples extensões dos modelos não estruturados, com três ou quatro variáveis especificando as propriedades da biomassa. Estes modelos são geralmente chamados de modelos compartimentados e permitem uma melhor descrição do sistema com equações matemáticas mais complexas e um número de parâmetros suficientemente pequeno para permitir uma verificação experimental (BIDEAUX, 2000).

Nestes modelos, o vetor dos componentes do sistema é decomposto em duas partes, sendo uma parte biótica x (intracelular) e uma parte abiótica y (extracelular), expressas em concentração por unidade de volume. O vetor das concentrações bióticas (C_x - Equação 2.8) pode ser expresso também por unidade de biomassa $X = x/C_x$, com C_x a concentração de biomassa (ROELS, 1983).

$$C_x = \sum_i x_i M_i \quad 2.8$$

Sendo M_i a massa molar do composto i . Assim,

$$\sum_i X_i M_i = 1 \quad 2.9$$

As equações cinéticas são formuladas em termos de concentrações intrínsecas. É possível derivar uma equação pelo conhecimento da dinâmica de troca dos compostos bióticos (considerando-se volume constante (representado pelo ponto sobre o símbolo)).

$$(\dot{X}C_x)' = r\alpha_x + \Phi_x = \dot{X}C_x + X\dot{C}_x \quad 2.10$$

Sendo Φ_x o vetor das velocidades de transporte (fluxo), r as velocidades de reação e α_x a matriz estequiométrica para a parte biótica. Ou,

$$\dot{C}_x = r_x + \Phi_x \quad 2.11$$

Com $r_x = r\alpha_x M$, e M o vetor coluna da massa molar de diferentes compostos. Assim,

$$\dot{X} = \frac{r\alpha_x - r_x X}{C_x} \quad 2.12$$

Desta forma um modelo estruturado poderá ser baseado nas Equações 2.13 e 2.14 e 2.15 (ROELS, 1983):

$$\text{- Fase biótica:} \quad y = r\alpha_x + \Phi_y \quad 2.13$$

$$\text{- Fase abiótica:} \quad \dot{X} = \frac{r\alpha_x + r_x X}{C_x} \quad 2.14$$

$$\text{- Biomassa total:} \quad \dot{C}_x = r_x + \Phi_x \quad 2.15$$

Muitos trabalhos na literatura relatam a aplicação de modelos estruturados à bioprocessos. A medição de variáveis, como concentração de células, de substratos e produtos, *on line* é muitas vezes difícil. Bideaux, Goma e Uribealrea (2008) propuseram um modelo metabólico que descreve as inúmeras reações bioquímicas (metabolismo) que ocorrem no interior das células para que o substrato

seja transformado em produto ou biomassa celular. Assim, desde que algumas velocidades específicas, como de consumo de O_2 , de CO_2 e de íons NH_3 sejam obtidas *on line*, o modelo metabólico pode ser utilizado para prever todas as outras velocidades específicas (crescimento, consumo de substratos e formação de produtos), e a biomassa pode ser estimada, assim como a concentração de outros metabólitos.

Spoljaric et al. (2013) construíram um modelo estruturado visando melhorar a eficiência de *C. necator* em crescer e produzir P(3HB) a partir de glicerol. O modelo foi construído a partir de uma simplificação baseada na AFM do consumo de glicerol para este microrganismo. Os autores verificaram que, abaixo de 5 g.L^{-1} de glicerol, a velocidade específica de crescimento sofria uma redução, e, abaixo de 3 g.L^{-1} , a velocidade específica de produção de P(3HB) tinha este mesmo comportamento. Porém, se nitrogênio fosse suplementado em concentrações limitantes durante a fase de produção em concentrações de glicerol abaixo de 5 g.L^{-1} , melhores produtividades de processo eram alcançadas. Diferentes condições de alimentação de glicerol e nitrogênio foram simuladas e os autores definiram que a relação C/N de $93 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{g}_{\text{nitrogênio}}$ fornece os melhores resultados.

Dias et al. (2005) desenvolveram um modelo estruturado com o objetivo de investigar uma alimentação ótima de acetato e amônia que maximizasse o acúmulo de P(3HB) a partir de uma cultura mista. O modelo mostrou-se bastante exato na descrição dos processos experimentais realizados, e desta forma, pode ser aplicado em estudos de otimização de processo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS E MEIO DE CULTIVO

O microrganismo utilizado foi a bactéria *Cupriavidus necator* DSM 545 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Alemanha), mutante de forma espontânea para a utilização da glicose. O microrganismo foi mantido congelado em caldo nutriente e glicerol (1:1 (v/v)) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Todos os experimentos foram realizados a partir de dois pré-cultivos. No primeiro pré-cultivo, as células foram inoculadas em caldo nutriente (CN), contendo peptona de carne ($5,0\text{ g.L}^{-1}$) e extrato de carne ($3,0\text{ g.L}^{-1}$) e, no segundo pré-cultivo, foi utilizado o meio mineral (MM1) sem limitação de nitrogênio, descrito por Aragão et al. (1996) com modificações.

O meio mineral (MM1) continha (em g.L^{-1}): glicose 40,0, KH_2PO_4 1,0, citrato de amônio e ferro III 0,06, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5, ácido nitrilotriacético 0,19, ureia 2,27 (equivalente a 1 g.L^{-1} de nitrogênio) e elementos traço 1 mL.L^{-1} . A solução de elementos traço apresentou a seguinte composição (em g.L^{-1}): H_3BO_3 0,3, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,03, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,02 e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,01.

O primeiro pré-cultivo foi realizado em frascos erlenmeyer aletados de 500 mL, contendo 150 mL de caldo nutriente. O segundo pré-cultivo foi realizado em frascos erlenmeyer aletados de 1000 mL, contendo 400 mL de meio mineral. Ambos os pré-cultivos foram incubados em agitador orbital (New Brunswick Sci. Company Inc., New Jersey, USA) a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 150 rpm durante 24 horas.

3.2 CULTIVOS

A metodologia dos cultivos realizados no decorrer do desenvolvimento da tese está descrita no item Resultados e Discussões para facilitar a compreensão do trabalho.

3.3.1 Amostragem

Amostragens foram realizadas em intervalos de duas horas para todos os experimentos. A cada amostragem, seis alíquotas, de 2 mL, foram coletadas em microtubos e centrifugadas a 14.000 rpm por 3 min. Os sobrenadantes foram congelados e posteriormente utilizados para as

análises de consumo de açúcares redutores totais (ART), nitrogênio e fósforo ao longo do cultivo. Os precipitados foram lavados com 1 mL de água destilada, sendo 3 amostras submetidas à secagem (análise gravimétrica) e 3 amostras congeladas para posterior análise de proteína e quantificação do polímero produzido.

3.3.2 Determinação da concentração de biomassa

A biomassa foi determinada por espectrometria durante o cultivo e, posteriormente, por gravimetria.

A determinação por espectrometria foi realizada através da leitura da absorbância do meio de cultivo em espectrofotômetro (modelo SF325NM, Tecnal Equipamentos para laboratórios, Piracicaba, São Paulo) a 600 nm (DO_{600}).

A determinação da concentração celular foi realizada através de análise gravimétrica, em que o precipitado, obtido após a centrifugação de 2 mL da amostra, foi submetido à secagem em estufa a 100 °C por 24 h. Após este tempo, as amostras foram colocadas em dessecador por 20 min e pesadas.

3.3.3 Determinação de açúcares redutores totais, nitrogênio e fósforo

A determinação de açúcares redutores totais foi realizada pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). O nitrogênio foi determinado utilizando-se o *kit* Ureia ES (Gold Analisa), que determina ureia pelo método enzimático-colorimétrico, em que a ureia, por meio da ação enzimática, foi decomposta em nitrogênio amoniacal e determinado por colorimetria. O fósforo foi quantificado pela metodologia que utiliza molibdato de amônio, descrita por Colombié (2005). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

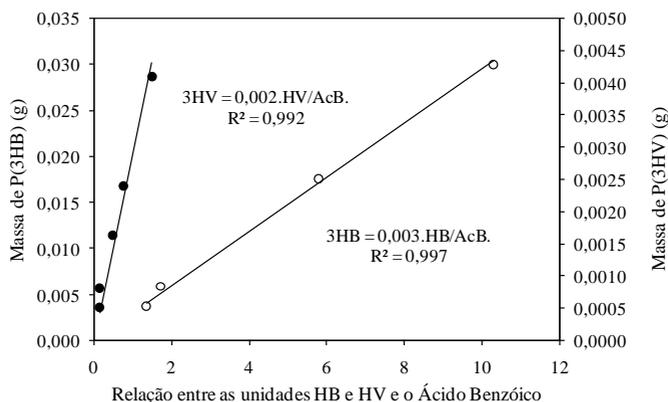
3.3.4 Determinação da concentração de PHA

A concentração de PHA foi determinada por cromatografia gasosa, conforme o método de metanólise baseado em Brandl et al. (1988).

Após descongelamento das amostras, o precipitado foi ressuspenso em um volume de 2 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol acidificado, contendo ácido benzóico 0,4 g.L⁻¹ como padrão interno e 15 % de H₂SO₄, com agitação em vórtex. A mistura foi então aquecida a

100 °C durante 140 min em banho-maria. Depois de 60 min de aquecimento, a mistura foi agitada em agitador tipo vórtex durante alguns segundos e devolvida ao aquecimento por mais 80 min. Ao término, fez-se o resfriamento em banho de gelo, adicionou-se 1 mL de água destilada e as amostras foram agitadas durante 30 s. A fase orgânica (inferior) foi retirada com uma pipeta *Pasteur* e armazenada sob refrigeração para posterior análise em cromatografia gasosa. A curva padrão foi feita utilizando-se o poli(3-hidroxiobutirato) ou poli(3-hidroxiobutirato-co-3-hidroxi valerato) contendo 12 % de unidades 3HV (ambos da Sigma), como padrão externo, com massa variando entre 0,0010 a 0,03 g (Figura 3.1). A curva padrão foi estabelecida através da relação das áreas de PHA/padrão interno e a massa de polímero. Submeteu-se os padrões à mesma metanólise que as amostras.

Figura 3.1: Exemplo de curva padrão obtida após metanólise e utilizada para quantificação de PHA por cromatografia gasosa. Unidades de HB (○) e unidades HV (●).



Para os cultivos apresentados na primeira parte dos Resultados e Discussões, utilizou-se uma coluna empacotada (1,8 m x 2 mm) com fase: 20 % 100 supelcoport W (100/120 Mesh), para a dosagem dos PHAs. O cromatógrafo foi um SHIMADZU GC-2014 equipado com detector de ionização de chama (FID ar-hidrogênio). O gás de arraste foi o nitrogênio com vazão constante de 20 mL.min⁻¹. As temperaturas de injeção, detecção e coluna foram respectivamente 230, 250 e 140 °C.

Para os demais cultivos realizados, utilizou-se uma coluna capilar com sílica fundida Rtx[®]-Wax (Crossbond[®] polyethylene glycol - 30m x 0,25mm x 0,25 µm), para a dosagem dos PHAs. O cromatógrafo foi um

SHIMADZU GC-14B equipado com detector de ionização de chama (FID ar-hidrogênio). O gás de arraste foi o nitrogênio com vazão constante de 40 mL.min⁻¹. As temperaturas de injeção, detecção e coluna foram respectivamente 250, 250 e 120 °C.

3.3.5 Determinação da proteína intracelular

A determinação da concentração de proteína celular ao longo dos cultivos foi realizada pelo método do biureto com modificações (ARAGÃO, 1996). As amostras de precipitado congeladas foram utilizadas nestas análises. A biomassa foi ressuspensa em 5,5 mL de água destilada e 1 mL de NaOH 100 g.L⁻¹ foi adicionado à suspensão, a qual foi, incubada a 100 °C por 5 minutos. Após resfriamento, 167 µL de CuSO₄ 25 % (m/v) foram adicionados e a solução foi agitada em agitador tipo vórtex. O sobrenadante obtido após centrifugação à 5000 rpm durante 10 minutos foi analisado em espectrofotômetro à 560 nm. Quando a massa de biomassa total (Xt) ultrapassou 4 mg no microtubo, as amostras foram diluídas de forma que a concentração de Xt fosse inferior a esta, para que a lise celular fosse eficiente. Utilizou-se albumina bovina (*Bovine Serum Albumine* - BSA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) como padrão. A curva padrão foi realizada a partir de soluções de albumina bovina com concentrações entre 0 e 4 g.L⁻¹.

A composição das proteínas da biomassa é diferente da composição do BSA. Realizou-se então uma correção levando em conta o número de ligações peptídicas por grama de proteína no BSA (0,88 ligações.g⁻¹ (Friedli, 1996)) e para *C. necator* (0,94 ligações.g⁻¹ (Aragão, 1996)).

3.4 TRATAMENTO DOS DADOS

Uma vez que o acúmulo de PHA é intracelular, é importante a definição dos termos a seguir, para melhor entendimento da metodologia adotada para os cálculos:

Xt (biomassa total) = biomassa contendo PHA intracelular

Xr (biomassa residual) = Xt – PHA intracelular

Considerando um sistema contínuo em reator homogêneo apresentado na Figura 3.2, tem-se para um composto i em g.L⁻¹ a seguinte equação de balanço de massa:

$$\frac{d(C_i.V)}{dt} = r_i.V + Q_E.C_{iE} - Q_S.C_i \quad (3.1)$$

Sendo:

r_i = velocidade líquida de formação (sinal positivo) ou consumo (sinal negativo) do composto i ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

Q_E = vazão volumétrica de entrada (L.h^{-1});

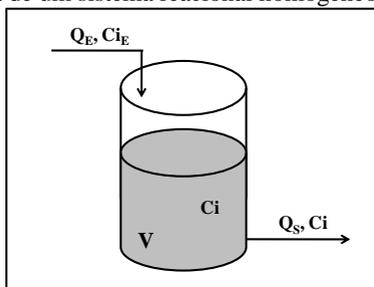
Q_S = vazão volumétrica de saída (L.h^{-1});

C_{iE} = concentração do composto na entrada do sistema (g.L^{-1});

C_i = concentração de do composto na saída do sistema (g.L^{-1});

V = volume reacional (L).

Figura 3.2: Esquema de um sistema reacional homogêneo.



Para sistemas em modo batelada alimentada e batelada sequencial (com ou sem reciclo externo de células) é necessário considerar os efeitos de diluição, referentes às alimentações de substrato, e das amostragens, que não modificam a concentração, mas devem ser levadas em conta. As grandezas mássicas de biomassa residual (X_r) e PHA produzidos, e substratos (S) consumidos, foram recalculados de forma a torná-los equivalentes a uma cultura batelada.

Para X_r :

$$X_r = X_r(t).V(t) + \sum_{t=0}^t X_r(t).V_{ret}(t) \quad (3.2)$$

Para PHA:

$$PHA = PHA(t).V(t) + \sum_{t=0}^t PHA(t).V_{ret}(t) \quad (3.3)$$

Para S :

$$S = S(t).V(t) + \sum_{t=0}^t S_E(t).V_{ad}(t) - \sum_{t=0}^t S(t).V_{ret}(t) \quad (3.4)$$

Sendo:

S_E = concentração do substrato na solução de alimentação (g.L^{-1});
 V = Volume (L), recalculado a cada instante t a partir do volume inicial (V_i) somado ao volume de substrato adicionado (V_{ad}), subtraído do volume amostrado (V_{ret}) (Equação 3.5).

$$V(t) = V_i + V_{ad}(t) - V_{ret}(t) \quad (3.5)$$

OBS: No caso dos pulsos com reciclo externo de células, os termos $X_r(t).V(t)$ e $PHA(t).V(t)$ são nulos durante o reciclo, e considerados apenas nos volumes de amostragem.

Um ajuste polinomial foi realizado aos dados mássicos obtidos após este tratamento, com auxílio do *software* Lissage (desenvolvido por Simões, Arroyo e Uribebarrea, *Institut National des Sciences Appliquées* - Toulouse, França). A partir destes ajustes, determinaram-se as velocidades específicas de crescimento celular (μ_{Xr}) e produção de PHA (q_P), as produtividades global (Prod) e da fase de produção de PHA (Prod_P), as produções mássicas globais (Prod_M) e de fase de produção (Prod_MP) e os fatores de conversão de substrato em célula ($Y_{Xr/S}$) e de substrato em PHA ($Y_{P/S}$).

3.4.1 Produtividade global de PHA (Prod)

A produtividade global de PHA foi calculada pela Equação 3.6:

$$\text{Prod} = \frac{PHA_t - PHA_{t_0}}{t} \quad (3.6)$$

Em que:

Prod = produtividade global em PHA ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

PHA_t = concentração de PHA no tempo t (g.L^{-1});

PHA_{t_0} = concentração de PHA no tempo t_0 inicial (g.L^{-1});

t = tempo total de processo (h).

3.4.2 Produtividade na fase de produção de PHA (Prod_P)

A produtividade da fase de produção de PHA (Equação 3.7):

$$\text{Prod}_P = \frac{PHA_t - PHA_{t_{0P}}}{t - t_{0P}} \quad (3.7)$$

Sendo:

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

PHA_t = concentração de PHA no tempo t (g.L^{-1});

$PHA_{t_{0P}}$ = concentração de PHA no tempo t_{0P} (g.L^{-1});

t = tempo (h);

t_{0P} = tempo inicial da fase de produção (h).

3.4.3 Produção mássica de PHA (Prod_M)

A produção mássica de PHA foi calculada pela Equação 3.8:

$$\text{Prod}_M = \frac{M_{\text{PHA}_t} - M_{\text{PHA}_{t_0}}}{t} \quad (3.8)$$

Em que:

Prod_M = velocidade global de produção de PHA ($\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$);

M_{PHA_t} = massa de PHA no tempo t (g);

$M_{\text{PHA}_{t_0}}$ = massa de PHA no tempo t_0 inicial (g);

t = tempo total de processo (h).

3.4.4 Produção mássica de PHA na fase de produção (Prod_MP)

A produção mássica de PHA na fase de produção foi obtida pela Equação 3.9:

$$\text{Prod}_{MP} = \frac{M_{\text{PHA}_t} - M_{\text{PHA}_{t_{0P}}}}{t - t_{0P}} \quad (3.9)$$

Sendo:

Prod_MP = velocidade de fase de produção de PHA ($\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$);

M_{PHA_t} = massa de PHA no tempo t ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

$M_{\text{PHA}_{t_{0P}}}$ = massa de PHA no tempo t_{0P} ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

t = tempo (h);

t_{0P} = tempo inicial da fase de produção (h).

3.4.5 Velocidades específicas de crescimento celular e produção de PHA

A partir dos perfis de crescimento celular e formação de produto, foi possível determinar, as velocidades instantâneas de crescimento microbiano (dX_r/dt) e de formação de produto ($d\text{PHA}/dt$). Dividindo-se as velocidades instantâneas pela massa celular residual no tempo t , as velocidades específicas de crescimento celular (μ_{X_r}) e formação de produto (q_P) foram obtidas (Equações 3.10 e 3.11).

$$\mu_{X_r} = \frac{1}{X_r} \cdot \frac{dX_r}{dt} \quad (3.10)$$

$$q_P = \frac{1}{X_r} \cdot \frac{d\text{PHA}}{dt} \quad (3.11)$$

Na fase exponencial de crescimento, μ_{Xr} é máximo (μ_{Xrmax}) e constante. O valor de μ_{Xrmax} foi calculado através da Equação 3.12 com os dados de Xr da fase exponencial. Integrando-se a Equação 3.8 de $t = 0$ a t (fase exponencial), é possível obter uma equação de primeiro grau (Equação 3.12), sendo Xr_0 a massa inicial de Xr .

$$\ln\left(\frac{Xr}{Xr_0}\right) = \mu_{Xrmax} \cdot t \quad (3.12)$$

Nos gráficos de μ_{Xr} o microrganismo cresce primeiramente de forma exponencial, em que μ_{Xrmax} foi considerado e, posteriormente, a velocidade de crescimento decai ao longo do tempo, em que a curva é fornecida pelos valores calculados pela Equação 3.10.

3.4.6 Fatores de conversão

Os fatores de conversão de substrato em célula ($Y_{Xr/G}$, $Y_{Xr/N}$, $Y_{Xr/P}$), e substrato em PHA ($Y_{Pr/G}$) foram calculados por meio do coeficiente angular da reta obtida relacionando-se a massa celular ou a massa de PHA com o consumo mássico de substrato (carbono, nitrogênio e fósforo) ao longo do tempo.

3.4.7 Determinação do oxigênio dissolvido

A concentração do oxigênio dissolvido (OD) no meio de cultivo foi medida continuamente através de um eletrodo polarográfico (Mettler-Toledo, Germany), sendo os dados salvos com auxílio de um *software* de aquisição de dados, para posterior análises do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) e velocidade de respiração celular (QO_2Xr).

3.4.8 Transferência de oxigênio durante o cultivo: determinação do k_{La} e QO_2

Durante o cultivo, oxigênio é injetado no biorreator e parte dele dissolve-se no meio líquido. Determinada quantia deste oxigênio é consumido pelo microrganismo para manutenção e crescimento celular. O balanço de oxigênio apresentado na Equação 3.13 representa este fenômeno.

$$\frac{dCO}{dt} = k_{La}(C_{SO} - CO) - QO_2Xr \quad (3.13)$$

Sendo:

QO_2 : velocidade específica de respiração ($gO_2.g_{Xr}^{-1}.h^{-1}$)

k_La : coeficiente volumétrico de transferência de O_2 (h^{-1})

C_{SO} : concentração de saturação de O_2 dissolvido no líquido ($gO_2.L^{-1}$)

CO : concentração de oxigênio no meio líquido ($gO_2.L^{-1}$)

Xr : concentração de biomassa residual ($g_{Xr}.L^{-1}$)

A variação da concentração de OD no líquido é o resultado da diferença entre a quantidade que se consegue dissolver ($k_La (C_{SO} - CO)$) e o oxigênio consumido pelo microrganismo (QO_2Xr). A cinética do cultivo está considerada na equação anterior, pois Xr varia com o tempo e QO_2 varia com μ_{Xr} , atingindo seu valor máximo quando $\mu_{Xr} = \mu_{Xrmax}$.

A determinação do k_La e da QO_2 foi realizada com emprego do método dinâmico (SCHMIDELL, 2001). Por este método, em determinado instante do cultivo, interrompe-se a aeração para anular a transferência de oxigênio. Conforme ilustra a Figura 3.3, a concentração de OD (CO_0), no instante inicial começa a diminuir e o sinal do sensor é registrado continuamente. Ao se atingir certo valor (CO_{01}), retoma-se a aeração nas condições anteriores e registra-se o aumento da concentração de OD até atingir novamente o valor inicial (CO_0). Este procedimento deve levar somente alguns minutos, dependendo do estágio do cultivo, sendo importante que a concentração de O_2 não atinja valores críticos que prejudiquem o metabolismo. Nesse curto espaço de tempo, pode-se supor que não ocorre aumento de Xr e que QO_2 se mantém constante.

Para o trecho sem aeração, tem-se a Equação 3.14.

$$\frac{dCO}{dt} = -QO_2Xr \quad (3.14)$$

Com a consideração anterior de que QO_2 é constante, a Equação 3.14 pode ser integrada resultando na Equação 3.15.

$$CO = CO_0 - QO_2Xr.(t - t_0) \quad (3.15)$$

A Equação 3.15 prevê uma variação linear com o tempo no trecho sem aeração, sendo t_0 o tempo de início do corte da aeração. Assim, foi obtido o valor de QO_2 através do coeficiente angular QO_2Xr e do valor de Xr ao longo do tempo de cultivo.

O valor de k_La foi determinado com a utilização dos dados obtidos durante o aumento da concentração do OD, ilustrado pelo segundo trecho da Figura 3.3, na qual a Equação 3.13 foi aplicada integralmente. Assim, rearranjando-se a Equação 3.13, obtém-se a Equação 3.16.

$$\frac{dCO}{dt} = k_L a \left(C_{SO} - \frac{QO_2 X_r}{k_L a} \right) - k_L a \cdot CO \quad (3.16)$$

Considerando estado estacionário no momento que antecede a interrupção da aeração ($CO = CO_0$), chega-se à Equação 3.17.

$$CO_0 = C_{SO} - \frac{QO_2 X_r}{k_L a} \quad (3.17)$$

Introduzindo a Equação 3.15 na Equação 3.17, obtém-se a Equação 3.18.

$$\frac{dCO}{dt} = k_L a \cdot (CO_0 - CO) \quad (3.18)$$

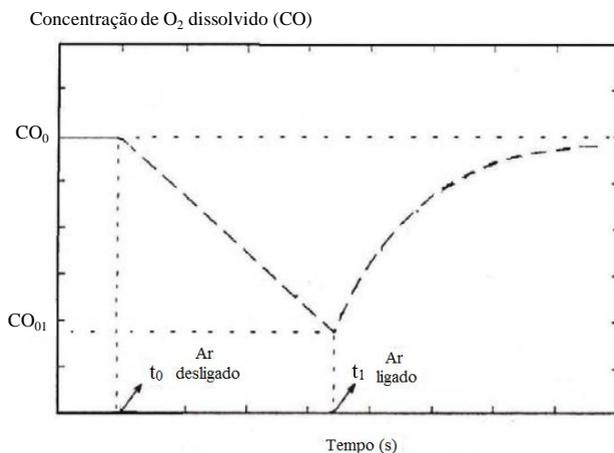
Essa equação pode ser integrada, lembrando que para o instante inicial de retomada da agitação e aeração, ou seja, para $t = t_1$, tem-se $C = C_{01}$, e chega-se à Equação 3.19.

$$\ln \left(\frac{CO_0 - CO}{CO_0 - CO_{01}} \right) = -k_L a \cdot (t - t_1) \quad (3.19)$$

Assim, isolando-se CO , e realizando um ajuste não linear aos dados experimentais representados pela segunda parte da Figura 3.3, encontra-se o valor de $k_L a$.

Os *softwares* utilizados para calcular os dados $QO_2 X_r$ e $k_L a$ ao longo do cultivo, a partir da metodologia descrita acima, foram *Microsoft Office Excel 2007* e *Statistica 6.0*.

Figura 3.3: Ilustração para explicar o método dinâmico utilizado para determinar $k_L a$ e QO_2 .



Fonte: adaptado de Schmidell (2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O item Resultados e Discussões foi dividido em três partes.

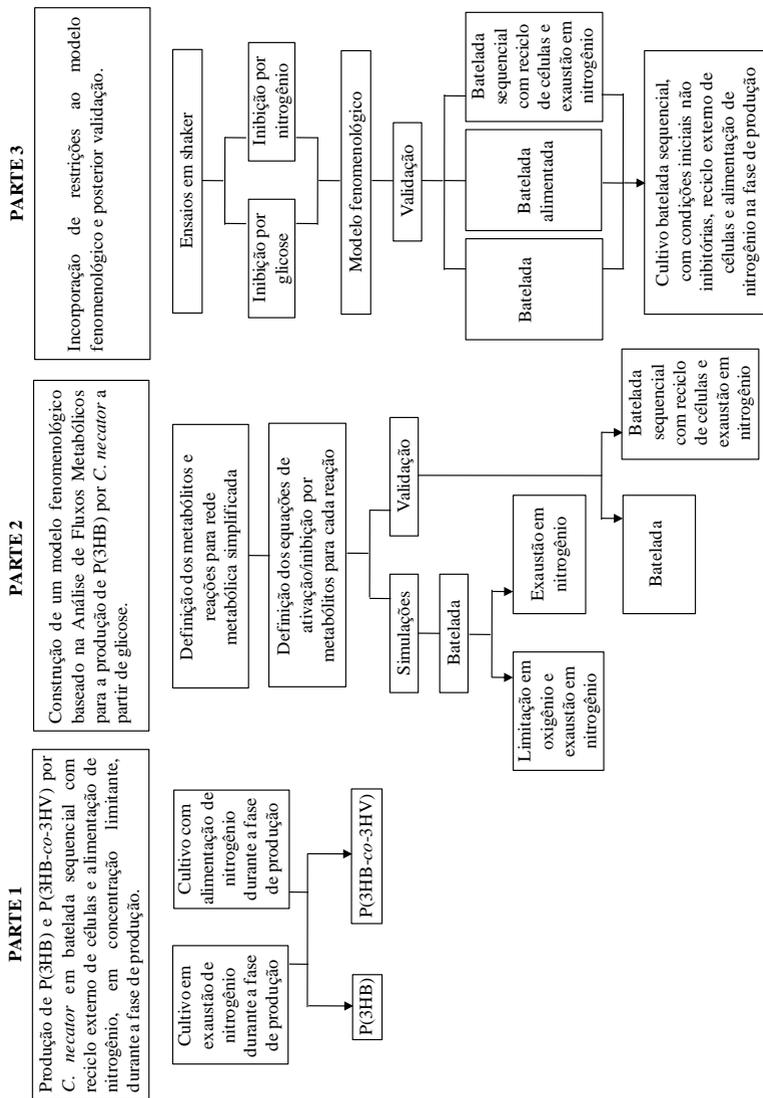
Primeiramente, foram realizados cultivos em batelada sequencial com reciclo externo de células, visando a produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) a partir de substrato com baixa concentração de carbono (glicose) e ácido propiônico (para produção do copolímero), por *C. necator*, nas condições de exaustão da fonte de nitrogênio e alimentação limitante deste nutriente durante a fase de produção. Através destes cultivos, buscou-se avaliar a influência da alimentação limitante de nitrogênio na fase de produção na obtenção de alta densidade celular, na produtividade volumétrica do processo e na incorporação das unidades de 3HV, durante a produção do copolímero.

Posteriormente, um modelo fenomenológico baseado na Análise de Fluxos Metabólicos (AFM) para produção de P(3HB) a partir de glicose, por *C. necator*, foi proposto. Este modelo tem por objetivo auxiliar na predição da produção do polímero em diferentes estratégias de cultivo, dentro dos limites do modelo, permitindo obter, além dos resultados de produção de P(3HB), uma melhor compreensão das características do metabolismo deste microrganismo. Esta primeira versão do modelo foi validada a partir de um cultivo batelada e um cultivo batelada sequencial com reciclo externo de células.

Por fim, estudos para avaliação da inibição pelo substrato (glicose e nitrogênio) foram realizados visando o aprimoramento do modelo. O modelo foi, então, validado a partir de cultivos batelada, batelada alimentada e batelada sequencial com reciclo externo de células, e então, um cultivo batelada sequencial com reciclo externo de células, em condições que propiciassem o aumento de produtividade do processo foi apresentado.

A Figura 4.1 apresenta um resumo das divisões do presente trabalho e o capítulo de Resultados e Discussões seguirá o que é apresentado nesta figura. Para facilitar a compreensão do texto, a descrição de cada cultivo será feita antes da apresentação dos resultados. Os itens comuns de metodologia, utilizados em todas as partes da Tese estão apresentados no item Material e Métodos.

Figura 4.1: Descrição das etapas e cultivos realizados para cada parte do presente trabalho.



4.1 PRODUÇÃO DE P(3HB) E P(3HB-co-3HV) POR *C. necator* EM BATELADA SEQUENCIAL COM RECICLO EXTERNO DE CÉLULAS E ALIMENTAÇÃO DE NITROGÊNIO, EM CONCENTRAÇÃO LIMITANTE, DURANTE A FASE DE PRODUÇÃO.

Neste item serão apresentados a metodologia e os resultados de produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) por *C. necator*, quando o sistema de reciclo externo de células, proposto por Ienczak et al. (2015), é aplicado, utilizando-se substrato com baixa concentração de carbono.

Este estudo teve como objetivo avaliar o comportamento do sistema, em termos de produção de biomassa residual e PHA, quando a fase de produção é conduzida em condição de exaustão da fonte de nitrogênio ou alimentação limitante deste nutriente. Apesar de estudos na literatura afirmarem que aumentos de produtividade do processo, em termos de polímero acumulado, ocorrem na condição de alimentação de nitrogênio (ou outro nutriente essencial) em concentração limitante na fase de produção (ARAGÃO et al. 1996; GROUSSEAU et al. 2014; LEE et al., 1993), o estudo desta variável no processo com reciclo é importante, uma vez que o sistema é bastante dinâmico e a concentração dos demais nutrientes oscila durante todo o processo.

Além disso, sabe-se que o copolímero P(3HB-co-3HV) possui características mais interessantes, em termos de elasticidade e moldagem, quando comparado ao P(3HB), e que a fração de unidades 3HV no copolímero é determinante na obtenção destas características. A avaliação da incorporação das unidades de 3HV no processo com reciclo, alimentado ou não com nitrogênio na fase de produção, é fundamental a fim de se estabelecer condições de cultivo que conduzam a um polímero com características definidas.

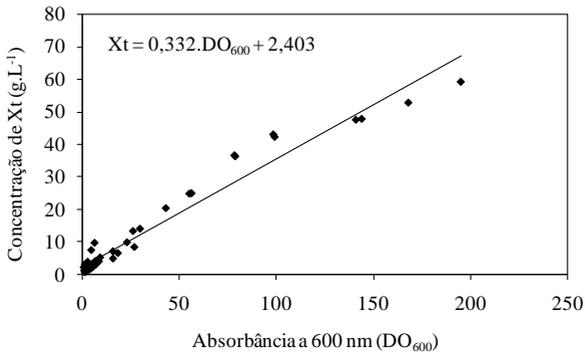
4.1.1 Metodologia para produção de PHAs em modo batelada sequencial com reciclo externo de células com e sem alimentação de nitrogênio na fase de produção

4.1.1.1 Metodologia para produção de PHAs em modo batelada sequencial com reciclo externo de células sem alimentação (exaustão) de nitrogênio na fase de produção

Os cultivos foram conduzidos de acordo com metodologia proposta por Ienczak et al. (2015), em que, inicialmente, as células cresceram em modo descontínuo até a obtenção de aproximadamente

$15 \text{ g}_{X_r} \cdot \text{L}^{-1}$, baseado na estimativa da densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) em correlação previamente estabelecida (curva de absorvância *versus* concentração de biomassa – Figura 4.2). Após este período inicial de crescimento celular, os pulsos com reciclo externo de células foram iniciados, ocorrendo a retirada de um determinado volume de meio (corte) isento de células e, a seguir, efetuando-se a alimentação do mesmo volume da solução de alimentação (pulsos).

Figura 4.2: Correlação entre a DO_{600} e a concentração de biomassa por gravimetria



Os cortes foram realizados por meio de duas membranas de microfiltração, sendo o permeado coletado e descartado, e as células recirculadas para o biorreator. Foram utilizados módulos de filtração tangencial do tipo membranas tubulares, capilares, de polipropileno, autoclaváveis, modelo MD020 CP 2N (Mycroclin Nadir, FRINGS DO BRASIL Engenharia e Comércio Ltda, Piracicaba – SP), com diâmetro de poro igual a $0,2 \mu\text{m}$, com área de filtração de $0,1 \text{ m}^2$ cada e pressão máxima de 3 bar. O sistema de filtração foi autoclavado por 15 min. a $121 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para realizar os pulsos, dois frascos de alimentação contendo solução com moderada concentração de glicose foram preparados, sendo um frasco para a fase de crescimento celular (Frasco 1) e outro frasco para a fase de produção (Frasco 2).

A composição dos sais e dos elementos traço no meio de cultivo e nos dois frascos de alimentação de meio foi idêntica, e igual à apresentada para o MMI no item 3.1. As concentrações de glicose, nitrogênio e fósforo no meio de cultivo, e nos frascos de alimentação, estão descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Concentração de glicose, nitrogênio e fósforo no meio de cultivo e nos frascos de alimentação, para os cultivos em modo batelada sequencial com reciclo externo de células.

	Meio de cultivo (g.L ⁻¹)	Frasco 1 (fase de crescimento) (g.L ⁻¹)	Frasco 2 (fase de produção) (g.L ⁻¹)
Glicose	60	90	90
Nitrogênio (Ureia)	4	4	-
Fósforo (KH ₂ PO ₄)	1	1	1

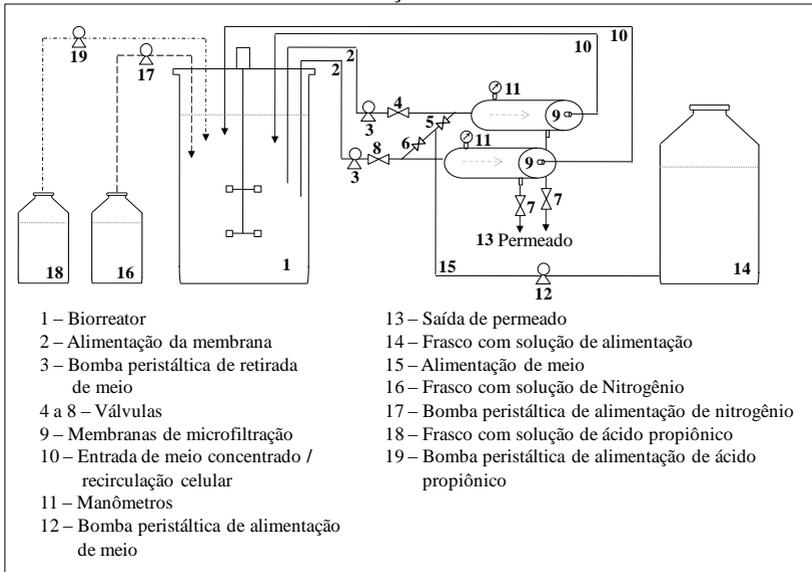
Os cultivos foram realizados em biorreator de 5 L (BIOFLO III, New Brunswick Scientific CO, New Jersey, USA), com volume inicial de 4 L. O biorreator e os frascos de alimentação, contendo a solução do meio final (com exceção da ureia, da glicose e do KH₂PO₄), foram autoclavados durante 20 min. a 121 °C. No início dos cultivos, adicionou-se asepticamente volume adequado das soluções de glicose (solução mãe com 500 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (27 g.P.L⁻¹) e ureia (200 g.N.L⁻¹), de forma a obter as concentrações desejadas para início do cultivo, tanto no biorreator quanto nos frascos de alimentação, conforme indicado na Tabela 4.1. Durante os cultivos, a temperatura foi mantida em 35 °C e o pH ajustado a 7,0 com soluções de NaOH 100 g.L⁻¹ ou HCl 274 mL.L⁻¹. As condições iniciais de agitação e aeração foram de 450 rpm e 0,1 vvm, respectivamente, sendo aumentadas gradualmente de forma a se manter a concentração de oxigênio dissolvido superior a 30 % em relação à saturação com ar atmosférico. O inóculo representou 10 % do volume inicial (400 mL), sendo o polipropilenoglicol utilizado como antiespumante e adicionado sempre que necessário.

A Figura 4.3 mostra um esquema do aparato experimental necessário para a realização dos experimentos com reciclo externo de células.

Duas bombas (WATSON MARLOW PUMPS - 323 S Drive 15 - 400 rpm – US, número 3 na Figura 4.3) foram usadas para recirculação da biomassa entre o biorreator e as duas membranas externas, com vazão de operação de 60 L.h⁻¹ cada. Vale ressaltar que as duas membranas utilizadas no cultivo operaram de forma independente e em paralelo. Outra bomba (Bomba Peristáltica New Brunswick - Continuous Culture Console, número 12 na Figura 4.3), operando com vazão de 30 L.h⁻¹, foi conectada para alimentação das soluções de alimentação através das membranas. Vale ressaltar que apesar da vazão

das bombas serem iguais a 60 L.h^{-1} , a vazão de coleta do permeado, durante a etapa de remoção de meio, era inferior a este valor, sendo reduzida ao longo do cultivo proporcionalmente ao aumento da concentração celular.

Figura 4.3: Esquema ilustrativo do aparato experimental utilizado para os cultivos visando a produção de PHA por *C. necator* a partir da alimentação com substrato contendo moderada concentração da fonte de carbono.



Fonte: Adaptado de Ienczak (2011).

No início do pulso com reciclo de células, as duas bombas na posição 3 eram acionadas, para bombear o meio do biorreator pelas membranas de microfiltração de forma independente. Neste instante, as válvulas 4 e 8 (Figura 4.3) eram abertas (para permitir o fluxo de meio de cultivo pelas membranas), assim como as válvulas na posição 7 (coleta do permeado), mantendo-se fechadas as válvulas 5 e 6. Após a retirada de meio isento de células pelo permeado, as bombas na posição 3 eram desligadas e as válvulas 4, 7 e 8 fechadas. Em seguida, iniciava-se a alimentação de meio de cultivo (frasco 14), acionando-se a bomba na posição 12 e a válvula 5 era aberta (a abertura desta válvula permite a passagem do meio de cultivo do frasco de alimentação pelo interior de uma das membranas, carregando o meio de cultivo com células remanescentes para dentro do biorreator e realizando uma limpeza no

interior da membrana e da tubulação). Após a alimentação de um determinado volume de solução de alimentação, a válvula 5 era fechada para a abertura da válvula 6, efetuando-se a alimentação de meio pelo interior da outra membrana, até que todo o volume retirado pelo permeado fosse alimentado ao biorreator (nesta etapa realizava-se a limpeza da outra membrana, carregando o meio de cultivo com células, remanescentes em seu interior, para dentro do biorreator. Foram utilizados dois manômetros (ACEPIL, Zurich (número 11 na Figura 4.3)) com o objetivo de controlar a pressão do sistema.

Na fase de crescimento houve somente um corte de 1 L de meio, sendo posteriormente efetuada a alimentação do mesmo volume com a solução do Frasco 1 (Tabela 4.1). Na fase de produção foram realizados diversos cortes, retirando-se um litro de meio e, posteriormente, efetuada a alimentação do mesmo volume com a solução do Frasco 2 (Tabela 4.1). Apenas no primeiro corte da fase de produção, 1,5 L de solução do Frasco 2 foi alimentado ao biorreator, ao invés de 1 L. Este procedimento foi adotado para garantir a elevada concentração de glicose no início da fase de produção, além de repor parte do volume de meio de cultivo removido no decorrer do experimento, devido às amostragens periódicas.

O cultivo em modo batelada sequencial com reciclo externo de células visando a produção de P(3HB-co-3HV) por *C. necator*, a partir de glicose e ácido propiônico, seguiu o mesmo procedimento descrito acima. Entretanto, o ácido propiônico foi alimentado ao sistema de forma constante a partir do momento em que ocorreu a limitação da fonte de nitrogênio ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrogênio).

Kim, Kim e Choi (1992) reportaram uma redução de 80 % na velocidade específica de crescimento de *C. necator* em concentrações de ácido propiônico superiores a $0,5 \text{ g.L}^{-1}$. Desta forma, considerou-se que o volume de reação mantinha-se constante e igual a 4 L, efetuando-se a alimentação de forma a manter a concentração de ácido propiônico no meio abaixo de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, através de uma vazão de alimentação de 20 mL.h^{-1} de uma solução de 80 g.L^{-1} deste ácido, conforme descrito no trabalho de Squio (2003). Para adição do ácido propiônico utilizou-se uma bomba peristáltica da marca WATSON MARLOW PUMPS, modelo 323 S Drive 3 - 400 rpm – US (bomba na posição número 19 na Figura 4.3).

4.1.1.2 Metodologia para produção de PHAs em modo batelada sequencial com reciclo externo de células e alimentação de nitrogênio na fase de produção

A estratégia de alimentação de concentrações limitantes de nitrogênio na fase de produção, visando à produção de P(3HB) e de P(3HB-*co*-3HV), foi baseada no trabalho de Aragão (1996).

Ao iniciar-se a fase de produção, definida neste trabalho como o momento em que a concentração de nitrogênio no meio é igual a $0,1 \text{ g.L}^{-1}$, foi realizada uma alimentação constante da fonte de nitrogênio ($0,12 \text{ g}_N \cdot \text{h}^{-1}$), de forma a manter $dX_r/dt = 0,2 \text{ g}_{X_r} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, até o final do cultivo. A fonte de nitrogênio (solução mãe) foi uma solução concentrada de ureia a $3 \text{ g}_N \cdot \text{L}^{-1}$ e o fator de conversão considerado para realização dos cálculos foi $Y_{X_r/N} = 6,5 \text{ g}_{X_r} \cdot \text{g}_N^{-1}$ (SCHMIDT, 2011). Para adição da solução de nitrogênio utilizou-se uma bomba peristáltica da marca WATSON MARLOW PUMPS, modelo 323 S Drive 3 - 400 rpm – US (bomba na posição número 17 na Figura 4.3).

O cultivo em modo batelada sequencial com reciclo externo de células e alimentação de nitrogênio em concentração limitante durante a fase de produção, visando a produção de P(3HB-*co*-3HV) seguiu o procedimento descrito acima. Além do ácido propiônico, nitrogênio foi alimentado ao biorreator em concentração limitante durante a fase de produção.

4.1.2 Resultados da produção de PHA em modo batelada sequencial com reciclo externo de células com e sem alimentação de nitrogênio na fase de produção

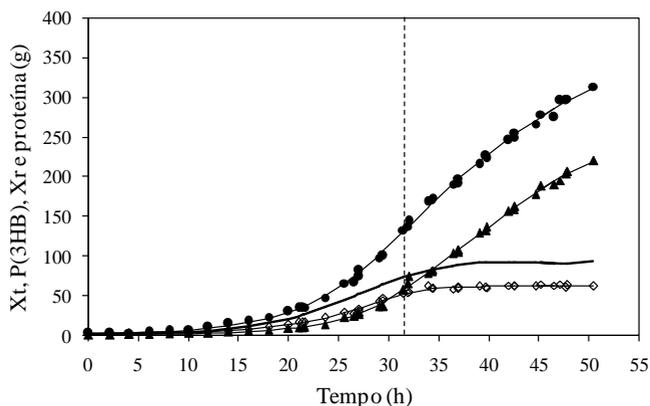
4.1.2.1 Produção de P(3HB) em modo batelada sequencial com reciclo externo de células e exaustão de nitrogênio na fase de produção

A condução destes experimentos ocorreu conforme descrito no item 4.1.1.1, ou seja, após a concentração de nitrogênio alcançar valores limitantes ($0,1 \text{ g}_N \cdot \text{L}^{-1}$) no meio de cultivo, a fonte de nitrogênio (ureia) não foi mais alimentada ao mesmo. O sal citrato de amônio e ferro III foi alimentado ao biorreator durante os pulsos (Frasco 2) porém, a cada pulso, $0,0015 \text{ g}_N \cdot \text{L}^{-1}$ foi fornecido ao meio através deste sal. Desta forma, pode-se considerar que a condução da fase de produção se deu em exaustão de nitrogênio.

Os dados de biomassa total (X_t), P(3HB), biomassa residual (X_r) e proteína celular (valores mássicos), para o cultivo visando a produção de P(3HB) com exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de

produção, estão apresentados na Figura 4.4. Ao final deste cultivo, houve a produção de 93 g ($24,5 \text{ g.L}^{-1}$) de Xr e 218,7 g ($57,5 \text{ g.L}^{-1}$) de P(3HB), representando 70,16 % de biopolímero.

Figura 4.4: Evolução da biomassa total (Xt (●)), P(3HB) (▲), biomassa residual (Xr (—)) e proteína (◇) para o cultivo visando a produção de P(3HB) com exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de produção com reciclo de células. As linhas contínuas representam os ajustes aos dados experimentais realizados com auxílio do *software* Lissage. A linha pontilhada representa o momento da limitação da fonte de nitrogênio ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$).

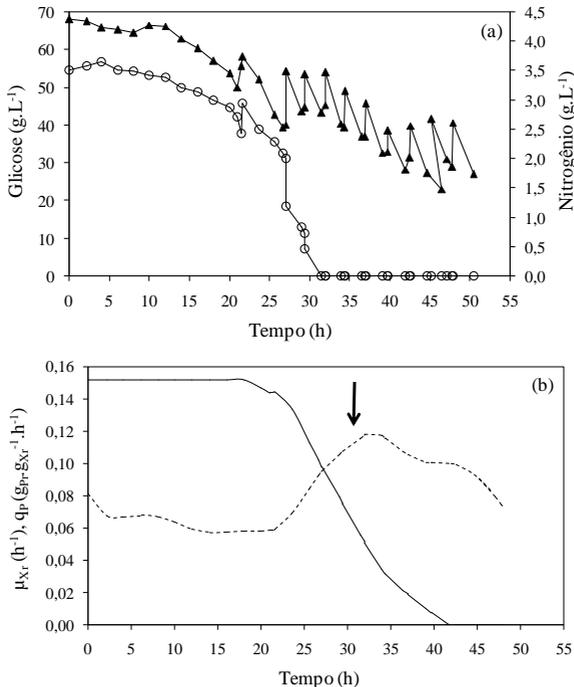


Os dados referentes à concentração de nitrogênio e de glicose, em g.L^{-1} , ao longo do cultivo podem ser visualizados na Figura 4.5 (a). Como é possível verificar, realizaram-se, no total, 10 pulsos, em que um litro de meio de cultivo, isento de células, foi retirado do biorreator e um litro de meio de cultivo rico em nutrientes foi adicionado ao mesmo, de forma a manter as concentrações de nutrientes dentro dos valores desejados (com exceção do terceiro pulso no qual 1,5 L de meio de cultivo foi alimentado ao biorreator de forma a repor o volume das amostragens realizadas). O tempo médio para retirada do meio de cultivo foi de 20 min e a pressão máxima atingida pelo sistema durante a filtração foi de 1,5 bar. O tempo para alimentação do meio ao biorreator levou aproximadamente 2 min.

Na Figura 4.5 (b) são observados os comportamentos da velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ_{Xr}) e de produção de P(3HB) (q_p) para este cultivo. Ao observar o μ_{Xr} , percebe-se que o microrganismo cresceu exponencialmente nas primeiras 20 h, apresentando um $\mu_{Xr\text{max}}$ de $0,152 \text{ h}^{-1}$. Posteriormente, houve um

decréscimo na velocidade específica que, após 40 h, apresentou valores próximos a zero. No momento da limitação da fonte de nitrogênio o μ_{Xr} era igual a $0,06 \text{ h}^{-1}$. A velocidade específica máxima de produção de P(3HB) (q_{Pmax}) foi igual a $0,12 \text{ g}_{Pr} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e atingiu este valor logo após a limitação em nitrogênio, com aproximadamente 32 h. Posteriormente houve um decréscimo na velocidade específica de produção do polímero até o final do cultivo.

Figura 4.5: (a) Concentração de glicose (\blacktriangle) e de nitrogênio (\circ); (b) Evolução da velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ_{Xr} (---)) e de produção de P(3HB) (q_p (---)) ao longo do tempo para o cultivo visando a produção de P(3HB) com exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. A flecha indica o momento da limitação da fonte de nitrogênio ($0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$).



De acordo com Aragão et al. (1996) e Ienczak et al. (2011), a velocidade específica de produção do polímero está associada à velocidade específica de crescimento do microrganismo, durante a fase de produção. Estes autores mostram que a alimentação de nitrogênio em concentrações limitantes durante a fase de produção pode levar à

manutenção dos valores de μ_{Xr} e, conseqüentemente q_p , por um tempo superior.

A velocidade específica de produção de P(3HB) (q_p) apresentou valor médio de $0,06 \text{ g}_{Pr} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ na fase de crescimento exponencial, o que levou a um acúmulo de 30 % de P(3HB) já nas primeiras 20 h de cultivo. O q_p aumenta após o fim da fase de crescimento exponencial, enquanto ocorre um decréscimo de μ_{Xr} , sendo que a glicose passa a ser direcionada, em maior quantidade, para produção de P(3HB) e, no momento da limitação em nitrogênio ($0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de nitrogênio), o acúmulo de polímero intracelular chegou a 43 %. Aragão (1996) observou q_p de $0,05 \text{ g}_{Pr} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ durante a fase exponencial de crescimento, para *C. necator*, e acúmulo de P(3HB) igual a 20 % ao final dessa fase. Ryu et al. (1997) obteve 30 % de acúmulo de P(3HB) ao fim da fase de crescimento de *C. necator*, utilizando glicose como fonte de carbono, em que a concentração celular residual era de aproximadamente $70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Shang, Jiang e Chang (2003) verificaram uma relação linear entre o aumento da biomassa residual e o aumento do acúmulo de P(3HB) por *C. necator*, a partir de glicose, e obtiveram 30 % de P(3HB) quando $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de Xr haviam sido produzidos.

Apesar do acúmulo de P(3HB) já ter sido observado por outros autores durante a fase de crescimento, nenhum trabalho, dentre a bibliografia consultada, apresenta valores tão elevados quanto o valor obtido no presente trabalho. A concentração inicial de glicose utilizada no presente experimento foi igual a $67 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Khanna e Srivasava (2005b) observaram que concentrações de frutose acima de $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ são inibitórias para *C. necator*, e a concentração de $70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ leva a uma redução de 33 % da velocidade específica máxima de crescimento observada ($0,3 \text{ h}^{-1}$ em $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Concentrações elevadas de glicose, que provocam alterações metabólicas, com conseqüente redução da velocidade específica máxima de crescimento, podem direcionar a glicose para a produção de P(3HB). Além disso, existe a possibilidade de alguma limitação nutricional não planejada, como por exemplo, enxofre ou ferro.

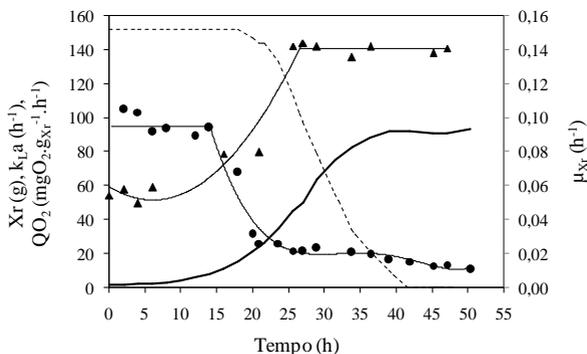
As produtividades global (considerando o tempo total de cultivo com $218,7 \text{ g}_{Pr}$, $50,5 \text{ h}$ de cultivo e $3,8 \text{ L}$ de meio) e de fase de produção (período após a limitação de nitrogênio com $57,1 \text{ g}_{Pr}$ e $4,2 \text{ L}$ de meio no início da fase de produção, 19 h de fase de produção) para este cultivo foram $1,14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e $2,31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente. As produções mássicas de P(3HB) global e de fase de produção foram $4,33 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$ e $8,50 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente. Ienczak et al. (2015) obtiveram produtividade de fase de produção similar a encontrada neste trabalho

($2,17 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) para cultivo batelada sequencial com reciclo externo de células e exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de produção, utilizando solução de glicose e frutose (1:1) como fonte de carbono, para produção de P(3HB) a partir de *C. necator*.

Na Figura 4.6, são apresentados os dados referentes à transferência de oxigênio: coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}), e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2).

Os dados de respiração celular para a bactéria *C. necator* obtidos para este cultivo foram similares aos obtidos por Schmidt (2011), que trabalhou em sistema batelada alimentada utilizando como fonte de carbono uma solução de glicose e frutose (1:1). Os valores máximos encontrados por este autor foram da ordem de $100 \text{ mgO}_2.\text{g}_{Xr}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para o QO_2 e 150 h^{-1} para o k_{La} .

Figura 4.6: Evolução da velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2 (●)), coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La} (▲)), biomassa residual (Xr (—)) e velocidade específica de crescimento celular (μ_{Xr} (---)) ao longo do tempo para o cultivo visando a produção de P(3HB) com exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. As linhas contínuas representam um ajuste aos dados experimentais.



Como é possível observar, a curva do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio apresenta comportamento semelhante à curva de evolução da biomassa residual, apresentando valor máximo quando Xr atinge seu valor máximo. O comportamento da velocidade específica de consumo de oxigênio apresenta comportamento similar ao comportamento da velocidade específica de crescimento. De acordo com Pirt (1975), estas duas variáveis se correlacionam de forma linear.

Aragão (1996) verificou que a composição proteica da biomassa celular se modifica ao longo da fase de produção, quando a produção de

P(3HB) ocorre em exaustão de nitrogênio. O autor verificou que a fração de proteína na biomassa residual reduz de 80 para 40 % entre a fase de crescimento e a fase de produção. No presente trabalho esse mesmo comportamento foi verificado, porém a redução foi menos pronunciada, de 73 % ao final da fase de crescimento para 66 % ao final da fase de produção.

Os fatores de conversão de substratos em célula e carbono em P(3HB) estão apresentados e discutidos no item 4.1.2.5.

4.1.2.2 Produção de P(3HB) com alimentação de nitrogênio durante a fase de produção

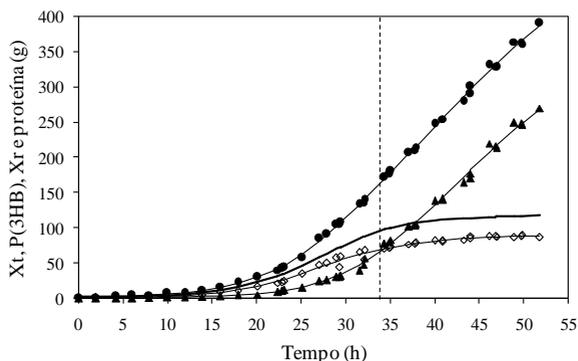
A Figura 4.7 apresenta a evolução da biomassa total (X_t), P(3HB), biomassa residual (X_r) e proteína, ao longo do cultivo visando a produção de P(3HB) com alimentação de nitrogênio durante a fase de produção. Ao final da fase de produção, obteve-se 117,7 g (26,39 g.L⁻¹) de X_r e 273,2 g (61,25 g.L⁻¹) de P(3HB), o que representa 69,9 % de biopolímero. Ambos os valores, de X_r e P(3HB) obtidos neste cultivo foram superiores aos obtidos em exaustão de nitrogênio. Este resultado confirma o que foi obtido anteriormente na literatura para produção de P(3HB), utilizando-se outras estratégias de cultivo (ARAGÃO et al., 1996; GROUSSEAU et al., 2014; LEE et al., 1993). Vale ressaltar que a bomba para alimentação constante da solução de nitrogênio foi acionada no momento da limitação da fonte de nitrogênio, representada pela linha pontilhada na Figura 4.7.

As concentrações de glicose e de nitrogênio ao longo do cultivo podem ser visualizadas na Figura 4.8 (a). Neste cultivo, realizaram-se 9 pulsos, nos quais um litro de meio de cultivo isento de células foi retirado do biorreator e um litro de meio de cultivo rico em nutrientes foi adicionado ao mesmo, de forma a manter as concentrações de nutrientes dentro dos valores desejados (com exceção do pulso 3, no qual 1,5 L de meio de cultivo foi alimentado ao reator). O número de pulsos foi definido de forma a se ter o mesmo tempo de fase de produção entre ambos os cultivos (com e sem alimentação em N) para produção de P(3HB).

Como é possível observar na Figura 4.8 (a), não houve o acúmulo de nitrogênio no meio de cultivo durante a etapa de produção de polímero, sendo que durante toda esta etapa a concentração residual de nitrogênio no meio foi de 0,05 g.L⁻¹. Estes resultados mostram que todo o nitrogênio fornecido foi imediatamente assimilado pelo microrganismo para o crescimento e manutenção celular. Vale ressaltar

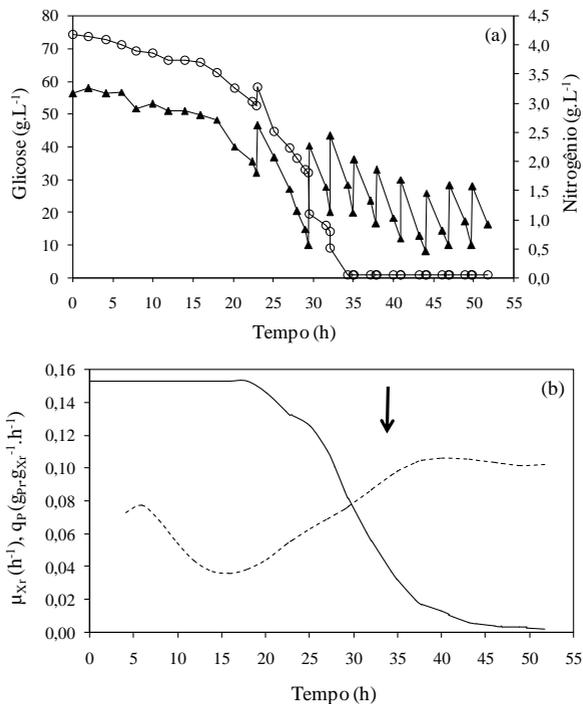
que o nitrogênio foi alimentado de forma constante, e separado dos pulsos, em que a variação de volume do meio durante a etapa de ciclo não foi levada em conta. Ao avaliar o comportamento das curvas de concentração de glicose ao longo do tempo nas Figuras 4.5 (a) e 4.8 (a) percebe-se que no cultivo com alimentação de nitrogênio durante a fase de produção a concentração de glicose permaneceu em níveis mais baixos no meio de cultivo em relação ao cultivo com exaustão de nitrogênio. Neste cultivo, 190 g de glicose foram consumidos a mais do que no cultivo conduzido em exaustão de nitrogênio durante a fase de produção.

Figura 4.7: Dados de biomassa total (X_t (●)), P(3HB) (▲), biomassa residual (X_r (—)) e proteína (◇) para o cultivo visando a produção de P(3HB) com limitação da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. As linhas contínuas representam os ajustes aos dados experimentais realizados com auxílio do *software* Lissage. A linha pontilhada representa o momento da limitação da fonte de nitrogênio ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$).



Na Figura 4.8 (b), verifica-se o comportamento da velocidade específica de crescimento do microrganismo e de produção de P(3HB). Assim como no cultivo com exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de produção, a bactéria apresentou crescimento exponencial desde o início do cultivo até aproximadamente 20 h, apresentando um $\mu_{X_{rmax}}$ de $0,156 \text{ h}^{-1}$. Posteriormente, houve um decréscimo de velocidade e, a partir de 45 h, os valores de μ_{X_r} ficaram próximos a zero.

Figura 4.8: (a) Concentração de glicose (\blacktriangle) e de nitrogênio (\circ); (b) Evolução da velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ_{Xr} (---)) e de produção de P(3HB) (q_p (---)) ao longo do tempo para o cultivo visando a produção de P(3HB) com limitação da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. A flecha indica o momento da limitação da fonte de nitrogênio ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$).



É importante destacar que, apesar do comportamento da velocidade específica de crescimento ser similar entre os dois cultivos, no cultivo com exaustão da fonte de nitrogênio os valores de μ_{Xr} já estavam muito próximos a zero com 40 horas de cultivo, enquanto no cultivo com limitação da fonte de nitrogênio, os valores próximos a zero foram alcançados após 45 horas, o que mostra que a alimentação constante de nitrogênio promoveu a manutenção da velocidade específica de crescimento por mais tempo. No momento da limitação da fonte de nitrogênio, para o cultivo alimentado em N durante a fase de produção, o μ_{Xr} era igual a $0,05 \text{ h}^{-1}$. Este valor é inferior ao valor obtido no cultivo com exaustão da fonte de nitrogênio, e está próximo ao limite crítico proposto por Ienczak et al. (2011). De acordo com estes autores a

fase de produção deve iniciar-se quando o valor de μ_{Xr} estiver entre 0,05 e 0,08 h^{-1} para que a bactéria *C. necator* seja capaz de produzir elevadas quantidades de polímero intracelular. Esperava-se que o μ_{Xr} fosse o mesmo no início da fase de produção para os dois cultivos, uma vez que as condições de crescimento foram similares.

A velocidade máxima de produção de polímero foi inferior à obtida para o cultivo com exaustão da fonte de nitrogênio (0,11 $g_{Pr} \cdot g_{Xr}^{-1} \cdot h^{-1}$) e este valor foi alcançado logo após o início da fase de produção, com aproximadamente 40 horas. Esperava-se obter valores de q_p superiores no cultivo alimentado em nitrogênio durante a fase de produção, porém este comportamento não foi observado, mesmo havendo uma manutenção da velocidade específica de crescimento. Este resultado confirma o limite crítico proposto por Ienczak et al. (2011), e mostra que as concentrações iniciais de substrato e a estratégia de cultivo precisam ser cuidadosamente definidas para evitar que a fase de produção do polímero inicie em valores de μ_{Xr} inferiores a 0,05 h^{-1} .

Uma possível explicação para a necessidade de manutenção da velocidade específica de crescimento, de acordo com Lee et al. (1995), é que altos níveis de NADH e NADPH, que são produtos do ciclo TCA e via Entner-Doudoroff, respectivamente, causam inibição da citrato sintase e isocitrato desidrogenase em *C. necator*. Estes autores também observaram que a síntese de P(3HB) por *C. necator* ocorre a altas velocidades quando altos níveis de NADH e NADPH estão presentes nas células.

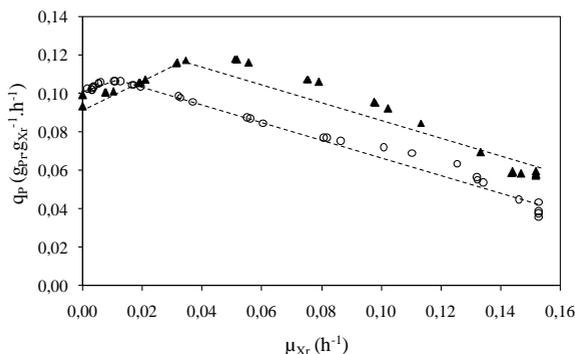
Durante a fase de crescimento, o ciclo TCA ocorre para produção de metabólitos secundários e cofatores (NADH, FADH, etc), que são oxidados na cadeia de transporte de elétrons. Por outro lado, TCA ocorre a baixas velocidades quando um nutriente essencial é limitado (por exemplo, N, Mg, O₂, P), com simultâneo excesso da fonte de carbono. Neste momento, a velocidade específica de consumo de oxigênio decresce (em associação à velocidade específica de crescimento), resultando em um decréscimo da velocidade do ciclo TCA, responsável pela produção de novas células e de NADH. A via Entner-Doudoroff continua a ocorrer para assimilação da glicose e consequente produção de NADPH. Então, os níveis de NADH e NADPH aumentam inibindo a citrato sintase e isocitrato desidrogenase, e a produção de P(3HB) aumenta, já que a enzima β -cetotiolase é ativada, uma vez que os níveis de CoASH decaem devido à redução da velocidade do TCA. No entanto, a velocidade de produção de P(3HB) decresce com o tempo, provavelmente em função da diminuição do nível do cofator NADH (pois este cofator não é mais formado no ciclo

TCA). Portanto, pode-se observar que, para que a síntese de P(3HB) ocorra a altas velocidades, é necessário manter o ciclo TCA em velocidade baixa e os níveis de NADH através da síntese de novas células (IENCZAK et al., 2011).

A Figura 4.9 mostra a relação entre os valores de q_p e μ_{Xr} para os cultivos com exaustão e limitação de nitrogênio durante a fase de produção. Pode-se observar que, no cultivo conduzido em limitação de nitrogênio, apesar dos valores de q_p inferiores aos apresentados sob exaustão de N, os valores de q_p aumentaram até valores inferiores de μ_{Xr} antes de começar a decair. Para o cultivo conduzido em exaustão de nitrogênio a relação entre q_p e μ_{Xr} aumenta até μ_{Xr} em torno de $0,03 \text{ h}^{-1}$ e posteriormente decai. Este comportamento mostra a importância de manter-se um crescimento residual da biomassa durante a fase de produção.

Assim como no cultivo com exaustão de nitrogênio na fase de produção, elevados valores de q_p , com conseqüente acúmulo de P(3HB) na fase de crescimento, foram observados neste cultivo, em que, ao final da fase de crescimento 37 % de P(3HB) havia sido acumulado.

Figura 4.9: Correlação entre q_p e μ_{Xr} para os cultivos conduzidos em exaustão da fonte de nitrogênio (\blacktriangle) e em limitação da fonte de nitrogênio (\circ) durante a fase de produção.



Apesar do valor de q_{Pmax} ter sido menor do que o esperado para este experimento, uma maior produção de polímero foi verificada através dos valores de produtividade global ($273,2 \text{ g}_{Pr}$, $51,75 \text{ h}$ de cultivo e $4,46 \text{ L}$ de meio) e de fase de produção ($52,53 \text{ g}_{Pr}$ e $4,33 \text{ L}$ de meio no início da fase de produção, $19,6 \text{ h}$ de fase de produção) no presente experimento iguais a $1,16 \text{ g.L}^{-1}\text{.h}^{-1}$ e $2,45 \text{ g.L}^{-1}\text{.h}^{-1}$, respectivamente. As produções mássicas de P(3HB) global e de fase de

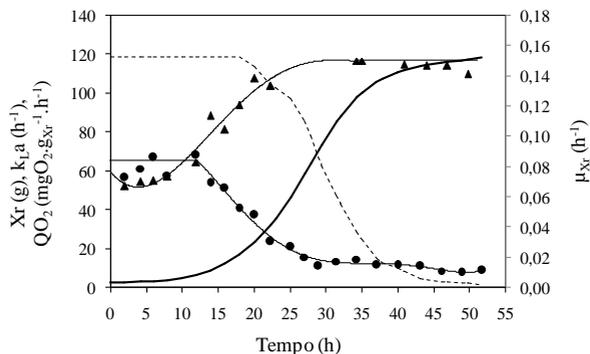
produção foram de $5,28 \text{ g.h}^{-1}$ e $11,26 \text{ g.h}^{-1}$, respectivamente. Ao comparar a produtividade em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, não é possível perceber diferença entre os dois experimentos, porém quando comparadas as produções mássicas, verifica-se que houve aumento de acúmulo de polímero no caso em que nitrogênio foi alimentado em concentrações limitantes durante a fase de produção. Esta divergência ocorre, pois o volume final da cultura alimentada em nitrogênio é superior, uma vez que aproximadamente 1 L de solução de ureia foi alimentada ao reator durante a fase de produção. Em um sistema complexo de cinco reatores CSTR operando em série, Atlié e colaboradores (2011) obtiveram resultados similares aos obtidos neste trabalho para a produção de P(3HB) por *C. necator*: biomassa total de 81 g.L^{-1} contendo 77 % de P(3HB), que resultou em produtividade de $1,97 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, porém os autores utilizaram soluções concentradas de glicose (500 g.L^{-1}) para alimentar o biorreator.

A variação do teor de proteínas intracelulares foi menos pronunciada para este experimento em que, ao fim da fase de crescimento a composição da biomassa apresentava 75 % de proteínas, e ao final da fase de produção esta porcentagem era igual a 72 %, o que mostra que o nitrogênio adicionado foi capaz de suprir as necessidades celulares e um crescimento residual celular pode ser mantido. Comportamento similar foi observado por Aragão (1996), em que o percentual de proteínas intracelulares variou de 80 % na fase de crescimento para 66 % ao final da fase de produção, quando o cultivo foi conduzido com alimentação limitante de nitrogênio na fase de produção.

Aragão (1996) comparou a composição elementar da biomassa de *C. necator* durante a fase de crescimento e ao final dos experimentos conduzidos em exaustão e limitação de nitrogênio, observando que esta redução do teor de proteínas era verificada também na composição elementar. Durante a fase de crescimento a composição elementar da biomassa foi de $\text{CH}_{1,77}\text{O}_{0,44}\text{N}_{0,25}$, em contrapartida ao final da fase de produção em exaustão de nitrogênio a composição era $\text{CH}_{1,61}\text{O}_{0,44}\text{N}_{0,14}$ e, para o caso de limitação da fonte de nitrogênio a composição elementar permaneceu a mesma da fase de crescimento. O autor justifica que esta redução foi observada devido ao acúmulo de compostos lipídicos na parede celular.

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) e a velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2) para este cultivo podem ser observados na Figura 4.10.

Figura 4.10: Evolução da velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2 (●)), coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La (▲)), biomassa residual (X_r (—)) e velocidade específica de crescimento celular (μ_{X_r} (---)) ao longo do tempo para o cultivo visando a produção de P(3HB) com limitação da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. As linhas contínuas representam o ajuste aos dados experimentais.



Assim como no cultivo com exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de produção, o comportamento da curva de k_La foi semelhante ao comportamento da biomassa residual. A ordem de grandeza dos valores máximos de QO_2 para este cultivo foram inferiores aos obtidos no cultivo anterior, resposta que não era esperada já que o $\mu_{X_{rmax}}$ neste experimento foi praticamente igual ao do cultivo conduzido em exaustão de nitrogênio na fase de produção. Os fatores de conversão de substratos em célula e carbono em P(3HB) estão apresentados e discutidos no item 4.1.2.5.

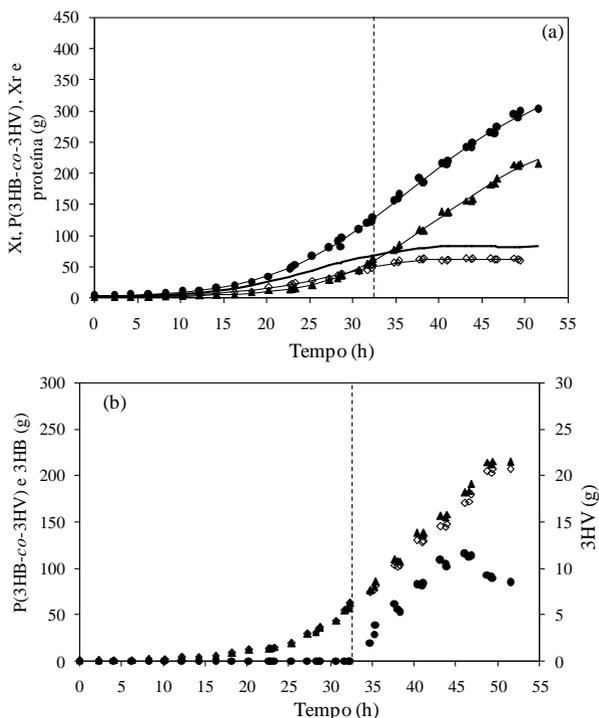
4.1.2.3 Produção de P(3HB-co-3HV) em exaustão de nitrogênio durante a fase de produção

Uma vez que o P(3HB-co-3HV) possui um sistema mais complexo de produção do que a produção de P(3HB), devido à alimentação do ácido propiônico, decidiu-se estudar a produção deste PHA em condição de exaustão e limitação de nitrogênio durante a fase de produção. Aragão et al. (1996) mostraram que a alimentação de nitrogênio durante a fase de produção, em um sistema batelada alimentada, promoveu o aumento de produtividade em P(3HB-co-3HV). O presente trabalho avaliou se este resultado também é encontrado quando o reciclo de células é aplicado, devido à dinâmica imposta por

este sistema. Objetivou-se também avaliar o comportamento da incorporação das unidades de 3HV nestas condições.

Os dados de biomassa total (X_t), P(3HB), biomassa residual (X_r) e proteína, para o cultivo visando a produção de P(3HB-co-3HV) com exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de produção, estão apresentados na Figura 4.11 (a). Ao final deste cultivo, houve a produção de 83,2 g ($20,44 \text{ g.L}^{-1}$) de biomassa residual e 222,15 g ($54,58 \text{ g.L}^{-1}$) de P(3HB-co-3HV), o que representa 72,8 % de PHA intracelular. Do total de polímero produzido, 3,95 % diz respeito às unidades de hidroxivalerato (3HV).

Figura 4.11: (a) Dados de biomassa total (X_t (●)), P(3HB-co-3HV) (▲), biomassa residual (X_r (—)) e proteína (◇); (b) Evolução da produção de P(3HB-co-3HV) (▲), unidades (3HB) (◇) e 3HV (●) para o cultivo visando a produção de P(3HB-co-3HV) com exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. As linhas contínuas representam os ajustes aos dados experimentais realizados com auxílio do *software* Lissage. A linha pontilhada representa o momento da limitação da fonte de nitrogênio ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$).



Na Figura 4.11 (b), é possível visualizar as curvas que representam a produção de P(3HB-co-3HV) e das unidades de 3HB e de 3HV. Considerando-se as condições de alimentação de ácido propiônico (20 mL.h⁻¹ de uma solução de ácido propiônico de 80 g.L⁻¹), em 20 h de fase de produção, 32 g deste substrato foi adicionado ao meio de cultivo. A literatura reporta que o fator de conversão de ácido propiônico em unidades 3HV apresenta um decaimento ao longo da fase de produção, entretanto seu valor médio é de 0,3 g_{3HV}.g_{AP}⁻¹ (Aragão, 1996; Du et al., 2001a). Desta forma, em torno de 9,6 g de 3HV poderiam ter sido produzidos. No presente experimento verificou-se uma produção elevada de unidades 3HV no início da fase de produção, que mostra que o fator de conversão nesta etapa foi superior a 0,3 g_{3HV}.g_{AP}⁻¹, porém ao final do experimento a produção de 8,5 g.L⁻¹ de 3HV foi observada.

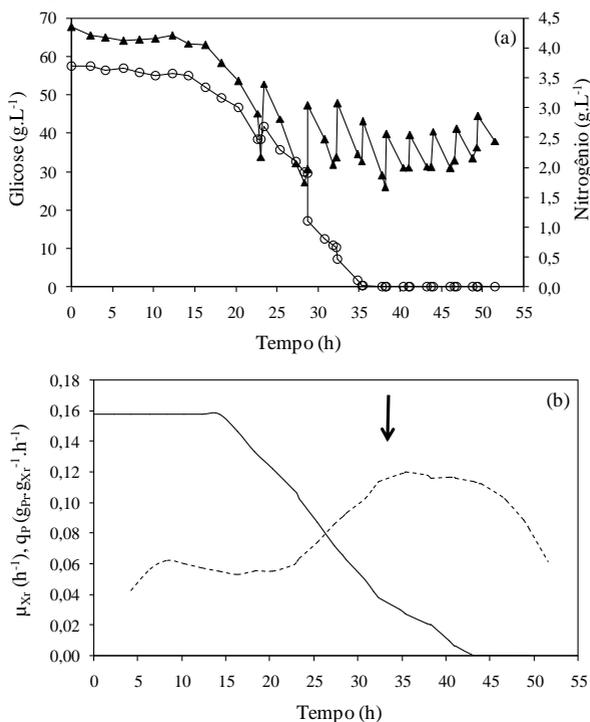
Ao final da fase de crescimento, haviam sido produzidos 46 % de P(3HB) (ácido propiônico não foi fornecido nesta fase). A baixa fração de unidades 3HV obtida pode ser devido a esta elevada produção de P(3HB) na fase de crescimento. Du et al. (2001b) estudaram a produção de P(3HB-co-3HV) por *C. necator*, a partir de glicose e ácido propiônico. Diferentes razões de ácido propiônico/glicose (AP/G) foram fornecidas ao microrganismo durante a fase de produção. Os autores verificaram que houve um aumento na incorporação das unidades de 3HV com o aumento da razão AP/G, de 10 para 30 % nas razões AP/G de 0,1 e 0,2, respectivamente. Entretanto uma resposta contrária foi obtida para a concentração de copolímero acumulado, com decréscimo de 44 para 26 g.L⁻¹, nas razões de 0,1 e 0,2, respectivamente. O tempo de fase de produção foi o mesmo para ambos os casos. Conhecendo estas características de incorporação das unidades 3HV e concentração final de polímero, é possível prever condições experimentais que levem a um copolímero com características específicas e elevada produtividade de processo.

No presente trabalho a glicose e o ácido propiônico foram fornecidos em fluxos separados, não sendo possível determinar a razão AP/G fornecida. Porém, sabendo-se que a concentração de ácido propiônico no meio foi inferior a 0,5 g.L⁻¹ (para evitar inibição celular (KIM; KIM; CHOI, 1992)) e que em média a concentração de glicose no meio durante a fase de produção foi de 40 g.L⁻¹, verifica-se que a razão AP/G esteve muito abaixo (em torno de 0,01) do que a menor razão (0,1) estudada por Du et al. (2001b), que leva a elevadas concentrações de polímero, com baixa fração de unidades 3HV. O comportamento experimental observado por Du et al. (2001b) em um sistema em baletada alimentada, foi confirmado por Yu, Lin e Too

(2005) para um sistema em modo contínuo: quanto maior a razão de ácido propiônico alimentado, maior a fração de unidades 3HV, porém maior a inibição sofrida pelo microrganismo, o que leva a menores concentrações de PHA intracelular.

Os dados referentes à concentração de glicose e de nitrogênio ao longo do cultivo podem ser observados na Figura 4.12 (a). Foram realizados nove pulsos no decorrer do experimento. Iniciou-se a alimentação do ácido propiônico no momento em que ocorreu a limitação da fonte de nitrogênio, com aproximadamente 33 horas de cultivo, induzindo, assim, a produção de unidades 3HV.

Figura 4.12: (a) Concentração de glicose (\blacktriangle) e de nitrogênio (\circ); (b) Evolução da velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ_{xr} (---)) e de produção de P(3HB-co-3HV) (q_p (---)) ao longo do tempo para o cultivo visando a produção de P(3HB-co-3HV) com exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. A flecha indica o momento da limitação da fonte de nitrogênio ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$).



Na Figura 4.12 (b), são apresentados os dados referentes à velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ_{Xr}) e à velocidade específica de produção de PHA (q_p). O comportamento do μ_{Xr} foi semelhante ao comportamento dos outros dois cultivos já apresentados (produção de P(3HB)), em que a fase exponencial de crescimento decorreu até aproximadamente 15 h, com μ_{Xrmax} $0,158 \text{ h}^{-1}$, e então houve um decréscimo da velocidade alcançando valores próximos a zero a partir de 40 h. No momento em que ocorreu a limitação da fonte de nitrogênio, o μ_{Xr} era igual a $0,04 \text{ h}^{-1}$. O q_p apresentou valor máximo logo após a limitação da fonte de nitrogênio ($0,12 \text{ g}_{Pr} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e, acentuado decaimento após o μ_{Xr} alcançar valores próximos a zero.

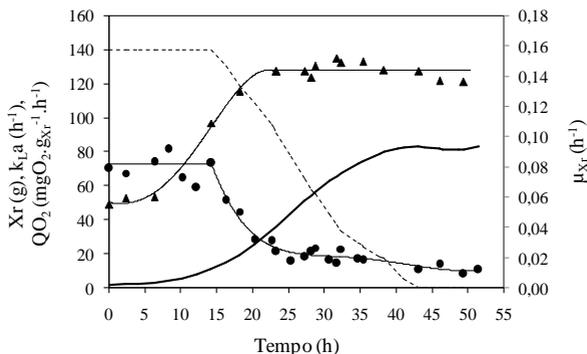
Para este experimento, as produtividades globais ($222,15 \text{ g}_{Pr}$, 52 h de cultivo e 4,07 L de meio) e de fase de produção ($58,5 \text{ g}_{Pr}$ e 4,17 L de meio no início da fase de produção, 19,6 h de fase de produção) foram $1,05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e $2,07 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente. As produções mássicas de PHA global e de fase de produção apresentaram valores de $4,27 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$ e $8,35 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente. Estes valores são inferiores aos valores obtidos no cultivo visando a produção de P(3HB) com exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. O baixo μ_{Xr} ($0,04 \text{ h}^{-1}$) no início da fase de produção pode ter proporcionado estes valores inferiores de produtividade, quando comparados aos valores obtidos durante a produção de P(3HB) no mesmo sistema, o que reforça a importância desta variável na produção dos PHAs.

Os dados referentes à transferência de oxigênio (QO_2 e k_{La}) para este cultivo são apresentados na Figura 4.13. A curva do k_{La} apresentaram comportamento similar à curva de X_r . Novamente os valores de k_{La} e o QO_2 inferiores aos obtidos para o cultivo visando a produção de P(3HB) podem ser justificados pelo baixo valor de μ_{Xr} no início da fase de produção. O k_{La} e o QO_2 apresentaram valores que condizem com a ordem de grandeza dos cultivos já apresentados neste trabalho.

Os fatores de conversão de substratos em célula e carbono em P(3HB-co-3HV) estão apresentados e discutidos no item 4.1.2.5.

Figura 4.13: Evolução da velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2 (●)), coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La} (▲)), biomassa

residual (X_r (—)) e velocidade específica de crescimento (μ_{X_r} (---)) ao longo do tempo para o cultivo visando a produção de P(3HB-*co*-3HV) com exaustão da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. As linhas contínuas representam o ajuste aos dados experimentais.



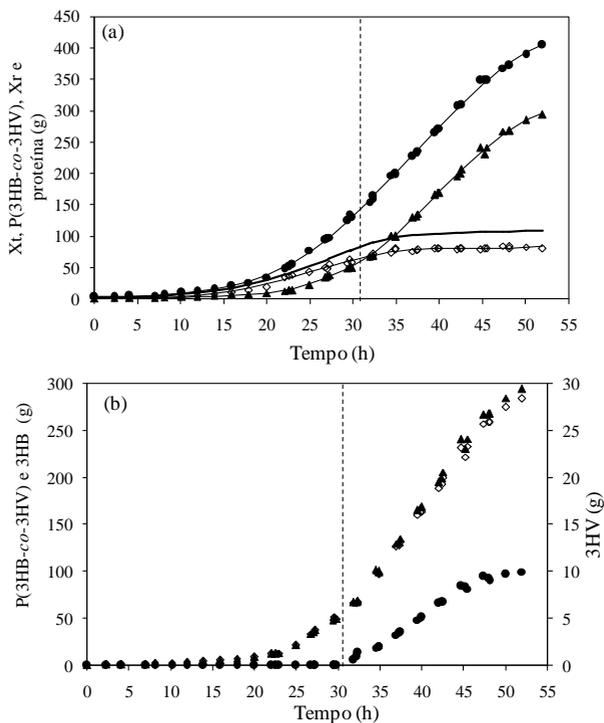
4.1.2.4 Produção de P(3HB-*co*-3HV) com alimentação da fonte de nitrogênio durante a fase de produção

Na Figura 4.14 (a), são apresentados os dados que representam a evolução da biomassa total (X_t), P(3HB-*co*-3HV), biomassa residual (X_r) e proteína, para o cultivo visando a produção de P(3HB-*co*-3HV) com limitação da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. Ao final deste cultivo, houve a produção de 108 g ($23,57 \text{ g.L}^{-1}$) de X_r e 296 g ($64,63 \text{ g.L}^{-1}$) de P(3HB-*co*-3HV), o que representa 73,27 % de PHA intracelular. Do total de polímero produzido, 3,39 % foi de unidades de hidroxivalerato (3HV). Na Figura 4.14 (b) é possível visualizar as curvas que representam a produção de P(3HB-*co*-3HV) e as unidades 3HB e 3HV. Da mesma forma que para o cultivo anterior, 32 g de ácido propiônico foram adicionados ao meio de cultivo durante a fase de produção, e considerando-se o fator de conversão de $0,3 \text{ g}_{3\text{HV}} \cdot \text{g}_{\text{AP}}^{-1}$, teria-se uma produção de 9,6 g de 3HV ao final do cultivo. O valor experimental encontrado ao final do experimento foi de 10 g de 3HV, e em nenhum momento verificou-se degradação das unidades de 3HV formadas.

A alimentação do ácido propiônico, assim como da solução de nitrogênio, começou a ser realizada a partir do momento da limitação da fonte de nitrogênio no meio de cultivo ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), com 32 h de cultivo. Como é possível observar na Figura 4.14 (b), a incorporação de unidades 3HV iniciou-se apenas após este momento. A porcentagem de P(3HB) acumulado na fase de crescimento foi de 39 %. A variação do

teor de proteínas intracelulares foi similar à observada para as culturas visando a produção de P(3HB), variando de 73 para 72 % e de 76 para 71 % (fase de crescimento e final da fase de produção) para os cultivos conduzidos em limitação de nitrogênio e exaustão de nitrogênio durante a fase de produção, respectivamente.

Figura 4.14: (a) Dados de biomassa total (X_t (●)), P(3HB-co-3HV) (▲), biomassa residual (X_r (—)) e proteína (◇); (b) Evolução da produção de P(3HB-co-3HV) (▲), unidades 3HB (◇) e 3HV (●) para o cultivo visando a produção de P(3HB-co-3HV) com limitação da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. As linhas contínuas representam os ajustes aos dados experimentais realizados com auxílio do *software* Lissage. A linha pontilhada representa o momento da limitação de nitrogênio ($0,1 \text{ g}_N \cdot \text{L}^{-1}$).



Os dados de concentração de glicose e nitrogênio ao longo do cultivo podem ser visualizados na Figura 4.15 (a). A concentração de nitrogênio residual durante a fase de produção foi de $0,02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, não havendo o acúmulo deste nutriente, o que mostra que todo o nitrogênio fornecido foi assimilado pelo microrganismo. Avaliando a dinâmica de

consumo de glicose nas Figuras 4.12 (a) e 4.15 (a), observa-se que, quando houve a alimentação de nitrogênio durante a fase de produção, ocorreu maior consumo de glicose, comparado a quando não houve alimentação deste nutriente na fase de produção. Este resultado se deve ao fato de que o microrganismo continua a crescer durante a fase de produção e parte da glicose consumida é direcionada para o crescimento microbiano, enquanto que na produção em exaustão de nitrogênio, a glicose é direcionada unicamente para a produção de polímero.

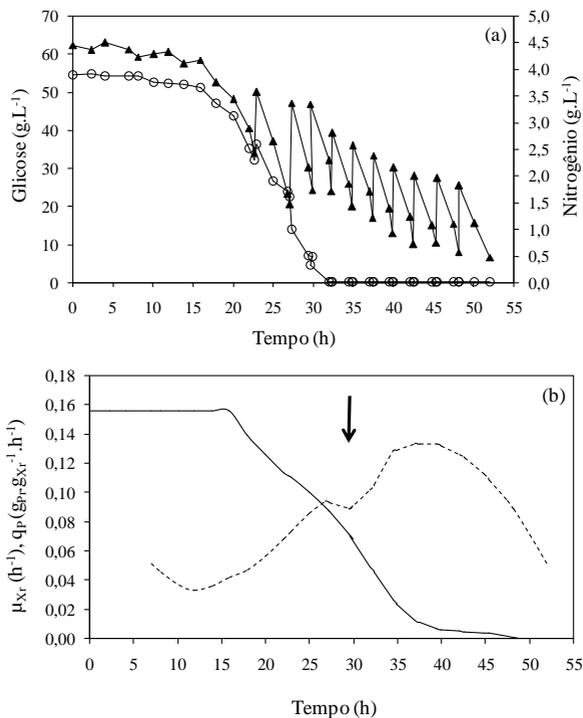
As velocidades específicas de crescimento microbiano e de produção de PHA estão apresentadas na Figura 4.15 (b). O comportamento do μ_{Xr} é similar ao comportamento nos demais cultivos já apresentados, com fase exponencial apresentando valor de μ_{Xrmax} igual a $0,156 \text{ h}^{-1}$ até aproximadamente 20 horas e valores de μ_{Xr} próximos a zero após 40 h de cultivo. Da mesma forma, o q_p apresentou valor máximo de $0,13 \text{ g}_{Pr} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ logo após a limitação da fonte de nitrogênio (início da fase de produção) e posteriormente decaiu. O valor de μ_{Xr} no momento da limitação da fonte de nitrogênio foi de $0,06 \text{ h}^{-1}$.

As produtividades globais (296 g_{Pr} , 52 h de cultivo e 4,58 L de meio) e de fase de produção ($49,5 \text{ g}_{Pr}$ e 4,39 L de meio no início da fase de produção, 20 h de fase de produção) para este experimento foram $1,24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e $2,67 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente. As produções mássicas de PHA global e de fase de produção apresentaram valores de $5,69 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$ e $12,32 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente. Na produção de P(3HB-co-3HV) foi possível verificar aumento de produtividade volumétrica em relação ao cultivo realizado em exaustão de N.

Grousseau et al. (2014) obtiveram produtividade de $0,64 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em cultura com *C. necator*, em modo batelada alimentada, a partir de ácido butírico e ácido propiônico como fontes de carbono e limitação em fósforo. Aragão et al. (1996) verificaram melhora na produtividade global do processo de 0,46 para $0,72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, quando nitrogênio foi alimentado durante a fase de produção, em cultura com *C. necator*, a partir de glicose e ácido propiônico.

O μ_{Xrmax} para *C. necator*, quando glicose é fornecida como fonte de carbono é em média $0,25 \text{ h}^{-1}$ (BAEI et al., 2011; BELFARES et al., 1995; IENCZAK et al., 2015). Os valores de μ_{Xrmax} obtidos para os quatro cultivos realizados foram em torno de $0,155 \text{ h}^{-1}$. Estes valores inferiores podem ser explicados pela elevada concentração inicial da fonte de carbono utilizada, pois conforme Horvat e colaboradores (2013), quando a concentração de glicose excede $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ uma progressiva redução do μ_{Xrmax} é observada.

Figura 4.15: (a) Concentração de glicose (\blacktriangle) e de nitrogênio (\circ); (b) Evolução da velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ_{Xr} (—)) e de produção de P(3HB-co-3HV) (q_p (---)) ao longo do tempo para o cultivo visando a produção de P(3HB-co-3HV) com limitação da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. A flecha indica o momento da limitação da fonte de nitrogênio ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$).



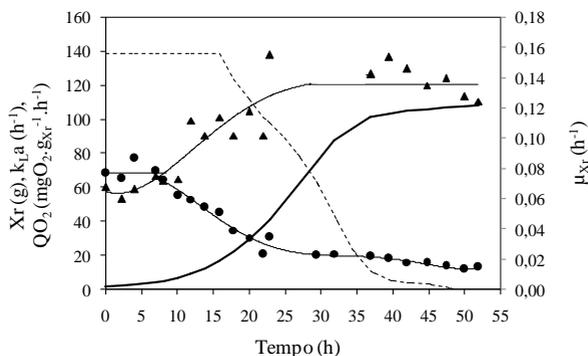
Kellerhals, Hazenberg e Witholt (1999) estudaram a alimentação exponencial de nitrogênio durante a fase de produção em cultivos com *Pseudomonas oleovorans* para produção de mcl-PHA, visando manter o μ_{Xr} ($0,05 \text{ h}^{-1}$) em valores constantes. O μ_{Xr} foi mantido e a biomassa total aumentou de 90 para 112 g.L^{-1} , porém, devido à limitação da fonte de carbono, os autores não observaram aumentos na produção do PHA. Estes resultados mostram que a alimentação de nitrogênio durante a fase de produção promove bons resultados na manutenção do μ_{Xr} e, conseqüentemente, em condições otimizadas de processo, do q_p , o que promove o aumento da produção de PHA e a produtividade do processo.

Os dados de velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2) e coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) são

visualizados na Figura 4.16. Assim como nos demais experimentos, as curvas de k_{La} e X_r apresentaram um comportamento similar neste cultivo, além de a produção de X_r ter sido superior, o μ_{X_r} no início da fase de produção também foi superior, o que pode ter levado a valores maiores de velocidade de consumo de oxigênio.

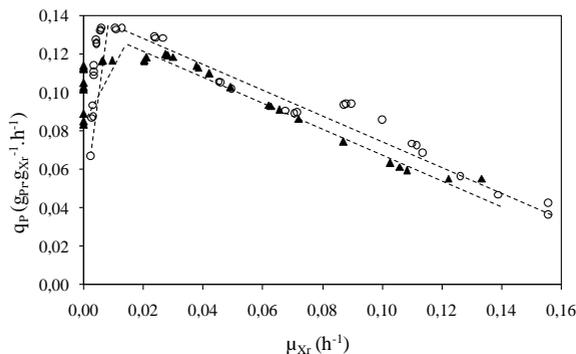
Os fatores de conversão de substratos em célula e carbono em P(3HB-*co*-3HV) estão apresentados e discutidos no item 4.1.2.5.

Figura 4.16: Evolução da velocidade específica de consumo de oxigênio (Q_{O_2} (●)), coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La} (▲)), biomassa residual (X_r (—)) e velocidade específica de crescimento (μ_{X_r} (---)) ao longo do tempo para o cultivo visando a produção de P(3HB-*co*-3HV) com limitação da fonte de nitrogênio durante a fase de produção. As linhas contínuas representam o ajuste aos dados experimentais.



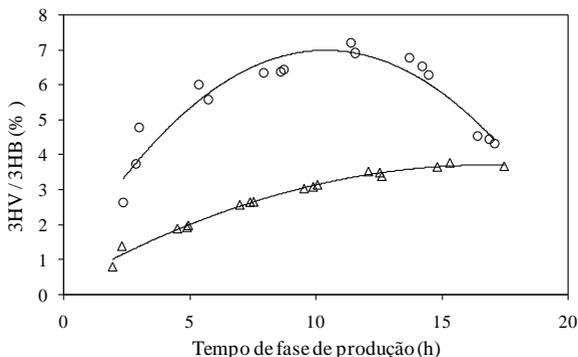
A correlação entre q_p e μ_{X_r} para as culturas conduzidas em exaustão e limitação de nitrogênio durante a fase de produção é apresentada na Figura 4.17. Apesar dos valores obtidos para q_{pmax} nas duas culturas (0,12 e 0,13 $g_{Pr} \cdot g_{X_r}^{-1} \cdot h^{-1}$ para as culturas em exaustão e limitação de nitrogênio, respectivamente) serem próximos, no caso em que houve a alimentação de nitrogênio na fase de produção, o q_p se manteve no valor máximo por mais tempo. Esta leve diferença foi capaz de promover substancialmente a produção do copolímero.

Figura 4.17: Correlação entre a velocidade específica de produção de P(3HB-co-3HV) (q_p) e a velocidade específica de crescimento (μ_{Xr}) para as culturas em exaustão (\blacktriangle) e alimentação de nitrogênio (o), durante a fase de produção.



Na Figura 4.18 verifica-se que na cultura com exaustão de nitrogênio a relação entre a incorporação das unidades de 3HV e 3HB alcançou maiores valores, quando comparada à cultura alimentada em nitrogênio (em torno de 10 h de fase de produção), porém após atingir este valor máximo, a relação decai, e as unidades de 3HB passam a ser produzidas preferencialmente. Entretanto, quando nitrogênio é alimentado, a fração de unidades de 3HV aumenta durante toda a fase de produção, atingindo o valor máximo ao final da cultura.

Figura 4.18: Relação entre a incorporação de unidades 3HV e 3HB durante a fase de produção para as culturas conduzidas em exaustão de nitrogênio (o) e limitação de nitrogênio (Δ) durante a fase de produção.



A bactéria *C. necator* é capaz de assimilar ácido propiônico através de duas vias diferentes. Após ser convertido a propionil-CoA,

este metabólito pode ser direcionado para a produção de unidades de 3HV ou pode ser descarboxilado a acetil-CoA e convertido em unidades de 3HB. Quando o ácido propiônico é adicionado ao meio de cultivo como única fonte de carbono, este é preferencialmente direcionado para a produção de unidades de 3HB. Utilizar outra fonte de carbono que forneça o acetil-CoA necessário à formação das unidades de 3HB, como glicose ou ácido butírico, pode otimizar o fluxo de ácido propiônico na formação de unidades de 3HV (LEE et al. 1994).

Conforme Grousseau et al. (2014) e Aragão et al. (1996), as velocidades específicas de produção de unidades 3HV (q_{3HV}) e de unidades 3HB (q_{3HB}) decrescem na mesma proporção devido à exaustão do nitrogênio, assim q_{3HV} irá alcançar valores próximos a zero antes que q_{3HB} , e então, apenas 3HB será produzido, reduzindo a fração de 3HV no polímero. Através da manutenção do crescimento celular residual durante a fase de produção, q_{3HV} e q_{3HB} serão mantidos em níveis mais elevados e a relação entre as unidades de 3HV e 3HB deverá ser maior. O sistema com reciclo de células aplicado no presente trabalho é bastante dinâmico, e muitas variáveis podem interferir no fluxo de ácido propiônico para produção dos intermediários acetil-CoA ou propionil-CoA. A compreensão do mecanismo de produção das unidades de 3HB e 3HV permite a condução do cultivo de modo a se definir o fim do mesmo, em função das características desejadas do polímero final.

Quando ocorre a exaustão de fósforo ou oxigênio, durante a fase de produção, os valores de q_{3HB} decrescem enquanto os valores de q_{3HV} se mantêm no mesmo nível, o que leva à incorporação de mais unidades de 3HV, quando comparado com exaustão de nitrogênio (GROUSSEAU et al. 2014; LEFEBVRE et al. 1997). Nestas duas situações, o fluxo de ácido propiônico para produção de propionil-CoA é preferido, e a outra fonte de carbono fornecida em combinação (glicose, ácido butírico, entre outros) fornecerá o acetil-CoA de forma a limitar o *turn-over* do *pool* de coenzimas (NAD(P)H/NAD(P)) (GROUSSEAU et al. 2014). Além disso, a conversão de ácido propiônico em acetil-CoA é oxigênio dependente e, assim, se oxigênio é limitado no meio de cultivo, este fluxo é pouco provável (LEFEBVRE et al. 1997). Aplicar uma dupla limitação durante a fase de produção, como nitrogênio e oxigênio, pode ser uma estratégia interessante para melhorar a fração de unidades 3HV no copolímero, obtendo-se um polímero com menor rigidez e maior resistência.

4.1.2.5 Dados cinéticos e fatores de conversão de substratos em Xr e em PHA

A fim de facilitar a comparação entre os resultados obtidos para os cultivos visando a produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV), empregando batelada sequencial com reciclo externo de células, com exaustão e alimentação limitante de nitrogênio durante a fase de produção, os resultados cinéticos e os fatores de conversão de glicose em biomassa total ($Y_{XU/G}$), glicose em biomassa residual ($Y_{Xr/G}$), nitrogênio em biomassa residual ($Y_{Xr/N}$), fósforo em biomassa residual ($Y_{Xr/P}$) e glicose em PHA ($Y_{Pr/G}$) foram resumidos em Tabelas. A Tabela 4.2 apresenta os resultados obtidos para os fatores de conversão.

Tabela 4.2: Resultados obtidos para os fatores de conversão de glicose em Xt ($Y_{XU/G}$), glicose em Xr ($Y_{Xr/G}$), nitrogênio em Xr ($Y_{Xr/N}$), fósforo em Xr ($Y_{Xr/P}$), glicose em PHA ($Y_{Pr/G}$), para os cultivos visando a produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) com exaustão e alimentação constante da fonte de nitrogênio durante a fase de produção.

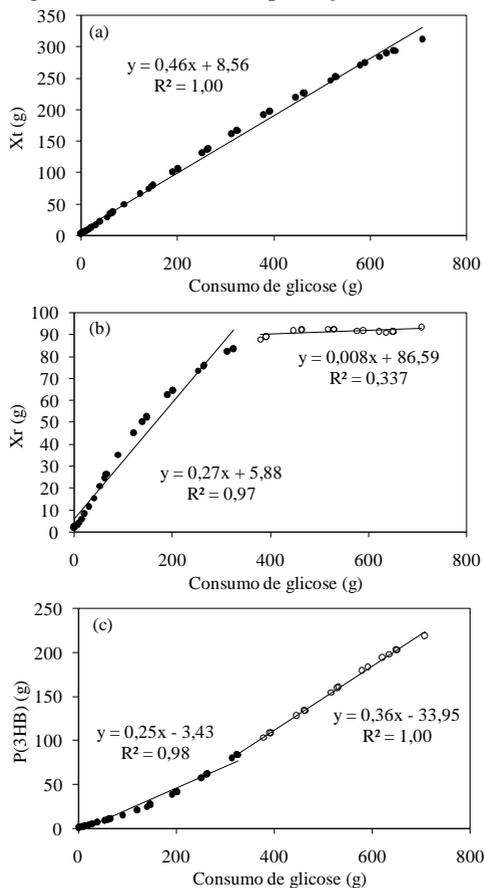
	P(3HB)		P(3HB)		PHA		PHA	
	exaustão de N		limitação de N		exaustão de N		limitação de N	
	Cresc.	Prod.	Cresc.	Prod.	Cresc.	Prod.	Cresc.	Prod.
$Y_{XU/G}^*$ (g_{XU}/g_G)	0,46		0,43		0,52		0,42	
$Y_{Xr/G}$ (g_{Xr}/g_G)	0,27	0,008	0,31	0,05	0,26	0,008	0,27	0,03
$Y_{Pr/G}$ (g_{Pr}/g_G)	0,25	0,36	0,16	0,38	0,21	0,53	0,17	0,39
$Y_{Xr/N}$ (g_{Xr}/g_N)	7,18	-	8,02	9,37	6,85	-	6,43	9,70
$Y_{Xr/P}$ (g_{Xr}/g_P)	36,4	-	45,5	45,5	39,6	-	39,4	29,2

*Considerando-se todo o cultivo.

De forma geral, para todos os casos, apesar de haver algumas diferenças nos valores dos fatores de conversão, todos apresentaram valores com a mesma ordem de grandeza. Essas pequenas diferenças de valores podem ter ocorrido devido a erros experimentais. Uma vez que a fase de crescimento de todos os cultivos foi conduzida de forma bastante similar, os valores dos fatores de conversão deveriam apresentar valores muito similares também.

As Figuras 4.19 a 4.22 apresentam as correlações entre X_t , X_r e PHA e o consumo de glicose, utilizadas no cálculo dos fatores de conversão de glicose em X_t , X_r e PHA, para os cultivos batelada sequencial com reciclo externo de células.

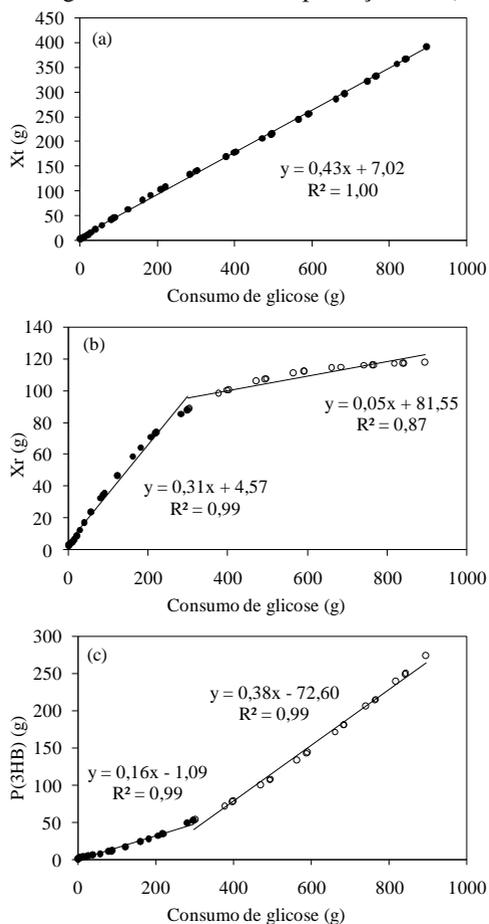
Figura 4.19: Fator de conversão de glicose em X_t ($Y_{X_t/G}$) (a), glicose em X_r ($Y_{X_r/G}$) (b) e glicose em P(3HB) ($Y_{P/G}$) (c) ((●) fase de crescimento, (○) fase de produção em (b) e (c)) para o cultivo batelada sequencial com reciclo de células e exaustão de nitrogênio durante a fase de produção de P(3HB).



Baei et al. (2011) e Kim et al. (1994) encontraram valor de $Y_{X_t/S}$ iguais a 0,53 e 0,48 $g_{X_t}.g_S^{-1}$, respectivamente, quando glicose foi utilizada para produção de P(3HB) por *C. necator*. Valores de $Y_{X_r/G}$

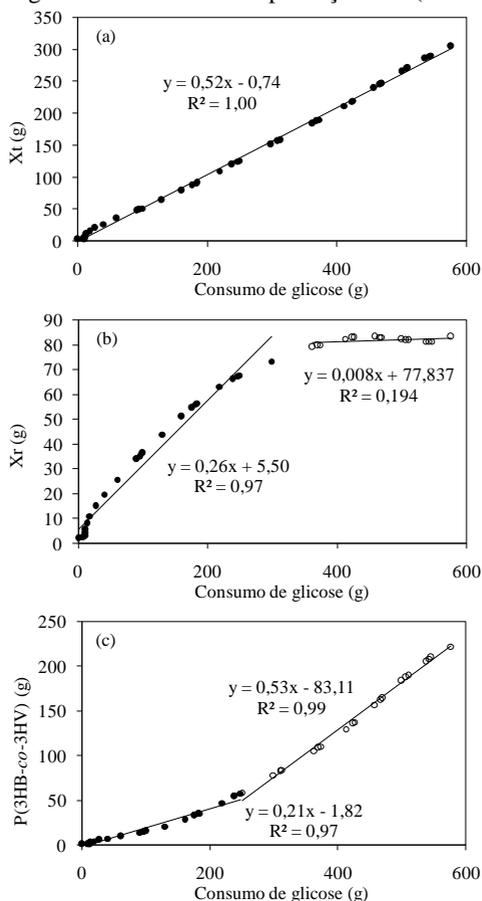
próximos aos obtidos neste trabalho são reportados na literatura: $0,37 \text{ g}_{\text{Xr}} \cdot \text{g}_{\text{G}}^{-1}$ (ATLIÉ et al., 2011), $0,27 \text{ g}_{\text{Xr}} \cdot \text{g}_{\text{G}}^{-1}$ (BRAUNEGG et al., 1995), $0,38 \text{ g}_{\text{Xr}} \cdot \text{g}_{\text{G}}^{-1}$ (KIM et al., 1994). Vale ressaltar que o $Y_{\text{Xr/G}}$ teórico (quando não há produção de PHA) é de $0,5 \text{ g}_{\text{Xr}} \cdot \text{g}_{\text{G}}^{-1}$ (ROELS, 1983).

Figura 4.20: Fator de conversão de glicose em X_t ($Y_{\text{Xt/G}}$) (a), glicose em X_r ($Y_{\text{Xr/G}}$) (b) e glicose em P(3HB) ($Y_{\text{P/G}}$) (c) ((●) fase de crescimento, (○) fase de produção em (b) e (c)) para o cultivo batelada sequencial com reciclo de células e alimentação de nitrogênio durante a fase de produção de P(3HB).



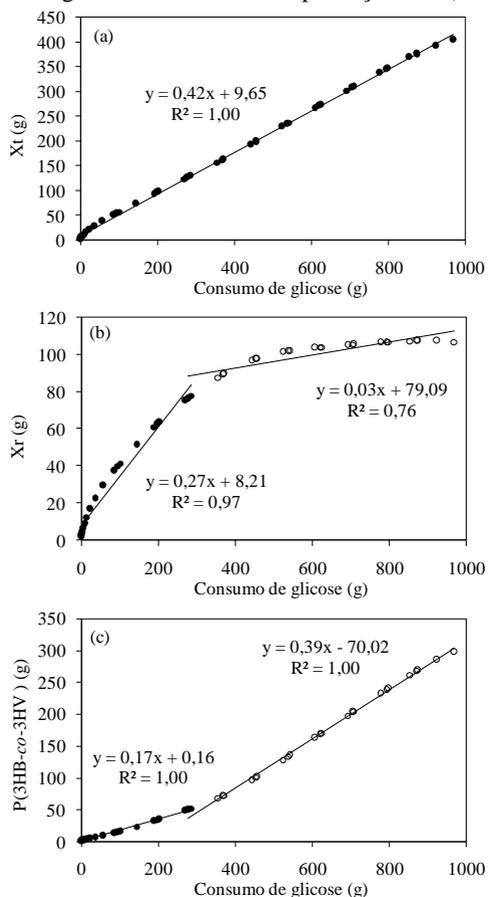
Valores de $Y_{Pr/G}$ relatados na literatura são similares aos obtidos no presente trabalho: $0,47 \text{ g}_{Pr} \cdot \text{g}_G^{-1}$ (ARAGÃO, 1996), $0,4 \text{ g}_{Pr} \cdot \text{g}_G^{-1}$ (IENCZAK, 2011), $0,48 \text{ g}_{Pr} \cdot \text{g}_G^{-1}$ (KHANNA; SRIVASTAVA, 2006). Valores de $Y_{Pr/G}$ da ordem de $0,2 \text{ g}_{Pr} \cdot \text{g}_G^{-1}$ foram observados durante a fase de crescimento. Estes valores são explicados devido ao fato de que a bactéria *C. necator* possui uma produção de P(3HB) parcialmente associada ao crescimento (HORVAT et al., 2013).

Figura 4.21: Fator de conversão de glicose em X_t ($Y_{Xt/G}$) (a), glicose em X_r ($Y_{Xr/G}$) (b) e glicose em PHA ($Y_{Pr/G}$) (c) ((●) fase de crescimento, (○) fase de produção em (b) e (c)) para o cultivo batelada sequencial com reciclo de células e exaustão de nitrogênio durante a fase de produção de P(3HB-*co*-3HV).



Em todos os cultivos apresentados no presente trabalho, a produção de P(3HB) durante a fase de crescimento foi superior a 30 %. O valor teórico de conversão de glicose em P(3HB) é de $0,48 \text{ g}_{\text{Pr}} \cdot \text{g}_{\text{G}}^{-1}$ (YAMANE, 1993), e os valores máximos de $Y_{\text{Pr/G}}$ de ácido propiônico em unidades 3HV reportados na literatura consultada estão em torno $0,4 \text{ g}_{\text{Pr}} \cdot \text{g}_{\text{AP}}^{-1}$ (DU et al., 2001b).

Figura 4.22: Fator de conversão de glicose em X_t ($Y_{Xt/G}$) (a), glicose em X_r ($Y_{Xr/G}$) (b) e glicose em PHA ($Y_{\text{Pr/G}}$) (c) ((●) fase de crescimento, (○) fase de produção em (b) e (c)) para o cultivo batelada sequencial com reciclo de células e alimentação de nitrogênio durante a fase de produção de P(3HB-co-3HV).



O valor de $Y_{Pr/G}$ para o cultivo visando a produção de P(3HB-co-3HV) com exaustão de nitrogênio na fase de produção foi superior aos demais, e superior aos valores teóricos e apresentados na literatura. Uma vez que o ácido propiônico não pode ser quantificado no presente trabalho, por problemas técnicos, o fator de conversão de glicose em PHA leva em conta o consumo deste nutriente, o que leva a $Y_{Pr/G}$ superestimados.

As Figuras 4.23 a 4.26 apresentam as correlações entre X_r e o consumo de nitrogênio e fósforo, utilizadas para o cálculo dos fatores de conversão de nitrogênio e fósforo em X_r , para os cultivos batelada sequencial com reciclo externo de células.

Figura 4.23: Fator de conversão de nitrogênio em X_r ($Y_{X_r/N}$) (a) e fósforo em X_r ($Y_{X_r/P}$) (b) para o cultivo com reciclo de células e exaustão de nitrogênio durante a fase de produção de P(3HB): (●) fase de crescimento.

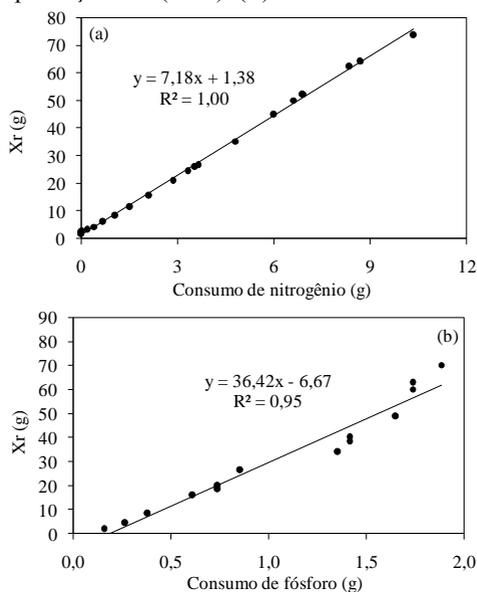
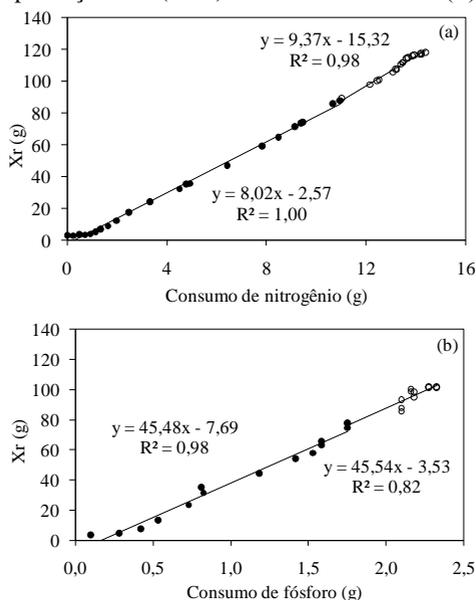


Figura 4.24: Fator de conversão de nitrogênio em Xr ($Y_{Xr/N}$) (a) e fósforo em Xr ($Y_{Xr/P}$) (b) para o cultivo com reciclo de células e alimentação de nitrogênio durante a fase de produção de P(3HB): fase de crescimento (●) e produção (○).



Os valores reportados na literatura para $Y_{Xr/N}$ são iguais a $7,3 \text{ g}_{Xr} \cdot \text{g}_N^{-1}$ (ARAGÃO, 1996), $6,25 \text{ g}_{Xr} \cdot \text{g}_N^{-1}$ (BELFARES et al., 1995), quando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi utilizado como fonte de nitrogênio, e $8,2 \text{ g}_{Xr} \cdot \text{g}_N^{-1}$ (IENCZAK, 2011), quando ureia foi utilizada como fonte de nitrogênio. Os valores de $Y_{Xr/N}$ obtidos nos cultivos apresentados neste trabalho variaram entre 6,34 e $8,00 \text{ g}_{Xr} \cdot \text{g}_N^{-1}$ durante a fase de crescimento, valores que ficam dentro da faixa reportada na literatura. O $Y_{Xr/N}$ para a fase de produção dos cultivos alimentados em nitrogênio apresentaram valores médios superiores, $9,50 \text{ g}_{Xr} \cdot \text{g}_N^{-1}$.

Os valores de $Y_{Xr/P}$ reportados na literatura são de $101 \text{ g}_{Xr} \cdot \text{g}_P^{-1}$ (ARAGÃO, 1996), $75 \text{ g}_{Xr} \cdot \text{g}_P^{-1}$ (STEINBUCHER; SCHEGEL, 1989), $82 \text{ g}_{Xr} \cdot \text{g}_P^{-1}$ (GROUSSEAU, et al. 2014). Estes valores são superiores aos obtidos no presente trabalho, entre 29 e $45,5 \text{ g}_{Xr} \cdot \text{g}_P^{-1}$.

Figura 4.25: Fator de conversão de nitrogênio em Xr ($Y_{Xr/N}$) (a) e fósforo em Xr ($Y_{Xr/P}$) (b) para o cultivo com reciclo de células e exaustão de nitrogênio durante a fase de produção de PHA (●) fase de crescimento.

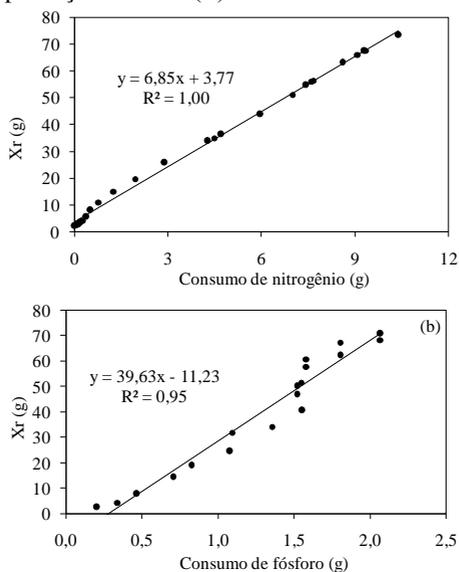
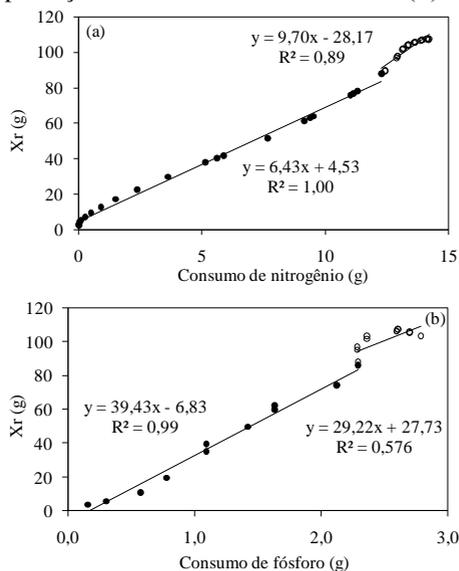


Figura 4.26: Fator de conversão de nitrogênio em Xr ($Y_{Xr/N}$) (a) e fósforo em Xr ($Y_{Xr/P}$) (b) para o cultivo com reciclo de células e alimentação de nitrogênio durante a fase de produção de PHA: fase de crescimento (●) e de produção (○).



A Tabela 4.3 apresenta os valores de μ_{Xrmax} e q_{Pmax} para os cultivos batelada sequencial com reciclo de células realizados no presente trabalho. Como já comentado anteriormente, o valor médio de μ_{Xrmax} obtido para todos os experimentos foi de $0,155 \text{ h}^{-1}$, e está abaixo dos valores apresentados na literatura. Os valores de q_{Pmax} foram bastante similares e, apesar de esperar-se valor superior no cultivo que foi alimentado em nitrogênio durante a fase de produção, isso não foi verificado para a produção do P(3HB).

Tabela 4.3: Resultados obtidos para velocidade específica máxima de crescimento (μ_{Xrmax}) e velocidade específica máxima de produção de PHA (q_{Pmax}), para os cultivos visando a produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) com exaustão e alimentação constante da fonte de nitrogênio durante a fase de produção.

	P(3HB) exaustão de N	P(3HB) limitação de N	PHA exaustão de N	PHA limitação de N
μ_{Xrmax} (h^{-1})	0,152	0,156	0,158	0,156
q_{Pmax} ($\text{g}_{Pr} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	0,12	0,11	0,12	0,13

As porcentagens de acúmulo de polímero para os cultivos batelada sequencial com reciclo de células realizados no presente trabalho estão apresentadas na Tabela 4.4. Ambos os cultivos visando a produção de P(3HB) acumularam em torno de 70 % de polímero. Para a produção do copolímero verificou-se em média 73 % de PHA total, em que valores de 3,39 e 3,95 % (m/m) foram observados para o acúmulo final de unidades 3HV. Conforme descrito nos itens 4.1.2.3 e 4.1.2.4 estes valores de acúmulo de 3HV estão de acordo com o esperado a partir da quantidade de ácido propiônico fornecida ao meio de cultivo durante a fase de produção.

Tabela 4.4: Resultados obtidos para porcentagem de acúmulo de polímero (% PHA) e porcentagem de unidades 3HB (% 3HB) e 3HV (% 3HV) para os cultivos visando a produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) com exaustão e alimentação constante da fonte de nitrogênio durante a fase de produção.

	P(3HB) exaustão de N	P(3HB) limitação de N	PHA exaustão de N	PHA limitação de N
% PHA	70,1	69,9	72,8	73,25
% HB	100	100	96,05	96,61
% HV	-	-	3,95	3,39

As produtividades globais (que levam em conta o tempo total de cultivo) e de fase de produção (que levam em conta o período pós limitação de nitrogênio) estão resumidas na Tabela 4.5, assim como as velocidades de produção de PHA. Para os cultivos visando a produção de P(3HB), não se percebe aumento na produtividade volumétrica global do processo, devido à diluição do meio de cultivo com a alimentação da solução de nitrogênio durante a fase de produção. Entretanto, a produção mássica mostra que houve maior produção de P(3HB) para o cultivo no qual nitrogênio foi alimentado ao meio durante a fase de produção. Para a produção do copolímero, mesmo com a diluição do meio foi possível verificar o aumento de produtividade global do processo. As produtividades de fase de produção apresentaram comportamento semelhante para produção de ambos os polímeros, em que houve aumento na produtividade volumétrica entre os cultivos batelada sequencial com reciclo de células conduzidos em exaustão e limitação de nitrogênio durante a fase de produção.

Tabela 4.5: Produtividade global (Prod), produtividade de fase de produção (Prod_P), Produção mássica global (Prod_M) e produção mássica de fase de produção (Prod_MP) para os cultivos visando a produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) com exaustão e alimentação constante da fonte de nitrogênio durante a fase de produção.

	P(3HB)	P(3HB)	PHA	PHA
	exaustão de N	limitação de N	exaustão de N	limitação de N
Prod_M (g.h ⁻¹)	4,33	5,28	4,27	5,69
Prod (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	1,14	1,18	1,05	1,24
Prod_MP (g.h ⁻¹)	8,0	11,26	8,35	12,32
Prod_P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	2,31	2,51	2,07	2,67

De forma geral, os fatores de conversão de substratos em célula e glicose em polímero estão de acordo com os valores reportados na literatura para a bactéria *C. necator* DSM 545 em diferentes estratégias de produção. Apesar da porcentagem de acúmulo de polímero ter sido em média igual a 72 % para todos os cultivos, os valores de biomassa residual e PHA foram superiores para os cultivos alimentados de forma constante em nitrogênio durante a fase de produção, o que promoveu o aumento da produtividade em polímero em ambos os casos. Estes

resultados mostram que a alimentação de nitrogênio em concentrações limitantes ao longo da fase de produção é uma estratégia promissora no aumento da produtividade e, conseqüentemente, na redução do custo do produto final.

Novas estratégias de alimentação de nitrogênio durante a fase de produção, como a alimentação exponencial deste nutriente, visando um aumento de produtividade podem ser estudadas em trabalhos futuros. Além disso, no caso da produção do copolímero P(3HB-co-3HV), a aplicação de dupla limitação (nitrogênio e oxigênio) durante a fase de produção pode ser uma estratégia interessante, a fim de promover a produção das unidades de 3HV a partir do ácido propiônico, e obter um polímero com características mais interessantes, já que a conversão do ácido propiônico à acetil-CoA é oxigênio dependente.

4.2 CONSTRUÇÃO DE UM MODELO FENOMENOLÓGICO BASEADO NA ANÁLISE DE FLUXOS METABÓLICOS PARA PRODUÇÃO DE P(3HB) POR *Cupriavidus necator* A PARTIR DE GLICOSE

Muitos questionamentos surgiram a partir dos resultados dos cultivos em modo batelada sequencial com reciclo externo de células. O elevado teor de P(3HB) ao final da fase de crescimento, por exemplo, foi um resultado que não havia sido obtido até o presente momento pelo nosso grupo de trabalho.

Para tentar responder a estes questionamentos, e entender melhor o metabolismo da bactéria *C. necator* crescendo em glicose, propôs-se a construção de um modelo fenomenológico (estruturado), baseado na Análise de Fluxos Metabólicos (AFM) para este microrganismo. Ienczak (2011) propôs uma modelagem cinética (não estruturada) para a produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose. Apesar dos bons resultados obtidos pelo autor, a partir do modelo proposto, nenhuma resposta com relação ao metabolismo da bactéria pode ser obtida. A aplicação dos modelos estruturados tem ganhado força nos últimos anos, apesar de serem modelos mais complexos, nos quais um maior número de parâmetros é necessário, as respostas obtidas fornecem mais do que a simples cinética do processo (BIDEAUX; GOMA; URIBELARREA, 2008; GROUSSEAU et al., 2013; JOUHTEN; WIEBE; PENTILLA, 2012; MENDONÇA et al., 2013; PIGOU; MORCHAIN, 2015).

O modelo fenomenológico proposto no presente trabalho foi desenvolvido no Instituto Nacional de Ciências Aplicadas, em Toulouse, na França (*Institut National des Sciences Appliquées* – INSA –

Toulouse), durante um período de 9 meses de doutorado sanduíche. Esta etapa foi orientada pelo Professor Jean-Louis Uribellarea. O grupo de trabalho do Laboratório de Engenharia de Sistemas Biológicos e de Processos do INSA de Toulouse possui inúmeros trabalhos voltados à área de Análise de Fluxos Metabólicos. Dentre estes trabalhos encontra-se a tese de doutorado de Estelle Grousseau, defendida em 2012, que desenvolveu um macro do Excel com a Análise de Fluxos Metabólicos para *C. necator*. O modelo fenomenológico proposto no presente trabalho foi baseado no macro de AFM proposto por Grousseau (2012) e informações obtidas da literatura, já que os resultados experimentais, obtidos nos cultivos com reciclo externo de células, não podem ser utilizados para análise de fluxos por não estarem em um estado pseudo-estacionário (o sistema é extremamente dinâmico, e as condições ambientais oscilam durante todo o processo).

Neste item serão apresentadas as etapas envolvidas na construção do modelo fenomenológico e alguns resultados obtidos a partir do mesmo. Apresenta-se também a metodologia utilizada nos experimentos de validação desta etapa do modelo.

4.2.1 Metodologia para desenvolvimento do modelo fenomenológico

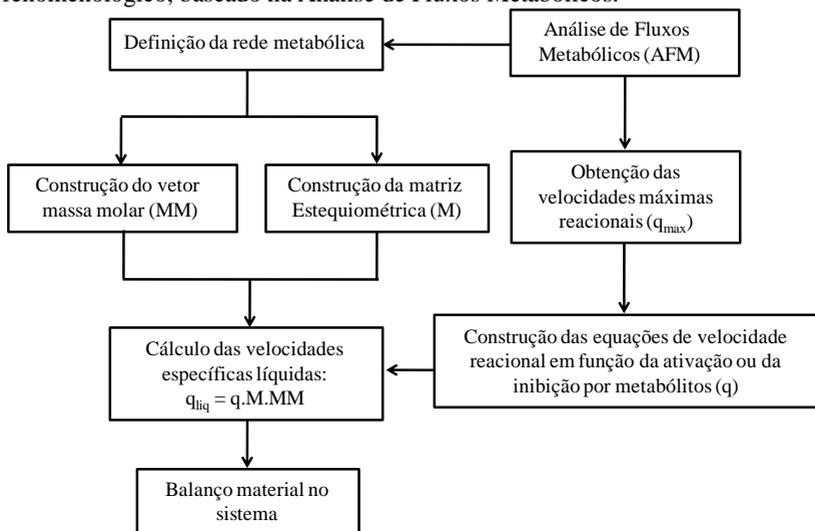
Um resumo das etapas envolvidas no desenvolvimento do modelo fenomenológico pode ser observado na Figura 4.27.

Para a construção do modelo fenomenológico, utilizou-se o *software* de Análise de Fluxos Metabólicos (macro do Excel - FLUX) desenvolvido para a bactéria *C. necator*, visando a produção de P(3HB) a partir de glicose, por Estelle Grousseau durante sua tese (2012), sob orientação de Jean-Louis Uribellarea, no *Institut National des Sciences Appliquées* – INSA de Toulouse – França. Mais detalhes sobre o *software* encontram-se no Apêndice I.

A AFM desenvolvida por Grousseau (2012) considera a assimilação de glicose, ácido butírico, ácido acético e ácido propiônico, para produção de P(3HB) e do copolímero P(3HB-co-3HV) por *C. necator*. O presente modelo fenomenológico foi desenvolvido apenas para consumo da glicose e para produção de P(3HB), assim, muitas das vias metabólicas presentes na AFM proposta por Grousseau foram desconsideradas. A Figura I-19 do Apêndice I apresenta a rede metabólica da AFM considerada no presente trabalho. A partir desta rede metabólica, uma nova rede metabólica resumida, considerando 17 metabólitos e 15 reações, foi proposta (Figura 4.28), obtendo-se, então,

a estequiometria em relação à biomassa e às velocidades específicas máximas das reações da rede metabólica resumida.

Figura 4.27: Esquema das etapas envolvidas no desenvolvimento de um modelo fenomenológico, baseado na Análise de Fluxos Metabólicos.



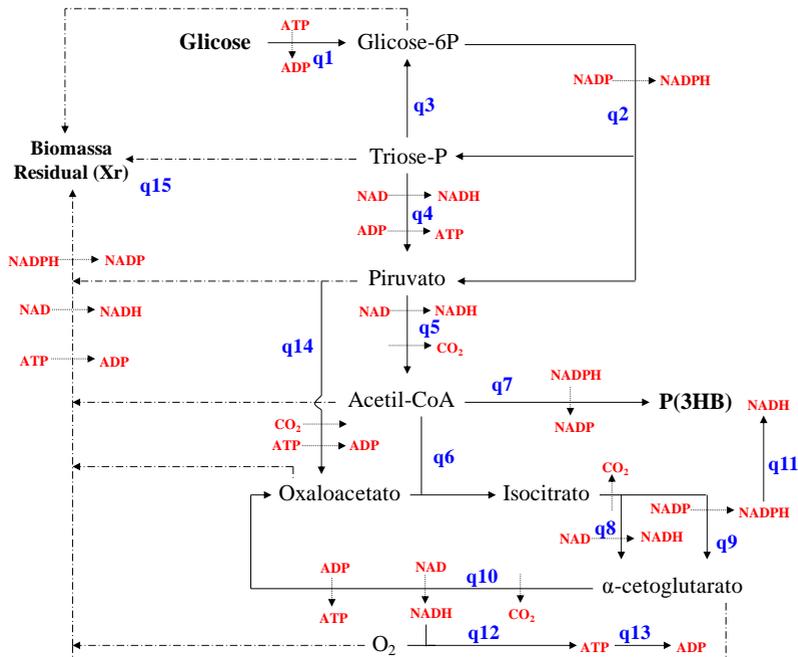
O modelo foi implementado no *software* Matlab[®] R2011b e as etapas para sua construção seguiram a proposta do APÊNDICE II, resumidas abaixo:

- 1) Construção das matrizes estequiométricas (M) e dos vetores da massa molar (MM) para as variáveis abióticas, bióticas e gasosas;
- 2) Obtenção das velocidades específicas (q) a partir da definição das equações de ativação ou inibição por metabólitos, para cada uma das 15 reações;
- 3) Obtenção das velocidades específicas líquidas (q_{liq}) para as 15 reações (a q_{liq} é obtida multiplicando-se a velocidade específica reacional (q) pela matriz estequiométrica (M) e pelo vetor das massas molares (MM));
- 4) Definição do balanço material do sistema.

Após concluir as quatro etapas citadas, a simulação dos experimentos foi realizada através da inclusão no modelo das especificidades de cada situação (batelada alimentada, reciclo de células, alimentação de nitrogênio durante a fase de produção). O modelo foi então validado para um experimento em batelada (descrito no item

4.2.2) e um experimento em batelada sequencial com reciclo externo de células (descrito no item 4.1.1.1).

Figura 4.28: Rede metabólica resumida para produção de P(3HB) por *C. necator*, a partir de glicose considerando 17 intermediários metabólicos e 15 reações (q). As flechas em pontilhado representam os intermediários metabólicos que são precursores de X_r .



4.2.1.1 Determinação da estequiometria da biomassa

O *software* desenvolvido por Grousseau (2012) foi aplicado para determinar a reação estequiométrica da biomassa a ser considerada no modelo fenomenológico. Para a construção do modelo, as 105 reações e os 92 intermediários metabólicos, que compõem o *software*, foram reduzidos a 15 e 17, respectivamente. Desta forma, uma reação estequiométrica que levasse em conta apenas os 17 metabólitos e 15 reações precisou ser escrita. Nesta reação tanto o balanço em carbono quanto o balanço redox foi verificado.

O balanço redox pode ser representado pela Equação (4.1).

$$\sum_{j=1}^m (r_j \cdot \gamma_j) = 0 \quad (4.1)$$

Em que, r_j é o coeficiente estequiométrico do composto na reação e γ_j é o grau de redução generalizado do composto. O grau de redução generalizado pode ser obtido a partir da Equação (4.2).

$$\gamma_j \sum_{i=1}^k (\lambda_i \cdot E_i) \quad (4.2)$$

Sendo, λ_i um fator arbitrário que multiplica o número de repetições do elemento E_i no composto. Por exemplo, na molécula de CO_2 têm-se duas repetições do elemento oxigênio e uma repetição do elemento carbono.

O grau de redução de um composto é obtido considerando-se que sendo k o número de elementos considerados, $k-1$ compostos com grau de redução diferente podem ser eliminados do balanço elementar, tomando como valores de λ as soluções do sistema de equações que anula os graus de redução dos compostos escolhidos. Considerando-se os elementos carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e oxigênio (O) têm-se $k = 4$. Assim, conforme a relação descrita, 3 compostos com graus de redução diferentes podem ser retirados do balanço global.

Eliminando-se os compostos CO_2 , NH_3 e $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ (Triose-P), considerando $\lambda_{\text{H}} = 1$ (valor arbitrário) e resolvendo-se o sistema de equações abaixo, obtém-se que $\lambda_{\text{C}} = 4$, $\lambda_{\text{O}} = -2$ e $\lambda_{\text{N}} = -3$.

$$\begin{aligned} \gamma_{\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3} &= 3 \cdot \lambda_{\text{C}} + 6 \cdot \lambda_{\text{H}} + 3 \lambda_{\text{O}} = 0, & \gamma_{\text{CO}_2} &= \lambda_{\text{C}} + 2 \lambda_{\text{O}} = 0, \\ \gamma_{\text{NH}_3} &= \lambda_{\text{N}} + 3 \lambda_{\text{H}} = 0 \end{aligned}$$

Através destes valores, pode-se calcular o grau de redução generalizado γ de qualquer outro composto de fórmula bruta $\text{CH}_a\text{O}_b\text{N}_c$:

$$\gamma_j = \sum_{i=1}^k (\lambda_i \cdot E_i) = \lambda_{\text{C}} + \lambda_{\text{H}} \cdot a + \lambda_{\text{O}} \cdot b + \lambda_{\text{N}} \cdot c$$

O CO_2 , o NH_3 e a água não possuem poder redutor, assim como o S e a ATP.

4.2.2 Metodologia para o cultivo em modo batelada

O cultivo em modo batelada foi realizado em biorreator de 5 L (BIOFLO 110, New Brunswick Scientific CO, New Jersey, USA), com volume inicial de 3 L.

A composição do meio de cultivo foi idêntica a composição do MM1 (descrito no item 3.1), com exceção da glicose que apresentou concentração inicial de 47 g.L^{-1} . O biorreator, contendo a solução do meio de cultivo (com exceção da ureia, da glicose e do KH_2PO_4), foi autoclavado durante 20 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$. O inóculo representou 10 % do volume final (300 mL). As soluções concentradas de glicose, KH_2PO_4 e ureia, adicionadas de forma estéril no início do experimento, apresentavam concentração de $500 \text{ g}_G.\text{L}^{-1}$, $27 \text{ g}_P.\text{L}^{-1}$ e $200 \text{ g}_N.\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Durante o cultivo, a temperatura foi mantida em $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e o pH ajustado a 7,0 com soluções de NaOH 100 g.L^{-1} ou HCl 274 mL.L^{-1} . As condições iniciais de agitação e aeração foram de 450 rpm e 0,1 vvm, respectivamente, sendo aumentadas gradualmente de forma a manter a concentração de oxigênio dissolvido superior a 30 %, em relação à saturação com ar atmosférico. Polipropilenoglicol foi utilizado como antiespumante e adicionado quando necessário.

4.2.3 Resultados para construção do modelo fenomenológico

Conforme o esquema apresentado na Figura 4.27, as primeiras etapas para construção do modelo fenomenológico são: a definição de uma rede metabólica simplificada e a obtenção das velocidades específicas máximas para cada reação envolvida nesta rede. Ambas as etapas foram concluídas a partir da Análise de Fluxos Metabólicos.

A rede metabólica simplificada (Figura 4.28) foi obtida a partir das reações consideradas na AFM para produção de P(3HB) por *C. necator* (Figura I.19 e Tabela I.2 – APÊNDICE I). Após a definição da rede metabólica simplificada, a estequiometria do crescimento celular e as velocidades específicas máximas para cada reação envolvida na rede foram calculadas, também a partir da AFM.

No esquema do modelo fenomenológico (Figura 4.28), considerou-se que a produção de biomassa esta associada aos intermediários: glicose-6P, piruvato, acetil-CoA, oxaloacetato (OAA), α -cetogluturato, Triose-P, NADPH, NADH e ATP. A Triose-P não é um intermediário necessário para a produção da biomassa, conforme a rede anabólica construída para *C. necator* por Grousseau (2012), porém ao

desconsiderarem-se alguns outros intermediários, como a frutose-P, pentose-P, etc, no modelo fenomenológico, o balanço de carbonos não ficou equilibrado. A demanda de carbono para produção da biomassa era superior à disponibilidade deste elemento. Para contornar este problema, as demandas em frutose-P, pentose-P, eritrose-P e glicerol-P, para produção da biomassa, foram convertidas em “equivalente Triose-P”, ou seja, no modelo fenomenológico considerou-se que a Triose-P supriria a quantidade de carbono que deveria ser fornecida pelos quatro intermediários que foram desconsiderados. Da mesma forma, o fumarato foi convertido em equivalente α -cetoglutarato (aKg), e a demanda em fosfo-enol-piruvato (PEP), convertida em glicose-6P. A partir deste arranjo, todo o carbono necessário para formação de 1 g de biomassa foi fornecido.

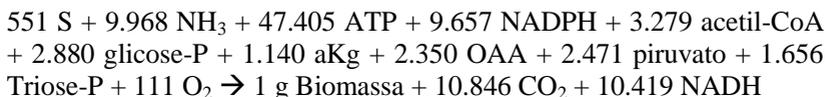
Para obtenção da estequiometria da biomassa, primeiramente verificou-se a demanda anabólica de todos os intermediários metabólicos necessários para a produção de 1 g de biomassa (considerou-se a produção de P(3HB) nesta etapa como nula), através do *software*. Posteriormente, estas demandas foram impostas como se houvessem sido medidas, ou seja, o *software* não as recalcularia e consideraria que toda demanda necessária destes intermediários já havia sido fornecida (uma restrição foi imposta). Os intermediários que não foram fornecidos ao macro desta forma foram: PEP, Succinil, Succinil-CoA, NADPH, NADH, CO₂ e ATP. Ao compilar o *software* com estas restrições foi possível obter a demanda mínima de glicose para que a demanda de PEP, Succinil e Succinil-Coa fosse suprida. De forma a facilitar o desenvolvimento posterior do modelo, a demanda em glicose foi transferida para a glicose-6P.

Durante a assimilação da glicose, a partir da restrição imposta (descrita acima), foram produzidos NADPH, NADH e ATP. A produção de NADPH e ATP foi inferior a demanda estequiométrica e, sendo assim, estes intermediários ficam do lado esquerdo da equação (NADPH e ATP deverão ser fornecidos para a produção de 1 g de biomassa). Em contrapartida, há uma produção de NADH superior à demanda, e então este intermediário fica como produto da reação, do lado direito, juntamente com o CO₂ e a biomassa.

Para obter o valor de equivalente Triose-P, verificou-se a demanda anabólica ($\mu\text{mol/g}_{\text{Xr}}\cdot\text{h}$) de eritrose-P (-358), frutose-P (-95), pentose-P (-602) e glicerol-P (-16). Conhecendo-se estes valores, multiplicou-se a demanda de cada intermediário pelo seu correspondente número de carbonos e dividiu-se por 3 (número de carbonos da Triose-P). A soma dos valores forneceu um valor de

equivalente Triose-P de 1656 $\mu\text{mol/g}_{\text{Xr.h}}$. O mesmo procedimento foi realizado ao transformar-se o fumarato em equivalente aKg.

Com todas estas considerações, a estequiometria para a produção de 1 g de biomassa (40.662,46 $\mu\text{mol/g}_{\text{Xr.h}}$) ficou:



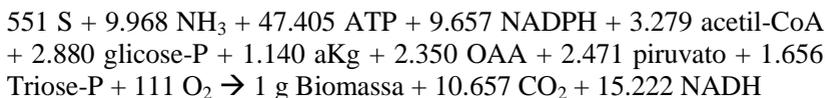
Ao realizar um balanço de carbono na reação estequiométrica percebeu-se que 188 $\mu\text{mol/g}_{\text{Xr.h}}$ de carbono excedente era produzido. Para que o balanço pudesse fechar (Consumido – Produzido = 0), este valor foi descontado da produção de CO_2 , ou seja, na estequiometria o valor de CO_2 passou a ser 10.657 $\mu\text{mol/g}_{\text{Xr.h}}$.

Após o balanço de carbonos ter fechado, verificou-se o balanço redox. O grau de redução de 40.662,46 $\mu\text{mol/g}_{\text{Xr.h}}$ de biomassa é igual a 4,183 (obtido pelo *software*), considerando-se composição da biomassa como $\text{CH}_{1.7494}\text{O}_{0.4359}\text{N}_{0.2463}$ e massa molar de 24.593 g/mol.

Sabendo-se a composição de CHON de todos os metabólitos considerados na estequiometria, é possível calcular o poder redutor de cada metabólito, e então realizar um balanço de poder redutor (H Consumido – H produzido = 0).

Ao realizar o balanço, verificou-se que o consumo de poder redutor (H) era superior a sua produção em 9.604 $\mu\text{mol/g}_{\text{Xr.h}}$. Para que o balanço fechasse, este poder redutor que deveria estar sendo produzido foi repassado para a produção de NADH, que ficou com valor resultante de 15.221,73 $\mu\text{mol/g}_{\text{Xr.h}}$.

Finalmente, a estequiometria de crescimento resultante ficou (em $\mu\text{mol/g}_{\text{Xr.h}}$):



Vale ressaltar que no ciclo TCA existe a produção de 1 FADH e 3 NADH, porém sua conversão em ATP pela fosforilação oxidativa é diferente, e a relação fica 1 FADH = 2/3 NADH, para a glicose (GAUDIN, 1998). Para facilitar os cálculos e evitar que mais uma variável fosse adicionada ao sistema no modelo fenomenológico, considerou-se que 1 FADH = 1 NADH e, sendo assim, no TCA do

modelo existe a produção de 4 NADH. Os erros embutidos nesta consideração são muito pequenos e podem ser desconsiderados.

Após obter a estequiometria da biomassa, obtiveram-se as velocidades específicas máximas (q_{\max}) para cada reação. No esquema da Figura 4.28, as reações são representadas pelo símbolo “q”. Para cada q, existe uma velocidade específica máxima (q_{\max}).

Para determinação das velocidades específicas máximas (q_{\max}) que podem ser atingidas para cada uma destas reações, diversas simulações foram realizadas utilizando-se o *software* construído por Grousseau (2012), na configuração apresentada na Figura I-19 (APÊNDICE I).

Primeiramente avaliou-se apenas a situação da fase de crescimento, e a reação q7 foi desconsiderada (para desconsiderar esta reação da Figura 4.28, as reações 37, 38 e 39, representadas na Figura I-19, foram desativadas no modelo). Para todas as situações da fase de crescimento avaliadas, as velocidades específicas máximas de consumo de glicose ($q1$) e de crescimento celular ($q15$) foram fixadas em $0,45 \text{ g}_G \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($2,5 \times 10^{-3} \text{ mol}_G \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e $0,25 \text{ g}_{Xr} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($1,017 \times 10^{-2} \text{ mol}_{Xr} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), respectivamente (valores obtidos por Aragão, (1996)).

Na primeira situação avaliada, considerou-se a produção de NADPH tanto pela reação q2 quanto pela reação q9, e desconsiderou-se o consumo deste metabolito pela reação q11. Na segunda situação, considerou-se toda a produção de NADPH pela reação q2 e manteve-se a reação q11 desativada. Na terceira situação, manteve-se a produção de NADPH apenas pela reação q2 e a desativação da reação q11, mas a reação q3 também foi desconsiderada. A partir das inúmeras simulações que já haviam sido realizadas, utilizando-se os dados experimentais do presente trabalho, nas etapas de determinação da rede metabólica que seria considerada no *software*, verificou-se que a velocidade máxima atingida pela reação q11 foi de 4×10^{-4} , e assim, este valor foi fixado para a velocidade específica máxima desta reação.

A produção de P(3HB) passou então a ser considerada nas simulações, e agora os valores das velocidades específicas máximas impostos ao *software* foram: $0,45 \text{ g}_G \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($2,5 \times 10^{-3} \text{ mol}_G \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), para o consumo de glicose ($q1$), $0,18 \text{ g}_{P(3HB)} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($2,095 \times 10^{-3} \text{ mol}_{P(3HB)} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), para produção de P(3HB) ($q7$) e $0,04 \text{ g}_{Xr} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($1,63 \times 10^{-2} \text{ mol}_{Xr} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), para o crescimento da biomassa ($q15$). O crescimento residual da biomassa foi considerado durante a fase de produção, pois Aragão (1996) obteve o valor de $0,18 \text{ g}_{P(3HB)} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ apenas nesta situação. Considerou-se ainda, nesta simulação, que todo o NADPH estava sendo produzido pela reação q2.

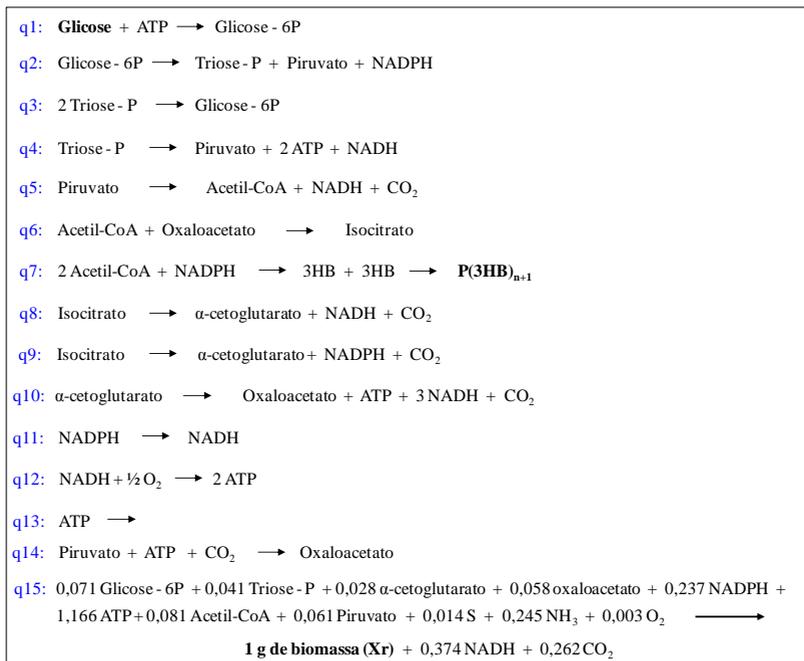
As velocidades específicas máximas consideradas no modelo fenomenológico foram as maiores velocidades obtidas, a partir destas simulações, para cada reação, e seus valores podem ser visualizados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Velocidades específicas máximas obtidas para as reações consideradas no modelo fenomenológico em diferentes situações.

Reações	q_{\max} obtidas considerando apenas a fase de crescimento ($\text{mol.g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	q_{\max} obtidas considerando a fase de produção ($\text{mol.g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	q_{\max} utilizadas no modelo fenomenológico ($\text{mol.g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
q1	$2,50 \times 10^{-3}$	$2,50 \times 10^{-3}$	$2,50 \times 10^{-3}$
q2	$2,93 \times 10^{-3}$	$2,56 \times 10^{-3}$	$2,93 \times 10^{-3}$
q3	$5,38 \times 10^{-4}$	$9,80 \times 10^{-5}$	$5,38 \times 10^{-4}$
q4	$1,98 \times 10^{-3}$	$2,32 \times 10^{-3}$	$2,32 \times 10^{-3}$
q5	$2,31 \times 10^{-3}$	$4,56 \times 10^{-3}$	$4,56 \times 10^{-3}$
q6	$1,69 \times 10^{-3}$	$2,78 \times 10^{-4}$	$1,69 \times 10^{-3}$
q7	0,00	$2,10 \times 10^{-3}$	$2,10 \times 10^{-3}$
q8	$1,60 \times 10^{-3}$	$2,78 \times 10^{-4}$	$1,60 \times 10^{-3}$
q9	$6,34 \times 10^{-4}$	0,00	$6,34 \times 10^{-4}$
q10	$1,45 \times 10^{-3}$	$2,09 \times 10^{-4}$	$1,45 \times 10^{-3}$
q11	$4,00 \times 10^{-4}$	0,00	$4,00 \times 10^{-4}$
q12	$1,56 \times 10^{-2}$	$1,51 \times 10^{-2}$	$1,56 \times 10^{-2}$
q13	$3,62 \times 10^{-3}$	$1,52 \times 10^{-2}$	$1,52 \times 10^{-2}$
q14	$8,37 \times 10^{-4}$	$1,34 \times 10^{-4}$	$8,37 \times 10^{-4}$
q15	$1,02 \times 10^{-2}$	$1,63 \times 10^{-3}$	$1,02 \times 10^{-2}$

A próxima etapa para construção do modelo foi desenhar a matriz estequiométrica (M) que representa as 15 reações (15 linhas), e os 17 metabólitos (17 colunas), envolvidos no modelo simplificado, e o vetor das massas molares (MM). A matriz estequiométrica (15 x 17) pode ser visualizada na Figura 4.30 e foi desenhada a partir da estequiometria das reações consideradas, e listadas na Figura 4.29. No caso do vetor das massas molares, um vetor com 17 elementos foi criado (um elemento para cada metabólito considerado na rede).

Figura 4.29: Relações estequiométricas consideradas na rede metabólica simplificada para produção de P(3HB) por *C. necator*, a partir de glicose. A estequiometria da biomassa é dada em $\text{mol.g}_{\text{Xr}}^{-1}$.



A ordem em que os metabólitos são colocados no vetor deve ser a mesma da matriz metabólica e, posteriormente, esta ordem deve ser mantida para a etapa de inicialização das variáveis e implementação do modelo no Matlab. Logo, se a glicose está na primeira coluna da matriz estequiométrica, também deve ser o primeiro elemento do vetor das massas molares. No caso do vetor das massas molares, os metabólitos intracelulares, assim como as coenzimas, o N, o O₂ e o CO₂ receberam o valor 1, o que indica que estes valores são fornecidos através da inicialização das variáveis em mol, e que a resposta do modelo também será em mol. Os metabólitos extracelulares, glicose, P(3HB) e Xr receberam seus respectivos valores de massa molar, 180 g.mol^{-1} , 86 g.mol^{-1} (considera-se o monômero 3HB) e 24,59 g.Cmol^{-1} (ARAGÃO, 1996), respectivamente. Desta forma, estes metabólitos são fornecidos ao modelo em massa, e o valor retornado pelo modelo também será mássico. Os valores também podem ser fornecidos em termos de concentração (mol.L^{-1} ou g.L^{-1}).

Figura 4.30: Matriz estequiométrica considerada no modelo fenomenológico para produção de P(3HB) por *C. necator*, a partir de glicose. Os coeficientes estequiométricos da biomassa apresentam unidade de mol·g_{Xr}⁻¹.

	Glicose	Glicose - 6P	Triose - P	Pinivato	Acetil-CoA	Isocitrato	akg	OAA	Xr	P(3HB)	CO2	S	NH3	ATP	NADH	NADPH	O2
q1	1													-1			
q2	-1	1	1	1												1	
q3	1	-2												2	1		
q4		-1	1												1		
q5			-1	1							1						
q6				-1	1			-1									
q7				-2						1						-1	
q8					-1		1				1				1		
q9					-1		1				1				1		
q10							-1	1			1			1	3		
q11														2	1	-1	-0,5
q12														-1			
q13								1						-1			
q14			-1						1		-1						
q15	-0,071	-0,041	-0,041	-0,061	-0,081		-0,028	-0,058	1,0000		0,262	-0,014	-0,0245	-1,166	0,374	-0,237	-0,003

Depois de desenhados a matriz estequiométrica e o vetor das massas molares, foi preciso escrever as equações da velocidade específica para cada uma das 15 reações. Estas velocidades são obtidas a partir da velocidade específica máxima (q_{\max} , já determinadas a partir da AFM) e a ativação ou da inibição por metabólitos (equações do tipo Michaelis-Menten).

Inicialmente, o equacionamento foi proposto apenas pela avaliação visual do esquema da rede metabólica simplificada, e depois ajustes foram feitos. Por exemplo, no caso da reação q1 (relativa ao consumo da glicose para produção de glicose-6P) considerou-se uma ativação pela concentração de glicose. Nesta ativação, a velocidade de consumo de glicose só será afetada caso a concentração de glicose no meio alcance valores muito baixos, e o valor da concentração que irá afetar a velocidade de consumo de glicose será função do k imposto à equação de ativação. Em contrapartida, em uma situação hipotética em que, após obter elevada concentração celular, houvesse uma redução da velocidade de crescimento celular, concomitante com baixa velocidade de produção de P(3HB), esta reação provavelmente seria inibida por algum metabólito do sistema (em uma situação real, o microrganismo reduziria a velocidade de consumo de glicose nestas condições). Como a literatura consultada não fornece muitos dados para a enzima responsável por esta reação em *C. necator*, considerou-se que o metabólito inibidor seria a glicose-6P, já que, como a glicose estaria sendo consumida em elevadas velocidades e os intermediários não estariam sendo consumidos de forma proporcional, uma elevação da concentração de glicose-6P (e de outros metabólitos) seria verificada. Em um primeiro momento, apenas estas duas considerações foram feitas para a reação q1, e as outras equações também foram propostas, seguindo a mesma linha de raciocínio. Posteriormente, realizaram-se algumas simulações e verificou-se que em situação de limitação em oxigênio, a concentração de NADH alcançava valores muito altos, e não condizentes com valores possíveis de serem alcançados na célula (o NADH é oxidado em velocidades inferiores na fosforilação oxidativa devido à limitação em oxigênio, quando comparado à situação de excesso de O_2 , o que justifica o acúmulo observado na simulação).

Uma vez que NADH é produzido em elevadas quantidades durante a assimilação de glicose, e esta via é necessária para a obtenção do Acetil-CoA, para produção de biomassa e P(3HB), a única forma de manter a concentração de NADH em valores compatíveis com a realidade da célula, foi reduzir a velocidade de consumo de glicose. Para isto, uma inibição por NADH foi considerada na reação q1. Vale

ressaltar que o valor para o k da inibição por NADH foi imposto de forma que em outra condição, que não a limitação em oxigênio, a concentração de NADH não proporcionasse efeito inibidor para esta reação. Bowien, Cook e Schlegel (1974) mostraram que a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase é inibida quando elevadas concentrações de NADH são alcançadas em *C. necator*, tornando essa inibição proposta no modelo como algo compatível ao que ocorre biologicamente.

De forma análoga, para todas as outras reações (com exceção da q15 – produção de X_r), o metabólito precursor foi considerado como ativador da reação. Assim, quando concentrações muito baixas deste metabólito são atingidas, a velocidade da reação é reduzida.

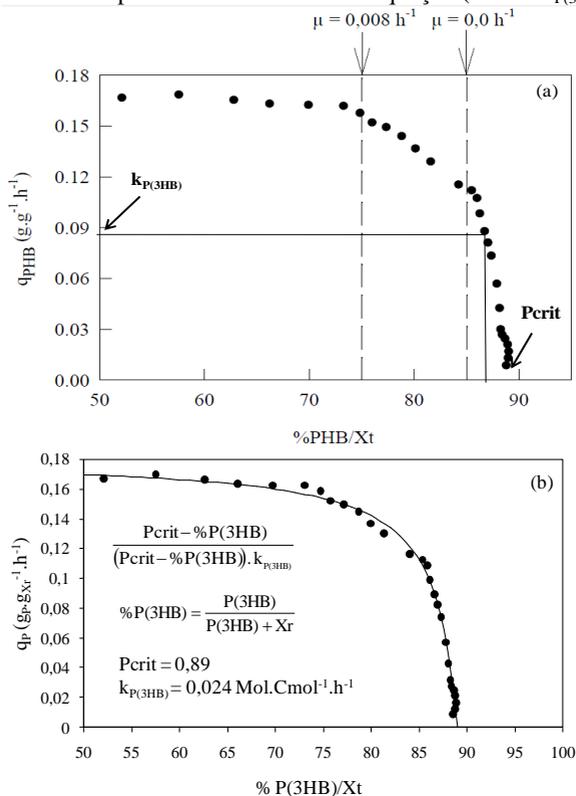
Na reação q2, além da ativação por glicose-6P, considerou-se uma inibição por NADPH. A reação q2 é a principal responsável pela produção de NADPH da célula, já que a proporção produzida no TCA é muito inferior, inclusive na fase de crescimento. Quando ocorre a limitação em nitrogênio, os níveis de NADPH se elevam, e se nenhuma restrição for considerada no modelo, esta elevação atingirá valores acima dos valores passíveis de serem atingidos pela célula. Da mesma forma, uma inibição por NADPH foi considerada na reação q3. Quando a reação q3 está ativa em velocidades elevadas, ela é responsável por um reciclo da glicose-6P pela via de ED, o que promove a produção de NADPH. Se a concentração de NADPH já está elevada, provavelmente esta reação não está ativa.

As reações q4 e q5 não sofrem inibição por nenhum metabólito. A reação q6 é uma reação chave no processo, já que ela é responsável por controlar a assimilação de Acetil-CoA no TCA. Muitos estudos já foram feitos para elucidar a regulação das enzimas responsáveis pela conversão do Acetil-CoA e do Oxaloacetato em Isocitrato (BABEL; ACKERMANN; BREUER, 2001; LEE et al., 1995). Nestes estudos, afirma-se que a enzima citrato sintase é inibida pelas concentrações elevadas de NADH e NADPH, que são produzidas em maior quantidade quando algum nutriente é limitado durante o processo, a fim de induzir a produção de P(3HB). Desta forma, considerou-se estes dois metabolitos como inibidores da reação q6.

Na reação q7, as ativações por Acetil-CoA e NADPH foram impostas. Aragão (1996) mostrou que, após uma concentração crítica de P(3HB) intracelular, o acúmulo de polímero era cessado. Apesar de *C. necator* acumular elevadas porcentagens de PHA, é biologicamente impossível a célula armazenar 100 % de sua massa seca em polímero. A Figura 4.31 mostra os resultados obtidos por Aragão (1996). A partir

destes resultados, foi possível obter uma equação que representasse o comportamento experimental observado pelo autor, e esta equação também foi considerada na reação q7. O valor de $k_{P(3HB)}$ utilizado foi convertido para base molar ($0,024 \text{ mol.Cmol}^{-1}.\text{h}^{-1}$ igual a $0,085 \text{ g}_{Pr}.\text{g}_{Xr}^{-1}.\text{h}^{-1}$), pois as equações do modelo demandam parâmetros em base molar. Dias et al. (2005) consideraram equação similar a esta em seu modelo estruturado para produção de P(3HB) em cultura mista, a partir de acetato.

Figura 4.31: (a) Dados experimentais obtidos por Aragão (1996) para a relação entre a velocidade específica de produção de P(3HB) (q_p) em função da porcentagem de P(3HB) intracelular para *C. necator*, utilizando glicose como fonte de carbono; (b) Dados experimentais obtidos por Aragão (1996) (●), ajuste da equação proposta aos dados experimentais (—), equação de ajuste proposta e valores dos parâmetros utilizados na equação (P_{crit} e $k_{P(3HB)}$).



As reações q8, q9, q10, q11, q12 e q13 não sofreram inibição por metabólitos. Na reação q11, considerou-se que a ativação da reação ocorreria apenas em elevadas concentrações de NADPH.

Na reação q14, uma inibição por oxaloacetato foi incluída. Se oxaloacetato está sendo formado em excesso, no TCA, elevada velocidade de formação deste metabólito a partir do piruvato não parece provável.

A reação q15 envolve muitos metabólitos, e se todos fossem considerados como ativadores, seria difícil chegar a uma situação em que a reação funcionasse em velocidade máxima. Por esta razão, escolheu-se considerar que a reação é ativada apenas por oxigênio, enxofre e nitrogênio, já que estes são os metabólitos em que concentrações mais elevadas são responsáveis pela redução da velocidade de reação. Sabe-se que o acúmulo de P(3HB) influencia a velocidade específica de crescimento (μ_{Xr}). Para considerar a redução de μ_{Xr} em concentrações elevadas de P(3HB), o termo a seguir foi adicionada ao modelo (Equação 4.3), sendo kp a porcentagem máxima de P(3HB) que pode ser produzido por *C. necator* (em torno de 90 % (ARAGÃO, 1996), $kp = 0,9$). Se nenhum metabólito fosse considerado como inibidor nesta reação, ela ocorreria em velocidade máxima até o momento em que um dos três metabólitos (oxigênio, enxofre ou nitrogênio) atingisse concentração limitante no meio. Assim, optou-se por considerar uma inativação por ATP, já que a participação deste metabólito é bastante dinâmica no sistema (produzido ou consumido em diversas reações da rede metabólica).

$$\left(1 - \frac{\%P(3HB)}{kp}\right) \quad (4.3)$$

Como os valores de k, considerados nas equações de ativação e inibição das reações, não podiam ser obtidos experimentalmente, uma hipótese inicial foi proposta, e posteriormente, os valores foram ajustados através de diversas simulações. Para que esta hipótese inicial seguisse um padrão, considerou-se que a velocidade específica das reações eram iguais às velocidades específicas máximas ($q = q_{max}$). Posteriormente, multiplicou-se os valores de q pela matriz estequiométrica, obtendo-se uma “concentração intracelular” para cada metabólito. Por exemplo, para a glicose-6P:

$$q1*1 - q2*1 + q3*1 - q15*0,029 = 1,88 \times 10^{-4} \text{ mol.g}_{Xr}^{-1}$$

Desta forma, a “concentração intracelular” estimada para glicose-6P é igual a $1,88 \times 10^{-4} \text{ mol.g}_{Xr}^{-1}$. Considerando-se que o valor de k deve ser em torno de 10 vezes menor do que o valor da concentração interna

do metabólito na célula, dividiu-se o valor de k por 10. Este valor foi considerado a estimativa inicial para os valores de k nas equações de ativação e inibição reacionais. Nesta primeira tentativa, o valor de k para cada metabólito foi considerado igual em todas as reações.

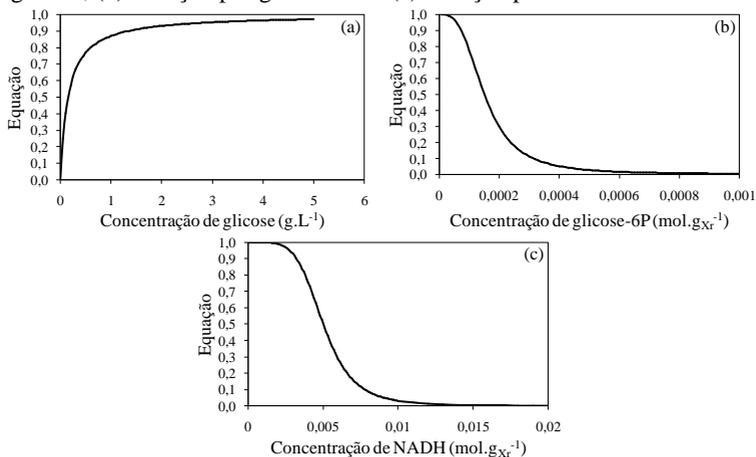
É importante considerar-se tempos de relaxação (TAU), ou de adaptação, nos modelos estruturados. Através destes tempos de relaxação, as modificações que ocorrem no meio de cultivo são “percebidas” de forma menos brusca pelo microrganismo. Esta consideração é importante, pois, em um sistema real, o microrganismo possui um tempo de adaptação intracelular para as modificações ambientais, como pulso de glicose, nitrogênio, etc. Sendo assim, tempos de relaxação foram adicionados ao modelo através de uma função de atividade intracelular. Guttfreud (1971) reporta que o tempo de relaxação para enzimas desidrogenases está em torno de 3×10^{-3} e 0,3 s, dependendo da perturbação ocorrida no sistema. Chance e Williams (1966) observaram que o tempo transiente entre dois estados estacionários para a cadeia redox é de 5 a 30 s, que reflete em um grande número de interações no metabolismo celular.

A seguir estão descritas as equações para as velocidades específicas reacionais, assim como, os valores de k ($\text{mol.g}_{\text{Xr}}^{-1}$) e p considerados nas equações de ativação e inibição. As Figuras 4.32 a 4.43 apresentam como as concentrações de metabólitos ativam ou inibem as reações.

$$q_1 = q_{1\text{max}} \cdot \frac{\text{Gluc}^{p_{1\text{gluc}}}}{\text{Gluc}^{p_{1\text{gluc}}} + k_{1\text{gluc}}^{p_{1\text{gluc}}}} \cdot \frac{k_{1\text{glucP}}^{p_{1\text{glucP}}}}{\text{GlucP}^{p_{1\text{glucP}}} + k_{1\text{glucP}}^{p_{1\text{glucP}}}} \cdot \frac{k_{1\text{NADH}}^{p_{1\text{NADH}}}}{\text{NADH}^{p_{1\text{NADH}}} + k_{1\text{NADH}}^{p_{1\text{NADH}}}} \quad (4.4)$$

$q_{1\text{max}} = 0,45 \text{ g.g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	
$p_{1\text{gluc}} = 1$	$k_{1\text{gluc}} = 0,15 \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$
$p_{1\text{glucP}} = 3$	$k_{1\text{glucP}} = 1,5 \times 10^{-4}$
$p_{1\text{NADH}} = 5$	$k_{1\text{NADH}} = 5 \times 10^{-3}$

Figura 4.32: Representação do comportamento das equações de ativação e inibição frente a concentração dos metabólitos para a reação q1. (a) Ativação por glicose, (b) inibição por glicose-6P e (c) inibição por NADH.



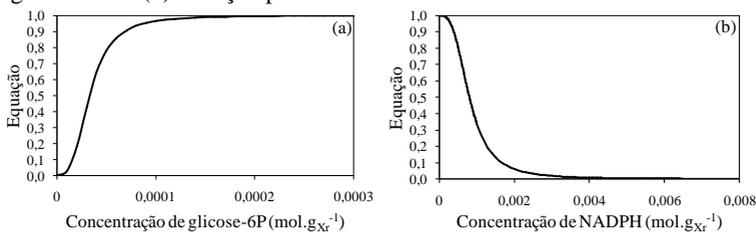
$$q_2 = q_{2\max} \cdot \frac{\text{glucP}^{p2\text{glucP}}}{\text{glucP}^{p2\text{glucP}} + k_{2\text{glucP}}^{p2\text{glucP}}} \cdot \frac{k_{2\text{NADPH}}^{p2\text{NADPH}}}{\text{NADPH}^{p2\text{NADPH}} + k_{2\text{NADPH}}^{p2\text{NADPH}}} \quad (4.5)$$

$$q_{2\max} = 2,93 \times 10^{-3} \text{ mol.g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$p_{2\text{glucP}} = 3 \qquad k_{2\text{glucP}} = 3,3 \times 10^{-5}$$

$$p_{2\text{NADPH}} = 3 \qquad k_{2\text{NADPH}} = 8 \times 10^{-4}$$

Figura 4.33: Representação do comportamento das equações de ativação e inibição frente a concentração dos metabólitos para a reação q2. (a) Ativação por glicose-6P e (b) inibição por NADH.



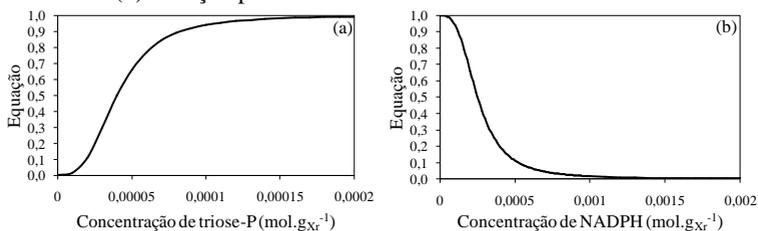
$$q_3 = q_{3\max} \cdot \frac{\text{triose} - \text{P}^{p3\text{trioseP}}}{\text{triose} - \text{P}^{p3\text{trioseP}} + k_{3\text{trioseP}}^{p3\text{trioseP}}} \cdot \frac{k_{3\text{NADPH}}^{p3\text{NADPH}}}{\text{NADPH}^{p3\text{NADPH}} + k_{3\text{NADPH}}^{p3\text{NADPH}}} \quad (4.6)$$

$$q_{3\max} = 5,38 \times 10^{-4} \text{ mol.g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$p_{3\text{trioseP}} = 3 \qquad k_{3\text{trioseP}} = 4 \times 10^{-5}$$

$$p_{3\text{NADPH}} = 3 \qquad k_{3\text{NADPH}} = 2,5 \times 10^{-4}$$

Figura 4.34: Representação do comportamento das equações de ativação e inibição frente a concentração dos metabólitos para a reação q3. (a) Ativação por triose-P e (b) inibição por NADPH.



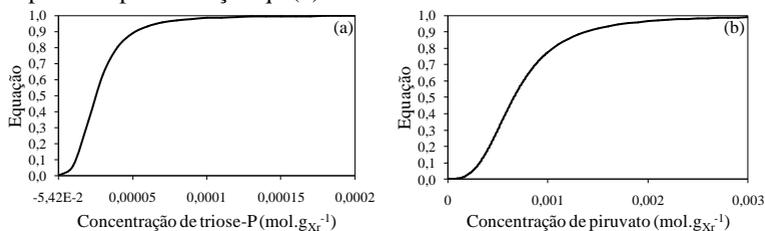
$$q_4 = q_{4\max} \cdot \frac{\text{triose} - p^{4\text{trioseP}}}{\text{triose} - p^{4\text{trioseP}} + k_{4\text{trioseP}} p^{4\text{trioseP}}} \quad (4.7)$$

$$\frac{q_{4\max} = 2,32 \times 10^{-3} \text{ mol.gXr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}}{p_{4\text{trioseP}} = 3 \quad k_{4\text{trioseP}} = 2,5 \times 10^{-5}}$$

$$q_5 = q_{5\max} \cdot \frac{\text{pyr}^{p_{5\text{pyr}}}}{\text{pyr}^{p_{5\text{pyr}}} + k_{5\text{pyr}} p^{p_{5\text{pyr}}}} \quad (4.8)$$

$$\frac{q_{5\max} = 4,56 \times 10^{-3} \text{ mol.gXr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}}{p_{5\text{pyr}} = 3 \quad k_{5\text{pyr}} = 6,6 \times 10^{-5}}$$

Figura 4.35: Representação do comportamento da equação de ativação pela concentração de triose-P para a reação q4. (a) e de ativação pela concentração de piruvato para a reação q5 (b).



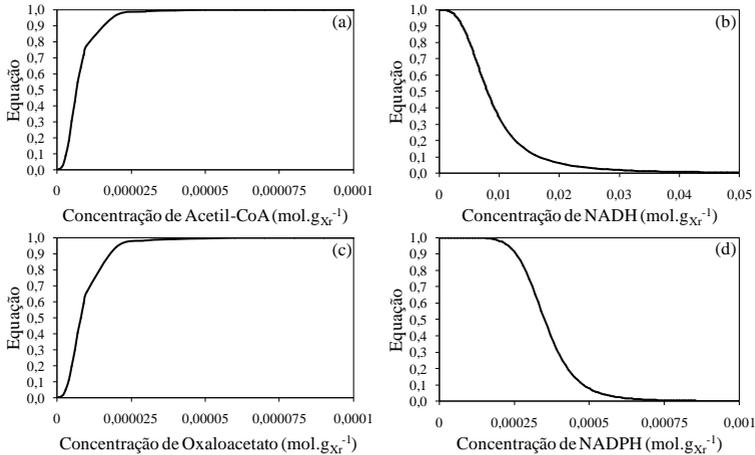
$$q_6 = q_{6\max} \cdot \frac{ACoA^{p_6ACoA}}{ACoA^{p_6ACoA} + k_{6ACoA}^{p_6ACoA}} \cdot \frac{OAA^{p_6OAA}}{OAA^{p_6OAA} + k_{6OAA}^{p_6OAA}} \quad (4.9)$$

$$\cdot \frac{k_{6NADH}^{p_6NADH}}{NADH^{p_6NADH} + k_{6NADH}^{p_6NADH}} \cdot \frac{k_{6NADPH}^{p_6NADPH}}{NADPH^{p_6NADPH} + k_{6NADPH}^{p_6NADPH}}$$

$$q_{6\max} = 1,69 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$p_{6ACoA} = 3$	$k_{6ACoA} = 6,6 \times 10^{-6}$
$p_{6NADH} = 3$	$k_{6NADH} = 8 \times 10^{-3}$
$p_{6OAA} = 3$	$k_{6OAA} = 8 \times 10^{-6}$
$p_{6NADPH} = 7$	$k_{6NADPH} = 3,5 \times 10^{-4}$

Figura 4.36: Representação do comportamento das equações de ativação e inibição frente a concentração dos metabólitos para a reação q_6 . (a) Ativação por Acetil-CoA, (b) inibição por NADH, (c) ativação por oxaloacetato e (d) inibição por NADPH.



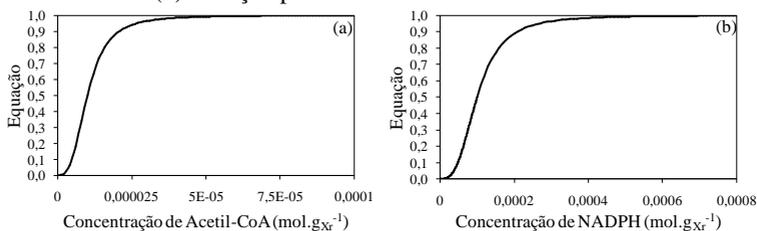
$$q_7 = q_{7\max} \cdot \frac{ACoA^{p_7ACoA}}{ACoA^{p_7ACoA} + k_{7ACoA}^{p_7ACoA}} \cdot \frac{NADPH^{p_7NADPH}}{NADPH^{p_7NADPH} + k_{7NADPH}^{p_7NADPH}} \quad (4.10)$$

$$\frac{(\text{Pcrit} - \text{PHB})}{(\text{Pcrit} - \text{PHB}) + k_{\text{PHB}}}$$

$$q_{7\max} = 0,18 \text{ g} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} = 2,095 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$p_{7ACoA} = 3$	$k_{7ACoA} = 1 \times 10^{-5}$
$p_{7NADPH} = 3$	$k_{7NADPH} = 1 \times 10^{-4}$
$\text{Pcrit} = 0,89$	$k_{\text{PHB}} = 2,4 \times 10^{-2}$

Figura 4.37: Representação do comportamento das equações de ativação e inibição frente a concentração dos metabólitos para a reação q7. (a) Ativação por Acetil-CoA e (b) ativação por NADPH.



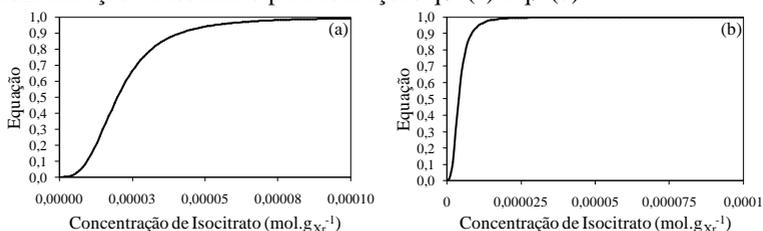
$$q_8 = q_{8\max} \cdot \frac{Iso^{p8Iso}}{Iso^{p8Iso} + k_{8Iso}^{p8Iso}} \quad (4.11)$$

$$\frac{q_{8\max} = 1,60 \times 10^{-3} \text{ mol.gXr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}}{p_{8Iso} = 3 \quad k_{8Iso} = 2 \times 10^{-5}}$$

$$q_9 = q_{9\max} \cdot \frac{Iso^{p9Iso}}{Iso^{p9Iso} + k_{9Iso}^{p9Iso}} \quad (4.12)$$

$$\frac{q_{9\max} = 6,34 \times 10^{-4} \text{ mol.gXr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}}{p_{9Iso} = 3 \quad k_{9Iso} = 4 \times 10^{-6}}$$

Figura 4.38: Representação do comportamento da equação de ativação pela concentração de isocitrato para as reações q8. (a) e q9 (b).



$$q_{10} = q_{10\max} \cdot \frac{aK_g^{p10aKg}}{aK_g^{p10aKg} + k_{10aKg}^{p10aKg}} \quad (4.13)$$

$$\frac{q_{10\max} = 1,45 \times 10^{-3} \text{ mol.gXr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}}{p_{10aKg} = 5 \quad k_{10aKg} = 2 \times 10^{-5}}$$

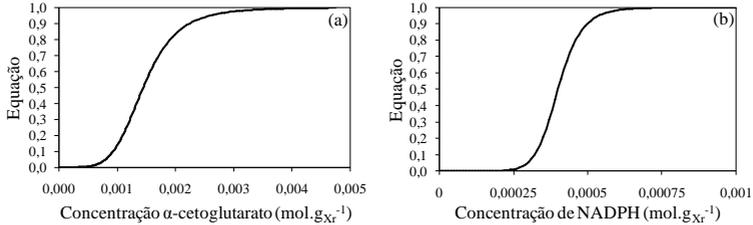
$$q_{11} = q_{11\max} \cdot \frac{NADPH^{p11NADPH}}{NADPH^{p11NADPH} + k_{11NADPH}^{p11NADPH}} \quad (4.14)$$

$$q_{11\max} = 4 \times 10^{-4} \text{ mol.gXr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$p_{11\text{NADPH}} = 10$$

$$k_{11\text{NADPH}} = 5,10^{-3}$$

Figura 4.39: Representação do comportamento da equação de ativação pela concentração de α -cetoglutarato para a reação q10. (a) e ativação pela concentração de NADPH para a reação q11 (b).



$$q_{12} = q_{12\text{max}} \cdot \frac{\text{NADH}^{p_{12\text{NADH}}}}{\text{NADH}^{p_{12\text{NADH}}} + k_{12\text{NADH}}^{p_{12\text{NADH}}}} \cdot \frac{\text{O}_2^{p_{12\text{O}_2}}}{\text{O}_2^{p_{12\text{O}_2}} + k_{12\text{O}_2}^{p_{12\text{O}_2}}} \quad (4.15)$$

$$q_{12\text{max}} = 1,56 \times 10^{-2} \text{ mol.gXr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

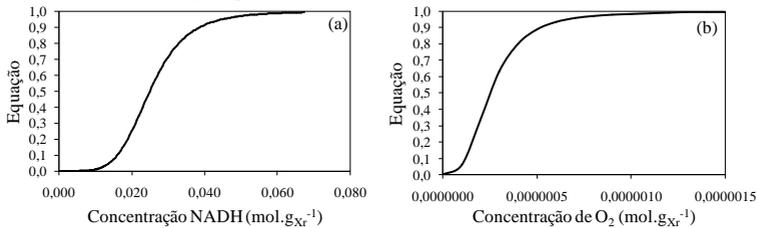
$$p_{12\text{NADH}} = 5$$

$$k_{12\text{NADH}} = 2,5 \times 10^{-2}$$

$$p_{12\text{O}_2} = 3$$

$$k_{12\text{O}_2} = 2,5 \times 10^{-7}$$

Figura 4.40: Representação do comportamento das equações de ativação e inibição frente a concentração dos metabólitos para a reação q12. (a) Ativação por NADH e (b) ativação por O_2 .



$$q_{13} = q_{13\text{max}} \cdot \frac{\text{ATP}^{p_{13\text{ATP}}}}{\text{ATP}^{p_{13\text{ATP}}} + k_{13\text{ATP}}^{p_{13\text{ATP}}}} \quad (4.16)$$

$$q_{13\text{max}} = 1,51 \times 10^{-2} \text{ mol.gXr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$p_{13\text{ATP}} = 5$$

$$k_{13\text{ATP}} = 4,5 \times 10^{-4}$$

Figura 4.41: Representação do comportamento das equações de ativação frente a concentração de ATP para a reação q13.

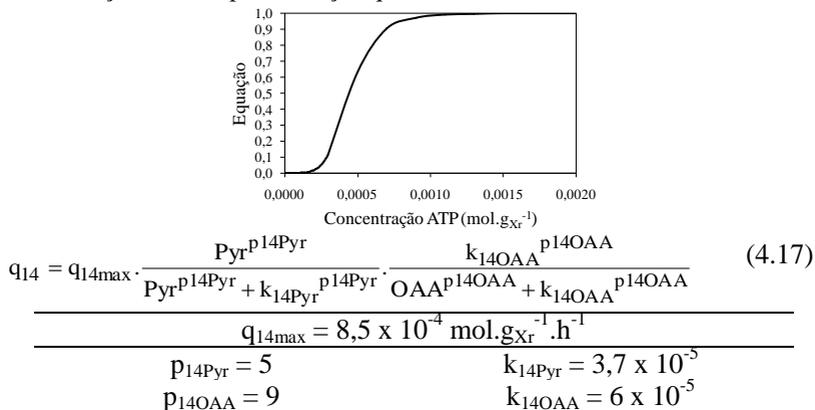
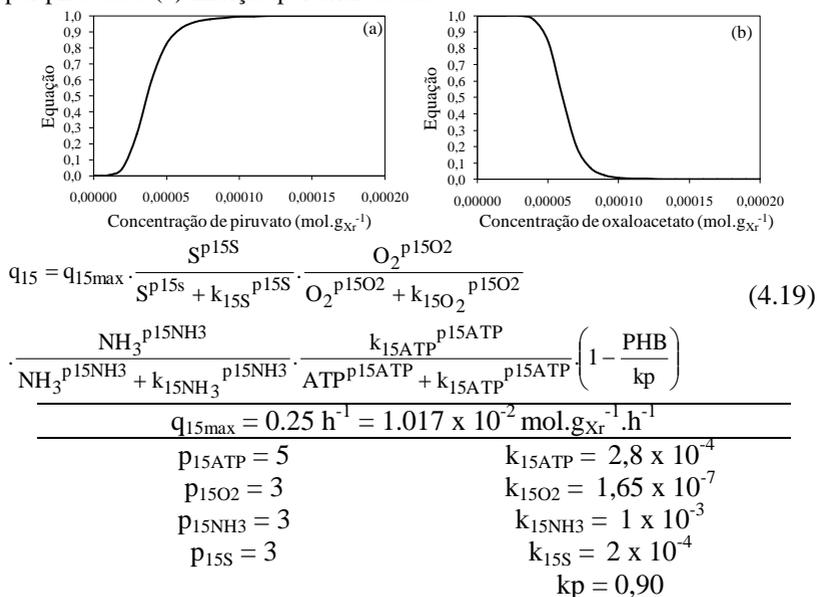


Figura 4.42: Representação do comportamento das equações de ativação e inibição frente a concentração dos metabólitos para a reação q14. (a) Ativação por piruvato e (b) inibição por oxaloacetato.



Com as equações que levam aos valores das velocidades específicas reacionais definidas, o próximo passo na construção do modelo fenomenológico foi realizar o cálculo das velocidades líquidas

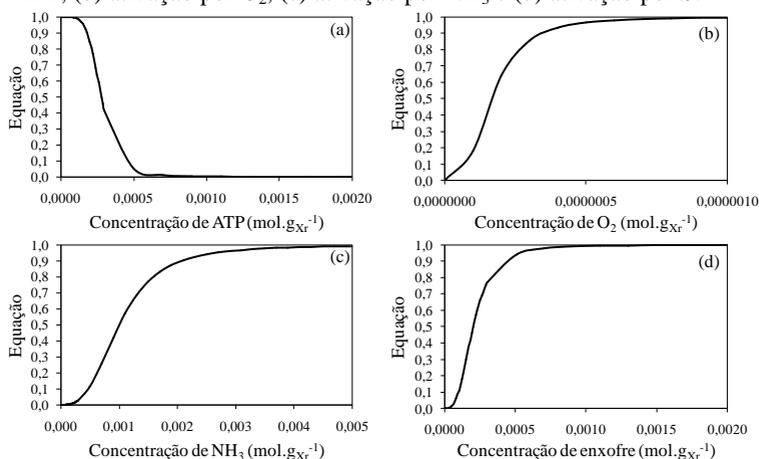
de reação (q_{liq}), que são função das velocidades específicas, da matriz estequiométrica e do vetor das massas molares (Equação 4.20).

$$q_{liq} = q.M.MM \quad (4.20)$$

E, por fim, as velocidades líquidas são consideradas nos balanços de massa para o sistema (Equações II-8 a II-12 do APÊNDICE II).

Implementando-se estas etapas no Matlab, o modelo fenomenológico está pronto para ser utilizado em diversas situações. As condições operacionais específicas do sistema que se deseja simular são consideradas separadamente.

Figura 4.43: Representação do comportamento das equações de ativação e inibição frente a concentração dos metabólitos para a reação q15. (a) Inibição por ATP, (b) ativação por O₂, (c) ativação por NH₃ e (d) ativação por S.



Spoljaric et al. (2013) propuseram um modelo estruturado simplificado, semelhante ao proposto no presente trabalho, porém, para a produção de P(3HB) a partir do glicerol. O modelo foi validado e utilizado para simular diferentes condições experimentais, a fim de obter uma condição otimizada, em termos de maior produção de P(3HB) e consequente aumento de produtividade do processo. A conclusão dos autores foi que utilizar uma maior concentração inicial de inóculo seria a melhor forma de aumentar a produção de P(3HB) e a produtividade do processo.

Um modelo estruturado simplificado, de dois compartimentos, foi proposto por Dias et al. (2005) para produção de P(3HB) em cultura mista, a partir de acetato. O modelo levou em conta 7 reações e 10 metabólitos, no qual equações de ativação ou inibição por metabólitos

foram adicionadas no controle das velocidades específicas reacionais. O modelo descreveu bem os dados experimentais e os autores afirmam que o mesmo pode ser aplicado como preditivo, na busca por condições que maximizem a produção de P(3HB).

De forma análoga, Penoglou et al. (2010) desenvolveram um modelo estruturado que leva em conta não só a dinâmica metabólica, mas também, a cinética de polimerização de P(3HB), produzido por espécies do gênero *Alcaligenes* a partir de carboidratos. O modelo apresentou bons resultados e além da cinética metabólica do processo, foi capaz de prever a massa molar do polímero produzido. Assim, o foco da predição pelo modelo pode ser tanto a maximização da produção de P(3HB), quanto a condição de processo que leve a uma determinada massa molar, em função de uma característica específica desejada.

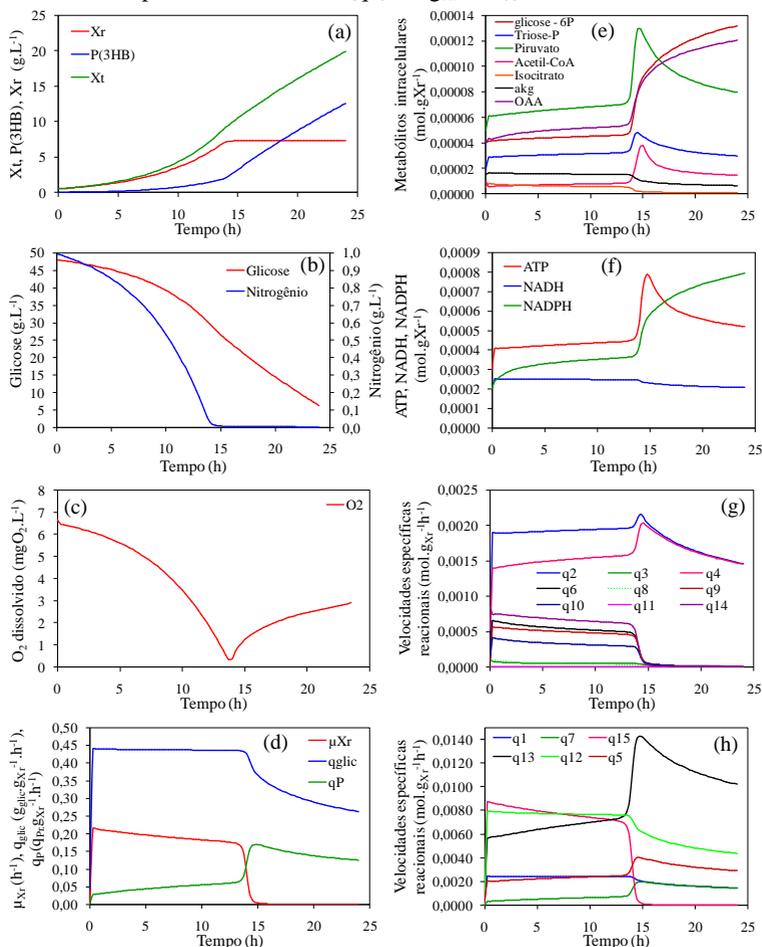
É possível observar que vários estudos de modelos estruturados têm sido realizados para produção de P(3HB), e que a aplicação deste tipo de modelagem vem ganhando espaço nos últimos anos, o que mostra mais uma vez a importância da modelagem proposta neste trabalho.

4.2.4 Simulações utilizando o modelo proposto

Para verificar as respostas do modelo fenomenológico a partir do equacionamento proposto no item 4.2.3, duas simulações foram realizadas. Ambas as situações simularam um cultivo em modo batelada: na primeira, considerou-se apenas a limitação em nitrogênio, e na segunda simulou-se uma dupla limitação em oxigênio e nitrogênio (Figuras 4.44 e 4.45, respectivamente). As condições iniciais nas simulações foram iguais, com exceção da transferência de oxigênio: 48 g.L^{-1} de glicose, 1 g.L^{-1} de nitrogênio, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de X_r e $0,00001 \text{ g.L}^{-1}$ de P(3HB) (nenhuma variável pode ser inicializada com zero, assim, um valor muito baixo é fornecido quando a variável deveria ser inicializada com zero). Na transferência de oxigênio considerou-se um k_{L_a} constante em ambos os casos, iguais a 125 h^{-1} e 80 h^{-1} , respectivamente.

Pelas Figuras 4.44 (a) e (b) verifica-se que 7 e $12,5 \text{ g.L}^{-1}$ de X_r e P(3HB) foram produzidos, enquanto 1 e 42 g.L^{-1} de nitrogênio e de glicose foram consumidos, respectivamente. Por estes resultados, obtêm-se $Y_{X/G}$ de $0,46 \text{ g}_{X_r} \cdot \text{g}_G^{-1}$ e $Y_{X_r/N}$ de $7 \text{ g}_{X_r} \cdot \text{g}_N^{-1}$. Também foi possível calcular $Y_{X_r/G}$ ($0,37 \text{ g}_{X_r} \cdot \text{g}_G^{-1}$) e $Y_{P/G}$ ($0,10$ e $0,45 \text{ g}_{P_r} \cdot \text{g}_G^{-1}$, para a fase de crescimento e de produção, respectivamente). Estes resultados estão de acordo com valores obtidos para os cultivos em modo batelada sequencial com reciclo externo de células (Tabela 4.2).

Figura 4.44: Resultados cinéticos obtidos pela simulação de um cultivo batelada para produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose, com exaustão de nitrogênio na fase de produção: (a) Xt, P(3HB) e Xr (g.L⁻¹); (b) glicose e nitrogênio (g.L⁻¹); (c) oxigênio dissolvido (mgO₂.L⁻¹); (d) velocidade específica de crescimento (μ_{Xr} (h⁻¹)), velocidade específica de produção de P(3HB) (q_P (g_{Pr}.g_{Xr}⁻¹.h⁻¹) e velocidade específica de consumo de glicose (q_{glic} (g_{glic}.g_{Xr}⁻¹.h⁻¹)); (e) concentração dos metabólitos intracelulares (mol.g_{Xr}⁻¹); (f) concentração intracelular de ATP, NADH e NADPH (mol.g_{Xr}⁻¹); (g) e (h) velocidades específicas reacionais (q (mol.g_{Xr}⁻¹.h⁻¹)).



Pela Figura 4.44 (c) percebe-se que, apesar da concentração de O₂ ter atingido valores baixos no meio de cultivo, em nenhum momento a concentração chegou a zero. A velocidade específica de consumo de

glicose (q_{glic}) manteve-se próxima ao valor máximo durante toda a fase de crescimento e, a partir do momento que houve a exaustão da fonte de nitrogênio, com consequente aumento da velocidade específica de produção de P(3HB) (q_p), q_{glic} sofre uma redução (Figura 4.44 (d)). Esta redução de q_{glic} ocorre, pois, na fase de produção as concentrações de NADPH e glicose-6P se elevam (Figura 4.44 (e) e (f)) e, com isso, ocorre uma inibição da reação q_1 no modelo (Figura 4.44 (h)). Valores de q_{glic} entre 0,11 e 0,27 $\text{g}_G \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ foram observados durante a fase de produção para *C. necator* (LEE et al., 1993).

A velocidade específica de crescimento (μ_{Xr}) mantém-se próxima ao valor máximo durante praticamente toda a fase de crescimento, e sofre um rápido decréscimo a partir de aproximadamente 14 h, provocado pela limitação em nitrogênio (Figuras 4.44 (b) e (d)). Uma produção residual de P(3HB) é observada durante a fase de crescimento, em que o q_p apresenta valores da ordem de 0,05 $\text{g}_{Pr} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Este valor de q_p condiz com o valor observado por Aragão (1996), e levou a um acúmulo de 21 % de P(3HB) ao final da fase de crescimento, valor reportado na literatura por diversos autores (ARAGÃO, 1996; BRAUNEGG et al., 1995; HORVAT et al., 2013).

Os metabólitos Piruvato, Triose-P, Acetil-CoA e ATP possuem comportamento similar durante o cultivo, sofrendo um repentino acúmulo no início da fase de produção que logo passa a ser consumido (Figuras 4.44 (e) e (f)). O mesmo comportamento é observado nas reações q_4 , q_5 e q_{13} (Figuras 4.44 (g) e (h)). Com a exaustão do nitrogênio, o ATP que era consumido na reação de formação da biomassa, passa a acumular no meio, e assim, a velocidade da reação q_{13} aumenta, de forma a consumir este excedente de ATP (Bowien, Cook e Schlegel (1974) verificaram acúmulo de ATP durante a fase de produção limitada em nitrogênio por *C. necator*). Da mesma forma, o Acetil-CoA, o Piruvato e a Triose-P também deixam de ser consumidos pela reação q_{15} , e, consequentemente, acumulam no meio. As velocidades das reações q_4 e q_5 aumentam, para consumir estes metabólitos e produzir Acetil-CoA, que é consumido em alta velocidade pela reação q_7 , responsável pela produção do P(3HB). Ahrens (1970) observou que, na ausência de nitrogênio, a concentração de piruvato intracelular aumenta em até cinco vezes, quando comparada às condições normais de crescimento. Ainda, pelas condições impostas no presente modelo, o oxaloacetato, a glicose-6P e o NADPH também sofrem um acúmulo a partir do início da fase de produção. No caso da glicose-6P, a mesma deixa de ser consumida para produção de biomassa e sofre acúmulo que inibe, por sua vez, a assimilação de glicose,

reduzindo a velocidade de q_1 . Porém estes níveis elevados não são consumidos, a menos que ocorra uma limitação de glicose. As velocidades das reações envolvidas no TCA sofrem uma drástica redução, uma vez que o acetil-CoA passa a ser consumido para produção de P(3HB) e a reação q_6 é inibida pela elevação da concentração de NADPH.

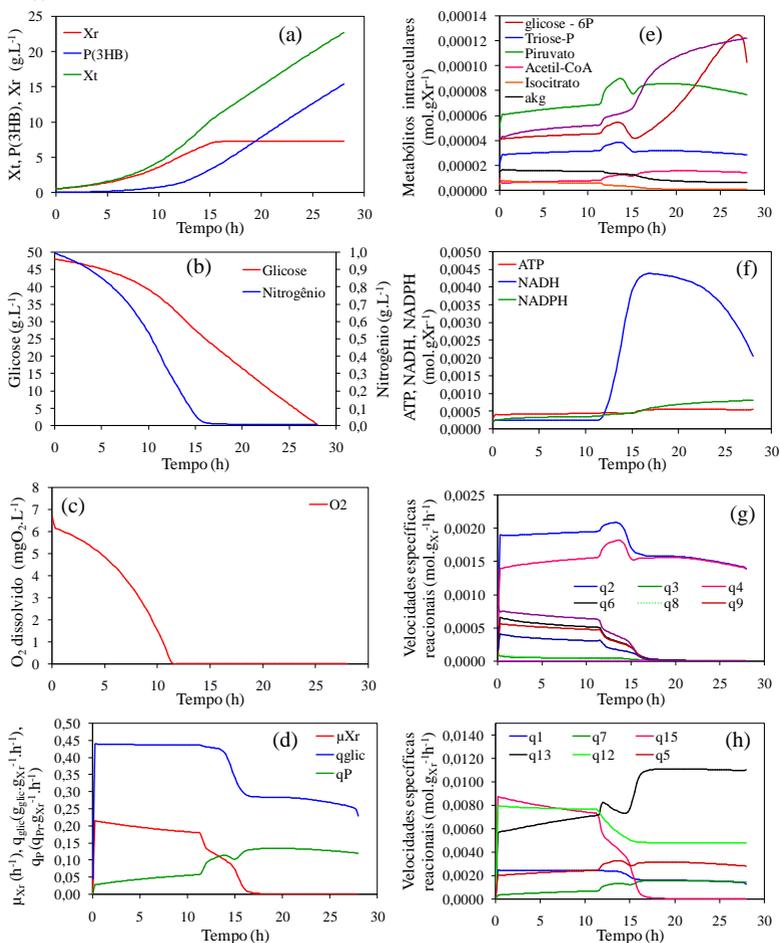
No caso da dupla limitação (O_2 e N), pelas Figuras 4.45 (a) e (b) verifica-se que 7 e 15,5 $g.L^{-1}$ de Xr e P(3HB) foram produzidos, enquanto 1 e 47 $g.L^{-1}$ de nitrogênio e de glicose foram consumidos, respectivamente. Por estes resultados, obtém-se $Y_{Xr/G}$ de 0,47 $g_{Xr}.g_G^{-1}$ e $Y_{Xr/N}$ de 7 $g_{Xr}.g_N^{-1}$. O tempo de cultivo foi maior do que no caso da exaustão de nitrogênio, por isso os valores de P(3HB), Xr e consumo de glicose foram superiores. Porém, para o mesmo tempo de cultivo (24 h) os valores de Xr e P(3HB) foram pouco inferiores (7 e 11,75 $g.L^{-1}$, respectivamente), quando comparados à exaustão de nitrogênio. Também foi possível calcular $Y_{Xr/G}$ de 0,36 e 0,19 $g_{Xr}.g_G^{-1}$ para a fase de crescimento não limitada e limitada em oxigênio, respectivamente. O $Y_{Pr/G}$ apresentou valores de 0,09, 0,29 e 0,46 $g_{Pr}.g_G^{-1}$, para as fases de crescimento não limitado, fase de crescimento/produção limitado em oxigênio e fase de produção com limitação em oxigênio e exaustão de nitrogênio, respectivamente.

Os valores de fator de conversão encontrados para a fase de crescimento não limitado e produção em dupla limitação estão de acordo com valores reportados na literatura, e obtidos para os cultivos em modo batelada sequencial com reciclo externo de células (Tabela 4.2). Na fase de limitação em O_2 , os valores obtidos condizem com os valores reportados por Gaudin (1998).

Nesta simulação, a limitação em oxigênio ocorreu com aproximadamente 12 horas (Figura 4.45 (c)) e, a partir deste momento, verifica-se um decréscimo do μ_{Xr} , com consecutivo aumento de q_p , o q_{glic} praticamente não é afetado até este momento (Figura 4.45 (d)). As concentrações intracelulares de Piruvato, glicose-6P, triose-P e acetil-CoA se elevam, e posteriormente decaem (ocorre um rebalço da distribuição dos fluxos) (Figura 4.45 (e)). Em contrapartida, a concentração de NADH sofre uma drástica elevação, uma vez que o mesmo não é propriamente convertido em ATP pela fosforilação oxidativa, verificada pela redução da velocidade de q_{12} (Figuras 4.45 (f) e (h)).

Figura 4.45: Resultados cinéticos obtidos pela simulação de um processo em batelada para produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose, com

limitação em oxigênio e exaustão de nitrogênio na fase de produção: (a) Xt, P(3HB) e Xr (g.L⁻¹); (b) glicose e nitrogênio (g.L⁻¹); (c) oxigênio dissolvido (mgO₂.L⁻¹); (d) velocidade específica de crescimento (μ_{Xr} (h⁻¹)), velocidade específica de produção de P(3HB) (q_p (g_P.g_{Xr}⁻¹.h⁻¹) e velocidade específica de consumo de glicose (q_{glic} (g_{glic}.g_{Xr}⁻¹.h⁻¹)); (e) concentração dos metabólitos intracelulares (mol.g_{Xr}⁻¹); (f) concentração intracelular de ATP, NADH e NADPH (mol.g_{Xr}⁻¹); (g) e (h) velocidades específicas reacionais (q (mol.g_{Xr}⁻¹.h⁻¹)).



No momento da limitação em nitrogênio, o comportamento das concentrações e das reações é similar ao da simulação em exaustão de

nitrogênio, porém o NADH continua em concentrações elevadas, já que a limitação em oxigênio foi mantida.

Nesta situação, a velocidade máxima alcançada pelo q_P é inferior ao caso de limitação apenas em nitrogênio. A literatura reporta que q_P é menor (da ordem de $0,08 \text{ g}_{Pr} \cdot \text{g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) quando a produção de P(3HB) é conduzida em limitação de O_2 por *C. necator* (GAUDIN, 1998).

Vale ressaltar que os resultados referentes às concentrações intracelulares dos metabólitos é função das restrições impostas ao modelo. Uma vez que estas concentrações não foram medidas experimentalmente, não é possível afirmar que este é o comportamento real. A partir dos resultados das duas simulações realizadas, é possível afirmar que o modelo fenomenológico proposto fornece valores coerentes para as variáveis. Para confirmar que o modelo é capaz de representar resultados experimentais e poder ser, então, utilizado como um modelo preditivo realizou-se a validação do modelo.

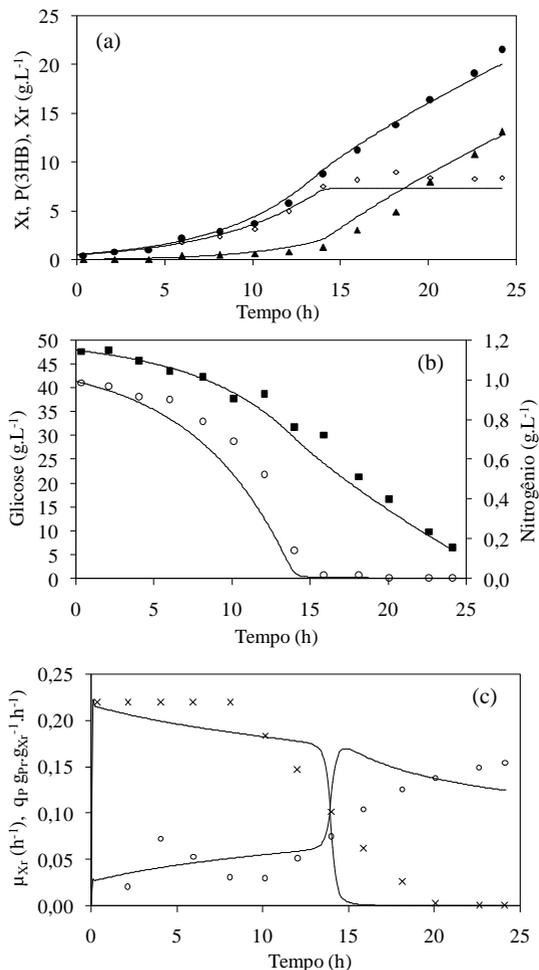
4.2.5 Validação do modelo proposto

Com o objetivo de validar o modelo fenomenológico proposto, duas predições de cultivo foram realizadas. A primeira predição considerou as condições de cultivo em batelada apresentadas no item 4.2.2. A segunda predição foi realizada a fim de reproduzir os resultados experimentais do cultivo batelada sequencial com reciclo externo de células (descrito no item 4.1.1.1).

A predição do modelo e a comparação com os dados experimentais do cultivo em batelada são apresentadas na Figura 4.46. Observa-se que o modelo foi capaz de prever o comportamento deste sistema. O coeficiente de correlação entre os dados preditos pelo modelo e os dados experimentais foram iguais a 0,998, 0,989, 0,992, 0,991, 0,985, para as concentrações de X_t , P(3HB), X_r , glicose e nitrogênio, respectivamente.

Durante a fase de crescimento, o modelo sobrestimou os dados de P(3HB), a limitação de nitrogênio ocorreu aproximadamente duas horas antes do momento observado pelos resultados experimentais e a concentração final da biomassa (X_r) foi subestimada (Figuras 4.46 (a) e (b)). No início da fase de produção, a concentração de P(3HB) continuou a ser sobrestimada, porém os valores preditos foram se aproximando dos valores experimentais ao longo da fase de produção e, ao final, obteve-se praticamente a mesma porcentagem de P(3HB) (61 % e 64 %, experimental e predito, respectivamente).

Figura 4.46: Resultados obtidos pela predição do modelo fenomenológico comparados aos dados experimentais para um processo em modo batelada para produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose, com exaustão de nitrogênio na fase de produção: (a) X_t (●), P(3HB) (▲) e X_r (◇) (g.L^{-1}); (b) glicose (■) e nitrogênio (○) (g.L^{-1}); (c) velocidade específica de crescimento (μ_{X_r} (x) (h^{-1})), velocidade específica de produção de P(3HB) (q_P (○) ($\text{g}_P \cdot \text{g}_{X_r}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)). As linhas contínuas representam a predição do modelo.



A velocidade específica de crescimento celular (μ_{X_r}) predita foi inferior à real, e decresceu de forma drástica no momento da limitação em nitrogênio, enquanto a real apresentou uma diminuição mais suave.

Os valores de μ_{Xr} alcançaram valores próximos a zero em 15 h, pela predição do modelo, e experimentalmente estes valores foram alcançados a partir de 20 h.

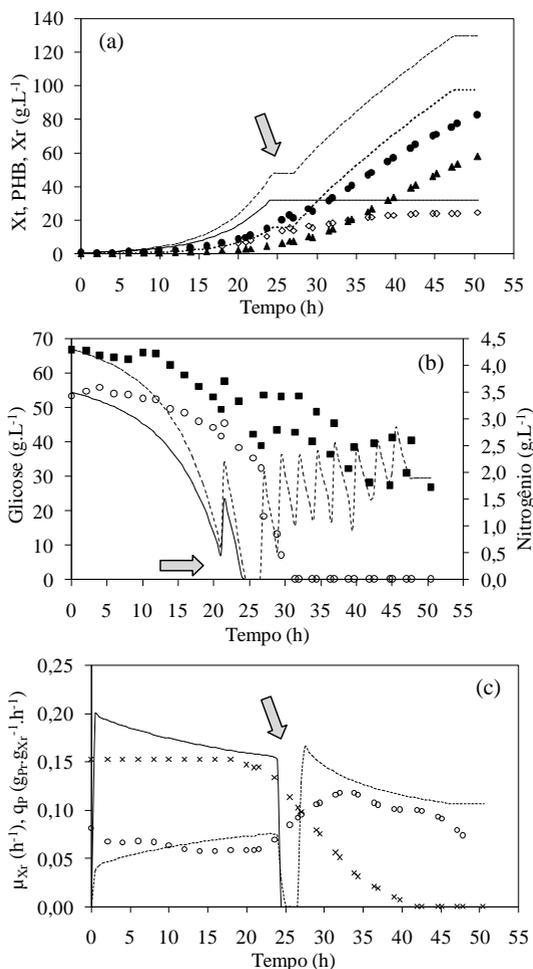
O q_p predito apresentou comportamento condizente com o comportamento experimental na fase de crescimento. As oscilações presentes nos dados experimentais ocorreram devido ao fato de que as concentrações de X_r e $P(3HB)$ são baixas neste período, e um pequeno erro experimental apresenta maior influência nos cálculos. Assim como ocorre no decréscimo de μ_{Xr} , o q_p predito aumenta rapidamente no momento da limitação em nitrogênio, enquanto que os dados experimentais mostram um aumento mais suave para esta curva. Entretanto, os valores de μ_{Xrmax} e q_{pmax} preditos foram próximos aos experimentais.

Apesar das pequenas divergências entre os dados preditos e experimentais, é possível afirmar que o modelo fenomenológico, que leva em conta as equações descritas no item 4.2.3, representa bem os dados experimentais para o sistema em batelada.

Com o objetivo de verificar a predição do modelo em um sistema mais complexo, no qual as variáveis de processo são menos estáveis, quando comparadas ao sistema batelada, foi realizada a predição de um sistema em batelada sequencial com reciclo externo de células com as condições descritas no item 4.1.1.1 (Figura 4.47)

Ao avaliar os dados apresentados na Figura 4.47, é possível observar que, diferentemente do sistema batelada, o modelo não foi capaz de prever os dados experimentais. O μ_{Xr} predito foi superior ao experimental durante toda a fase de crescimento, o que provocou um consumo de glicose e nitrogênio, com consequente produção de X_r e $P(3HB)$, mais elevado. Em aproximadamente 24 h de cultivo, houve uma limitação de glicose no meio, que levou a um platô de produção de $P(3HB)$ (flecha indicativa na Figura 4.47). Neste momento, o nitrogênio já estava exaurido e, portanto, este comportamento não foi observado na curva de produção de X_r . O platô ocorre, pois, a reação de degradação do $P(3HB)$ não foi incluída no modelo. Posteriormente, em aproximadamente 27 horas, um pulso de glicose é efetuado, e a produção de $P(3HB)$ é retomada e ocorre até 50 horas em velocidade elevada. As mesmas quedas e elevações de μ_{Xr} e q_p observadas para o cultivo em batelada, no momento da limitação em nitrogênio, são observadas nesta simulação. Além disso, tanto X_r quanto $P(3HB)$ foram sobrestimados durante todo o cultivo.

Figura 4.47: Resultados obtidos pela predição do modelo fenomenológico e experimentalmente para um processo em modo batelada sequencial com reciclo externo de células para produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose, com exaustão de nitrogênio na fase de produção: (a) X_t (●; ---), P(3HB) (▲; ...) e X_r (◇; —) (g.L⁻¹); (b) glicose (■; ---) e nitrogênio (○; —) (g.L⁻¹); (c) velocidade específica de crescimento (μ_{X_r} (x; —) (h⁻¹)), velocidade específica de produção de P(3HB) (q_P (○; ---) (g_P·g_{X_r}⁻¹·h⁻¹). Obs: o primeiro símbolo representa os dados experimentais e o segundo, a predição do modelo.



Estes resultados mostram que, apesar do modelo proposto ser capaz de prever o comportamento de *C. necator*, tanto para a limitação em nitrogênio quanto em oxigênio, e simular um processo em modo

batelada, quando um sistema mais complexo, com possível inibição pela concentração inicial de substrato, foi simulado, o modelo não previu com precisão os resultados experimentais. Assim, novas restrições devem ser incorporadas ao modelo para que o mesmo seja mais eficiente na predição de processos dinâmicos.

4.3 INCORPORAÇÃO DE RESTRIÇÕES AO MODELO FENOMENOLÓGICO E POSTERIOR VALIDAÇÃO

Para melhorar a predição do modelo para as condições dinâmicas do sistema batelada sequencial com reciclo externo de células, novas restrições foram adicionadas. Este item irá apresentar as novas restrições impostas ao modelo, que posteriormente foi validado para diferentes situações experimentais.

Ao comparar as condições experimentais dos cultivos em modo batelada e modo batelada sequencial com reciclo externo de células, percebe-se que, além da dinâmica do processo, existe uma diferença considerável entre as concentrações iniciais de glicose e nitrogênio. Para o cultivo em modo batelada, concentrações iniciais de 48 e 1 g.L⁻¹, e para o cultivo em modo batelada sequencial com reciclo externo de células de 67 e 3,5 g.L⁻¹, para glicose e nitrogênio foram fornecidas ao microrganismo, respectivamente. Observou-se também que as velocidades específicas máximas de crescimento foram diferentes para os dois cultivos, 0,22 e 0,15 h⁻¹, para o cultivo batelada e batelada sequencial com reciclo externo de células, respectivamente.

Estes resultados levam a crer que existe uma inibição do crescimento celular pela concentração inicial de substrato (glicose e nitrogênio) no cultivo com reciclo de células. Khanna e Srivastava (2005b) verificaram inibição do crescimento de *C. necator* em concentrações de frutose, nitrogênio e fósforo superiores a 40, 0,57 e 1,5 g.L⁻¹, respectivamente. A concentração inicial de fósforo no cultivo com reciclo externo de células foi de 1 g.L⁻¹, logo este nutriente não parece exercer efeitos inibidores no sistema, conforme os resultados reportados pelos autores. Belfares et al. (1995) também estudaram a inibição do crescimento de *C. necator* pelas concentrações iniciais de substrato, observando que concentrações de nitrogênio superiores a 2,5 g.L⁻¹ foram inibidoras, e que 70 g.L⁻¹ de glicose causou uma redução de 20 % no valor de $\mu_{X_{rmax}}$.

Uma vez que o modelo fenomenológico não considera nenhuma inibição do crescimento celular pelos substratos, o mesmo não é capaz de prever condições nas quais elevadas concentrações de glicose e

nitrogênio levem à redução de μ_{Xr} , como ocorre no cultivo com reciclo externo de células. Spoljaric et al. (2013) se depararam com a mesma situação ao validarem o modelo desenvolvido, em que o mesmo não foi capaz de simular com precisão cultivos conduzidos em concentração inicial de glicerol superior a 26 g.L^{-1} . Assim os autores definiram que o modelo poderia ser utilizado como preditivo apenas em concentrações de glicerol inferiores a esta.

Com o objetivo de não impor este tipo de limitação ao modelo fenomenológico desenvolvido no presente trabalho, propôs-se a inclusão de termos de inibição por glicose e nitrogênio na reação q15 (referente ao crescimento celular). Para obter estas equações, experimentos em frascos agitados foram realizados, a fim de avaliar como diferentes concentrações iniciais de glicose e nitrogênio influenciam a velocidade específica de crescimento celular.

4.3.1 Metodologia utilizada para incorporação de restrições ao modelo e posterior validação

4.3.1.1 Cultivos em *shaker* para o estudo de inibição

Os cultivos realizados em frascos agitados (*shaker*) visaram avaliar as possíveis inibições do crescimento de *C. necator* pela concentração inicial dos substratos glicose e nitrogênio (adicionado na forma de ureia).

Para avaliar a influência da concentração inicial de glicose no crescimento de *C. necator*, oito concentrações iniciais deste substrato foram avaliadas: 20, 30, 40, 50, 60, 65, 70 e 80 g.L^{-1} . Para estes oito cultivos, a concentração de todos os demais nutrientes foi idêntica a do MM1 (descrito no item 3.1).

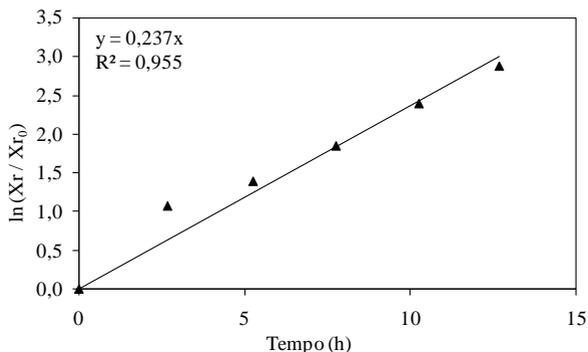
Para avaliar a influência da concentração de nitrogênio, sete concentrações iniciais deste substrato foram avaliadas: 1, 2, 3, 4, 4,5, 5 e $6,5 \text{ g.N.L}^{-1}$. Para estes sete cultivos, a concentração de todos os demais nutrientes foi idêntica a do MM1 (descrito no item 3.1).

Os cultivos foram conduzidos em frascos erlenmeyer aletados de 1000 mL, contendo 300 mL do meio de cultivo final, incubados a $35 \text{ }^\circ\text{C}$, sob agitação orbital de 150 rpm, durante 24 horas. O pH foi mantido em 7,0, com adição de soluções de NaOH 100 g.L^{-1} ou HCl 274 mL.L^{-1} ao longo dos cultivos, de forma asséptica. O inóculo, vindo do segundo pré-cultivo, representou 10 % do volume final (30 mL).

Para os cultivos realizados em frascos agitados (*shaker*), em que se estudou a possível inibição do crescimento celular pelas

concentrações iniciais de glicose e nitrogênio (na forma de ureia), a velocidade específica inicial de crescimento ($\mu_{X_{ri}}$) foi calculada a partir dos dados mássicos de biomassa residual durante as 12 primeiras horas de cultivo, a partir da Equação 3.12, em que o coeficiente angular da reta gerada a partir da relação entre $\ln(X_r/X_{r0})$ e t , durante as primeiras 12 horas, fornece o valor de $\mu_{X_{ri}}$ (Figura 4.48).

Figura 4.48: Exemplo para obtenção da velocidade específica de crescimento celular através do coeficiente angular da relação entre $\ln(X_r/X_{r0})$ e o tempo (t), sendo $\mu_{X_{ri}} = 0,237 \text{ h}^{-1}$.



4.3.1.2 Cultivos para validação do modelo com a incorporação das inibições

4.3.1.2.1 Cultivo em modo batelada alimentada

O cultivo em modo batelada alimentada (neste trabalho considerou-se batelada alimentada o sistema no qual soluções concentradas de nutrientes foram alimentadas ao biorreator, sem a remoção parcial do meio de cultivo do biorreator de forma prévia) foi realizado em biorreator de 5 L (BIOFLO 110, New Brunswick Scientific CO, New Jersey, USA), com volume inicial de 3,7 L.

A composição do meio de cultivo foi idêntica à composição do MM1 (descrito no item 3.1), com exceção da glicose, do KH_2PO_4 e da ureia, que tiveram concentração inicial de $50 \text{ g}_G \cdot \text{L}^{-1}$, $5 \text{ g}_L \cdot \text{L}^{-1}$ (equivalente a $1 \text{ g}_P \cdot \text{L}^{-1}$) e $4,3 \text{ g}_L \cdot \text{L}^{-1}$ (equivalente a $2 \text{ g}_N \cdot \text{L}^{-1}$), respectivamente. O biorreator, contendo o meio de cultivo (com exceção da ureia, da glicose e do KH_2PO_4), foi autoclavado durante 20 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$. O inóculo representou 10 % do volume final (370 mL). As soluções concentradas de glicose, KH_2PO_4 e ureia, adicionadas de forma estéril no início do

experimento, e posteriormente durante os pulsos, apresentaram concentração de $700 \text{ g}_G \cdot \text{L}^{-1}$, $27 \text{ g}_P \cdot \text{L}^{-1}$ e $200 \text{ g}_N \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente.

O objetivo do cultivo foi alcançar alta densidade celular a partir de solução concentrada da fonte de carbono. Quando a concentração celular (estimada por densidade óptica a 600 nm (DO_{600})) atingiu $10 \cdot \text{L}^{-1}$, as concentrações de glicose e nitrogênio no meio de cultivo estavam em torno de 30 e $0,75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. Estes valores foram estimados a partir dos fatores de conversão de glicose ($Y_{Xr/G} = 0,5 \text{ g}_{Xr}/\text{g}_G$ (ROELS, 1983)) e nitrogênio ($Y_{Xr/N} = 8 \text{ g}_{Xr}/\text{g}_N$ (IENCZAK, 2011)) em X_r . Neste momento um pulso de glicose e ureia foi realizado de forma que a concentração de glicose voltasse a $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e a concentração de nitrogênio aumentasse em $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. A mesma quantidade de sais e KH_2PO_4 adicionada no início do cultivo também foi fornecida na forma de pulso, para evitar a limitação destes nutrientes. Quando a concentração de X_r estava próxima a $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, um novo pulso de glicose e nitrogênio foi realizado, de forma a retomar a concentração de glicose de $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e elevar a concentração de nitrogênio em $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Após este momento, apenas pulsos de glicose foram realizados (retomada da concentração de $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), a fim de promover a limitação de nitrogênio e iniciar a fase de produção. Os pulsos foram realizados sempre que a concentração de glicose no meio (estimada pela DO_{600} e $Y_{Xr/G}$) atingiu em torno de $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, para garantir que este nutriente estaria em excesso durante toda a fase de produção. No total, $3,5 \text{ g}_N \cdot \text{L}^{-1}$ foram adicionados ao meio, o que levaria a uma concentração de X_r de $28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($Y_{Xr/N} = 8 \text{ g}_{Xr}/\text{g}_N$).

Durante o cultivo, a temperatura foi mantida em $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e o pH ajustado a 7,0 com soluções de NaOH $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ou HCl $274 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$. As condições iniciais de agitação e aeração foram de 450 rpm e 0,1 vvm, respectivamente, sendo aumentadas gradualmente de forma a se manter a concentração de oxigênio dissolvido superior a 30 %, em relação à saturação com ar atmosférico. Polipropilenoglicol foi utilizado como antiespumante e adicionado quando necessário.

4.3.1.2.2 Cultivo em batelada sequencial com reciclo externo de células e alimentação em nitrogênio

O cultivo batelada sequencial com reciclo externo de células e alimentação em nitrogênio seguiu procedimento similar ao do item 4.1.1.2. A composição do meio em sais foi a mesma descrita no MM1

(item 3.1), e as concentrações iniciais de glicose, ureia e KH_2PO_4 foram 50 g.L^{-1} , $4,3 \text{ g.L}^{-1}$ (equivalente a $2 \text{ g}_\text{N}.\text{L}^{-1}$) e 5 g.L^{-1} (equivalente a $1 \text{ g}_\text{P}.\text{L}^{-1}$). Neste experimento, apenas um frasco de alimentação foi utilizado na etapa do reciclo (Frasco 2 – Tabela 4.1). Os pulsos de nitrogênio na fase de crescimento foram realizados separadamente, a partir de uma solução concentrada de nitrogênio ($200 \text{ g}_\text{N}.\text{L}^{-1}$).

Inicialmente, as células cresceram em modo descontínuo até a obtenção de aproximadamente $10 \text{ g}_{\text{Xr}}.\text{L}^{-1}$, baseado na estimativa da DO_{600} . Após este período inicial de crescimento celular, foram iniciadas as retiradas de meio com o reciclo de células e as alimentações. Na fase de crescimento, houve dois cortes de 1 L de meio, sendo posteriormente efetuada a alimentação de 0,5 L e 1,5 L da solução de alimentação (Frasco 2) no primeiro e segundo corte, respectivamente. Imediatamente após a alimentação do meio, realizou-se o pulso da solução de nitrogênio concentrada. No primeiro corte elevou-se a concentração de nitrogênio em 1 g.L^{-1} e no segundo corte em $0,5 \text{ g.L}^{-1}$. Até ocorrer a limitação do nitrogênio no meio mais um corte foi realizado, sendo que 1 L de meio foi retirado e 1,5 L da solução do Frasco 2 foi alimentada ao biorreator, de forma a repor o volume retirado devido às amostragens e garantir a elevada concentração de carbono no início da fase de produção. Nos demais cortes realizados ao longo do cultivo, 1 L de meio de cultivo foi retirado e 1 L de solução do Frasco 2 foi alimentado ao biorreator. Vale ressaltar que neste cultivo a concentração de glicose não foi superior a 50 g.L^{-1} em nenhum momento.

No início da fase de produção, iniciou-se a alimentação limitante de nitrogênio, conforme descrito no item 4.1.1.2.

4.3.1.3 Metodologia para modelagem da inibição por substrato

Os modelos propostos por Andrews (1968) (Equação 4.21) e Yang e Humphrey (1975) (Equação 4.22) foram ajustados aos dados de μ_{Xri} obtidos para as concentrações de glicose e nitrogênio avaliadas, ou seja, plotou-se um gráfico de μ_{Xri} versus concentração de glicose, e outro para a concentração de nitrogênio, e as equações 4.21 e 4.22 foram ajustadas aos dados experimentais. O *software* Matlab[®] 2011b foi utilizado para realizar os ajustes.

$$\mu_{\text{Xri}} = \mu_{\text{Xrmax}} \frac{1}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_i}} \quad (4.21)$$

$$\mu_{X_{ri}} = \mu_{X_{rmax}} \frac{1}{1 + K_s/S + (S/K_i)^n} \quad (4.22)$$

Sendo:

K_s = constante de saturação (g.L^{-1} ou mol.L^{-1});

K_i = constante de inibição pelo substrato (g.L^{-1} ou mol.L^{-1});

S = concentração de substrato (g.L^{-1} ou mol.L^{-1}).

K_s e K_i se referem às concentrações de substrato que reduzem a velocidade específica máxima à metade de seu valor ($\mu_{X_r} = \mu_{X_{rmax}}/2$). A equação 4.22 se reduz a equação 4.21 quando n for igual a 1. O valor de $\mu_{X_{rmax}}$ foi fixado em $0,25 \text{ h}^{-1}$ para realizar os ajustes.

A análise estatística dos ajustes das equações aos dados experimentais de $\mu_{X_{ri}}$ versus concentração dos substratos foi realizada com a finalidade de avaliar a qualidade dos ajustes. Os seguintes índices estatísticos foram utilizados para avaliar os ajustes: erro médio quadrático (MSE), fator BIAS e fator de exatidão (FE).

A Equação (4.23) descreve o cálculo do MSE, sendo que quanto menores os valores obtidos para MSE, melhor é o ajuste do modelo aos dados experimentais.

$$\text{MSE} = \frac{\sum (\text{valor}_{\text{observado}} - \text{valor}_{\text{predito}})^2}{n - p} \quad (4.23)$$

Sendo:

n : número de pontos experimentais;

p : número de parâmetros do modelo.

O fator bias representa a diferença média entre os valores observados e preditos e foi calculado através da Equação (4.24):

$$\text{BIAS} = 10^{\left(\frac{\sum \log \left(\frac{\text{valor}_{\text{observado}}}{\text{valor}_{\text{predito}}} \right)}{n} \right)} \quad (4.24)$$

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

O fator de exatidão (FE), representado pela Equação (4.25) é uma medida da diferença média absoluta entre os valores preditos e observados.

$$FE = 10 \left(\frac{\sum \left| \log \left(\frac{\text{Valor}_{\text{predito}}}{\text{Valor}_{\text{observado}}} \right) \right|}{n} \right) \quad (4.25)$$

Conforme aumenta o valor deste fator, o modelo é menos exato na média. No cálculo do fator BIAS obtém-se uma média dos valores, em que os sinais opostos, tendem a se cancelar, já no cálculo do fator de exatidão, por se tratar de valores absolutos, isto não acontece e seu resultado sempre será maior que 1, sendo que quanto maior este valor, menor a exatidão da estimativa da média.

Além do cálculo destes três índices estatísticos, foi realizada a análise de resíduos, com auxílio do *software Microsoft Excel 2007*.

4.3.2 Resultado da incorporação de restrições ao modelo fenomenológico e posterior validação

4.3.2.1 Definição das equações de restrição

A Figura 4.49 apresenta o comportamento de $\mu_{X_{ri}}$ para diferentes concentrações iniciais de glicose, e o ajuste da Equação de Yang e Humphrey (Equação 3.22) aos dados experimentais. No *software Matlab*, a partir dos dados experimentais, ao impor $\mu_{X_{rmax}}$ de $0,25 \text{ h}^{-1}$ (velocidade máxima considerada no modelo fenomenológico) e K_s de $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ (mesmo utilizado para a equação de ativação da reação q1 pela glicose), obteve-se K_i de 88 g.L^{-1} para valores de n de 3 e 4. Estes valores de n foram testados pois as Equações de Andrews e de Yang e Humphrey com n igual a 2 não se ajustaram aos dados experimentais, com as imposições de $\mu_{X_{rmax}}$ e K_s .

Os índices estatísticos do ajuste do modelo de Yang e Humphrey, com n de 3 e 4, aos dados experimentais de velocidade específica inicial de crescimento ($\mu_{X_{ri}}$) versus a concentração inicial de glicose, estão apresentados na Tabela 4.7, e os resíduos para estes ajustes podem ser observados na Figura 4.50.

Figura 4.49: Relação entre a concentração inicial de glicose e a velocidade específica inicial de crescimento ($\mu_{X_{ri}}$) para *C. necator* (●); ajuste da equação de

Yang e Humphrey com n igual a 3 (—) e 4 (---), impondo $\mu_{X_{rmax}}$ de $0,25 \text{ h}^{-1}$ e K_s de $0,15 \text{ g.L}^{-1}$.

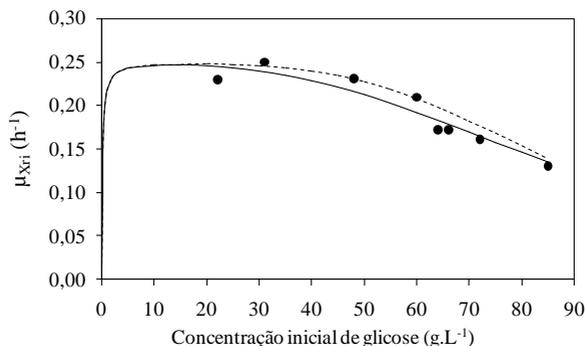


Tabela 4.7: Índices estatísticos obtidos para o ajuste da Equação de Yang e Humphrey, com n de 3 e 4, aos dados experimentais de $\mu_{X_{ri}}$ versus concentração inicial de glicose.

	R^2	MSE*	BIAS	FE*
Yang e Humphrey ($n = 3$)	0,977	$9,14 \times 10^{-5}$	0,989	1,04
Yang e Humphrey ($n = 4$)	0,981	$5,65 \times 10^{-4}$	1,036	1,05

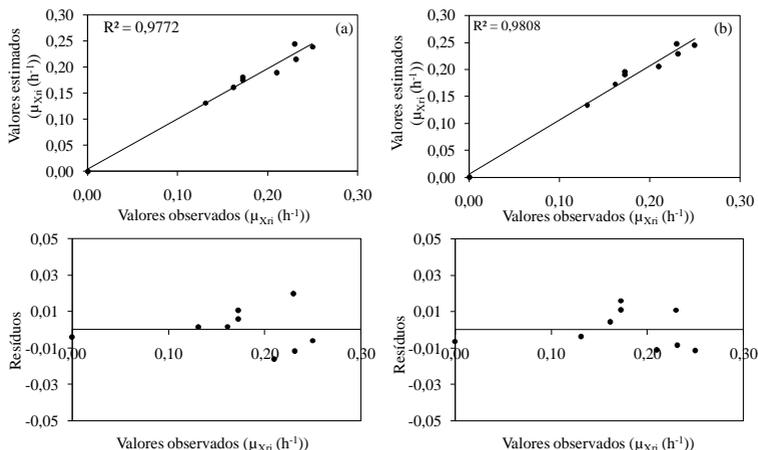
*MSE: Erro médio quadrático; FE: Fator de exatidão.

O resultado dos ajustes foi bastante similar para ambas as equações. O MSE foi inferior e BIAS apresentou valores mais próximos a 1 para n igual a 3, porém o R^2 e o FE foram superiores para n igual a 4. Mesmo através da distribuição dos resíduos foi difícil verificar diferença entre a qualidade dos ajustes, porém os dados da Figura 4.50 (b) ($n = 4$) parecem estar menos dispersos quando comparados aos da Figura 4.50 (a) ($n = 3$). Além disso, observando a Figura 4.49, é possível perceber que o ajuste com n igual a 4 alcança maiores valores para $\mu_{X_{ri}}$ nas menores concentrações de glicose (valores mais próximos aos experimentais), o que implica que a inibição pela concentração inicial deste substrato inicia em concentrações mais elevadas. A partir destes resultados, a equação de Yang e Humphrey com n igual a 4 foi escolhida para ser incorporada ao modelo como consideração da inibição pela concentração inicial de glicose.

Na Figura 4.49 percebe-se que em concentração inicial em torno de 70 g.L^{-1} , próxima à utilizada no cultivo com reciclo externo de células, a velocidade específica inicial de crescimento é igual a $0,16 \text{ h}^{-1}$,

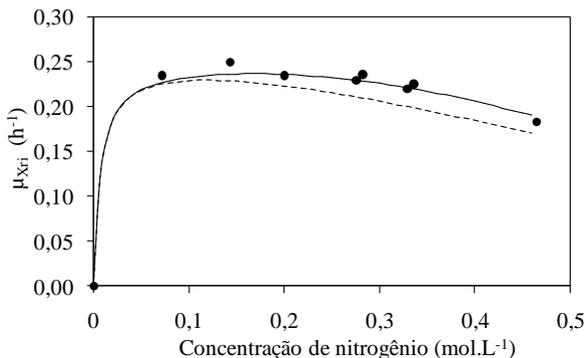
velocidade similar à obtida para o cultivo em modo batelada sequencial com reciclo externo de células. Já na concentração de glicose de 50 g.L^{-1} praticamente não é observada inibição do crescimento celular.

Figura 4.50: Correlação entre os dados preditos pelo modelo de Yang e Humphrey e os dados observados experimentalmente e gráfico de resíduos para o ajuste da Equação de Yang e Humphrey, com n de 3 (a) e 4 (b), aos dados experimentais de concentração inicial de glicose *versus* velocidade específica inicial de crescimento (μ_{Xri}) para a bactéria *C. necator*.



Para a concentração inicial de nitrogênio, os dados foram tratados em mol.L^{-1} , uma vez que a equação de inibição considerada na equação q15 para este substrato deve apresentar os parâmetros em base molar. A Figura 4.51 apresenta os resultados experimentais para a relação entre a concentração inicial de nitrogênio e μ_{Xri} , e os ajustes do modelo de Yang e Humphrey com n igual a 2 e 3. No *software* Matlab, os valores de μ_{Xri} de $0,25 \text{ h}^{-1}$ e K_s de $7 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrogênio) foram impostos, e o valor de $0,67 \text{ mol.L}^{-1}$ foi obtido para K_i . O modelo de Andrews não se ajustou aos dados experimentais com as imposições μ_{Xri} e K_s realizadas. As concentrações de nitrogênio avaliadas variaram entre 1 g.L^{-1} ($0,071 \text{ mol.L}^{-1}$) e $6,5 \text{ g.L}^{-1}$ ($0,46 \text{ mol.L}^{-1}$).

Figura 4.51: Relação entre a concentração inicial de nitrogênio e a velocidade específica inicial de crescimento ($\mu_{X_{ri}}$) para *C. necator* (●); ajuste da equação de Yang e Humphrey com n igual a 2 (---) e 3 (—), impondo $\mu_{X_{rmax}}$ de $0,25 \text{ h}^{-1}$ e K_s de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ($7 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$).



Os índices estatísticos do ajuste do modelo de Yang e Humphrey, com n de 2 e 3, aos dados de velocidade específica inicial de crescimento ($\mu_{X_{ri}}$) versus a concentração inicial de nitrogênio, estão apresentados na Tabela 4.8, e os resíduos para estes ajustes podem ser observados na Figura 4.52.

Tabela 4.8: Índices estatísticos obtidos para o ajuste da Equação de Yang e Humphrey, com n de 2 e 3, aos dados experimentais de $\mu_{X_{ri}}$ versus concentração inicial de nitrogênio.

	R ²	MSE*	BIAS	FE*
Yang e Humphrey (n = 2)	0,993	$3,73 \times 10^{-3}$	0,926	1,08
Yang e Humphrey (n = 3)	0,994	$1,37 \times 10^{-4}$	0,987	1,02

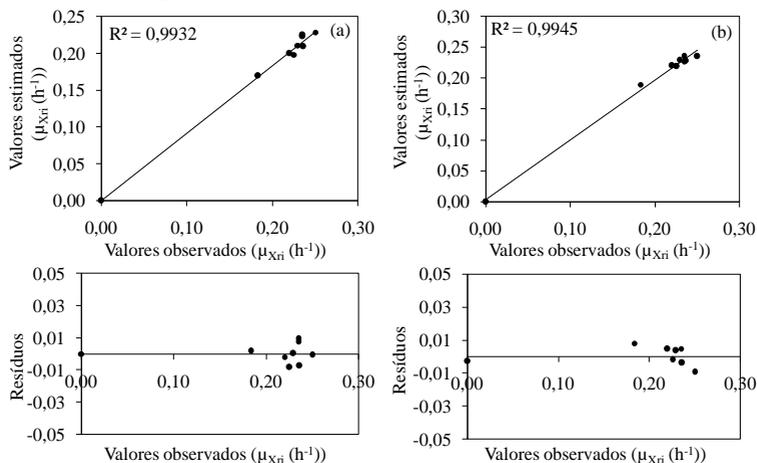
*MSE: Erro médio quadrático; FE: Fator de exatidão.

Os índices estatísticos mostram que o modelo de Yang e Humphrey que se ajustou melhor aos dados experimentais foi com n igual a 3 em todos os casos, com exceção do valor obtido para o FE, que foi superior em n igual a 2. A distribuição dos resíduos não apresentou grande diferença entre o ajuste dos dois modelos. A dispersão entre os dados experimentais é similar. A partir destes resultados, a equação de Yang e Humphrey com n igual a 3 foi escolhida para ser incorporada ao modelo como consideração da inibição pela concentração inicial de nitrogênio.

A concentração inicial de nitrogênio, dentro dos limites avaliados, apresentou menor inibição do crescimento celular, quando comparados aos dados de inibição pela concentração inicial de glicose. A concentração de $3,5 \text{ g.L}^{-1}$ ($0,25 \text{ mol.L}^{-1}$), utilizada no cultivo em modo batelada sequencial com reciclo externo de células praticamente não apresenta efeito inibidor.

A partir destes resultados é possível afirmar que a variável que leva à redução da velocidade específica máxima de crescimento de *C. necator* no cultivo com reciclo externo de células é a concentração inicial de glicose. Pela Figura 4.49, pode-se dizer que concentrações inferiores a 50 g.L^{-1} de glicose devem ser mantidas no meio de cultivo para evitar inibição da velocidade específica de crescimento celular.

Figura 4.52: Correlação entre os dados preditos modelo de Yang e Humphrey e os dados observados experimentalmente e gráfico de resíduos para o ajuste da Equação de Yang e Humphrey, com n de 2 (a) e 3 (b), aos dados experimentais de concentração inicial de nitrogênio *versus* velocidade específica inicial de crescimento ($\mu_{X_{ri}}$) para a bactéria *C. necator*.



As equações de Yang e Humphrey para inibição por glicose e nitrogênio foram adicionadas à reação q15, e desta forma, a inibição por ATP e a ativação por nitrogênio foram removidas. As demais reações (q) não foram modificadas, e a equação final para a reação q15 está representada na Equação 4.26.

$$q_{15} = q_{15\max} \cdot \frac{S^{p_{15S}}}{S^{p_{15S}} + k_{15S}^{p_{15S}}} \cdot \frac{O_2^{p_{15O_2}}}{O_2^{p_{15O_2}} + k_{15O_2}^{p_{15O_2}}} \cdot \left(1 - \frac{PHB}{k_p}\right) \quad (4.26)$$

$$\left(\frac{1}{1 + k_{15gluc}/Gluc + \left(\frac{Gluc}{k_{15gluc}}\right)^{n_{gluc}}} \right) \left(\frac{1}{1 + k_{15NH_3}/NH_3 + \left(\frac{NH_3}{k_{15NH_3}}\right)^{n_{NH_3}}} \right)$$

$$q_{15\max} = 0,25 \text{ h}^{-1} = 1,017 \times 10^{-2} \text{ mol.g}_{Xr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$p_{15O_2} = 3$	$k_{15O_2} = 1,65 \times 10^{-7}$	
$p_{15S} = 3$	$k_{15S} = 2 \times 10^{-4}$	
	$k_p = 0,90$	
$n_{gluc} = 4$	$K_{15gluc} = 0,15$	$K_{i15gluc} = 88$
$n_{NH_3} = 3$	$K_{15NH_3} = 7 \times 10^{-3}$	$K_{i15NH_3} = 0,67$

O modelo fenomenológico após a incorporação dos termos de inibição por glicose e nitrogênio na velocidade de crescimento celular foi, então, validado.

4.3.3 Validação do modelo fenomenológico para diferentes estratégias de cultivo

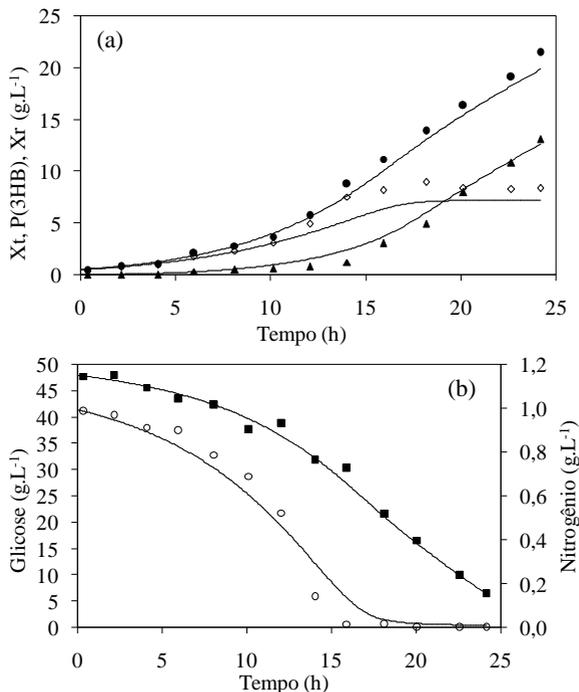
A validação do modelo foi feita a partir da predição de diferentes condições de cultivo. A primeira predição considerou as condições experimentais do cultivo batelada descrito no item 4.2.2 (Figura 4.53).

Os valores do coeficiente de correlação (R^2) entre os dados preditos pelo modelo e os dados experimentais do consumo de glicose e nitrogênio e produção de X_t , $P(3HB)$ e X_r foram de 0,996, 0,989, 0,999, 0,995 e 0,990, respectivamente. Estes valores mostram que o modelo foi capaz e prever com precisão os resultados experimentais. Diferentemente da predição realizada pelo modelo que não considera a inibição da velocidade de crescimento pela concentração de glicose e nitrogênio, os valores estimados de $P(3HB)$ foram sobrestimados apenas na fase de crescimento, posteriormente, durante a fase de produção, a predição do modelo está próxima aos valores obtidos experimentalmente (Figura 4.53 (a)).

O consumo de nitrogênio previsto foi similar ao experimental, porém a exaustão em nitrogênio foi predita com quase duas horas de atraso (Figura 4.53 (b)). Na simulação apresentada na Figura 4.46 (b), relativa ao modelo em que o termo de inibição não foi incluído, a exaustão de

nitrogênio ocorre de forma antecipada. Esta diferença é observada devido à alteração do valor de K_N entre os dois modelos.

Figura 4.53: Predição do modelo fenomenológico, que considera a inibição pelas concentrações de glicose e nitrogênio em μ_{Xr} , dos dados experimentais de um processo em modo batelada para produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose, com exaustão de nitrogênio na fase de produção: (a) X_t (●), P(3HB) (▲) e X_r (◇) (g.L^{-1}); (b) glicose (■) e nitrogênio (○) (g.L^{-1}). As linhas contínuas representam a predição do modelo fenomenológico.



A concentração de nitrogênio que desacelera o crescimento da biomassa (observado experimentalmente e reportado por Spoljaric et al. (2013)) é igual a $0,1 \text{ g.L}^{-1}$, porém quando este valor foi considerado na primeira modelagem proposta, o modelo não foi capaz de descrever o comportamento dos sistemas e, desta forma, o valor de K_N reportado por Aragão (1996) ($0,014 \text{ g.L}^{-1}$) havia sido considerado. Ao avaliar a inibição do crescimento celular pela concentração inicial de nitrogênio (item 4.3.1.1), e realizar o ajuste da equação de Yang e Humphrey aos dados experimentais, verificou-se que o valor de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ fornecia melhores resultados de ajuste, e então este último valor foi considerado.

Com esta alteração, a equação q_{15} é desacelerada pela baixa concentração de nitrogênio em níveis superiores deste nutriente, o que promove a diferença entre os dois momentos de exaustão de nitrogênio. Também é esta alteração que parece ser responsável por tornar o comportamento das reações, e conseqüentemente, das concentrações de metabolitos, mais suaves no momento da limitação em nitrogênio.

Estes resultados mostram que o modelo proposto é capaz de prever o comportamento de um sistema batelada para produção de P(3HB) por *C. necator*, a partir de glicose, com poucas divergências dos dados obtidos experimentalmente.

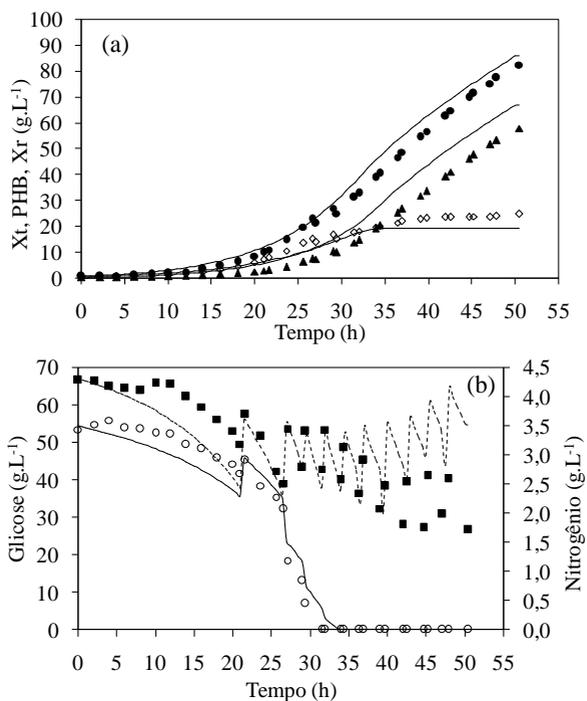
A predição de um cultivo em modo batelada sequencial com reciclo externo de células nas condições apresentadas no item 4.1.1.1 foi efetuada pelo modelo com as alterações de inibição já discutidas, e os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 4.54.

Pode-se perceber que os valores preditos pelo modelo apresentam comportamento próximo ao obtido experimentalmente. Os valores de R^2 para a predição em relação aos dados experimentais foram: 0,597, 0,988, 0,999, 0,998, 0,990 para glicose, nitrogênio, X_t , P(3HB) e X_r , respectivamente. Com exceção da predição da concentração de glicose, os valores de R^2 foram todos superiores a 0,98, o que mostra que o modelo foi capaz de prever com eficiência os valores para este sistema. Porém, avaliando-se as curvas dos dados experimentais e dos dados preditos, verifica-se que a concentração de P(3HB) foi ligeiramente sobrestimada ao longo de todo o cultivo, enquanto a concentração final de X_r final estimada foi inferior à concentração obtida experimentalmente. Os valores elevados de R^2 apenas mostram que a tendência das curvas foi bastante similar, ou seja, no caso do P(3HB) a sobrestimação foi proporcional ao longo de toda a curva, porém não informa mais detalhes sobre o ajuste. Como o modelo proposto possui muitas variáveis e parâmetros é difícil calcular outros índices estatísticos, como MSE, BIAS e FE.

Os resultados mostram que houve uma melhoria na predição em relação ao que foi apresentado no item 4.2.5 (Figura 4.47), relativo à predição do cultivo em modo sequencial com reciclo externo de células pelo modelo que não considera as inibições por glicose e nitrogênio na velocidade de crescimento celular, que sobrestimou a produção de X_r , P(3HB) e o consumo dos substratos, levando a resultados não condizentes com a realidade experimental. A sobrestimação da produção de P(3HB) e a subestimação da produção de X_r podem estar associadas ao termo de inibição do crescimento celular pela porcentagem de acúmulo de P(3HB) considerado no modelo proposto no presente

trabalho. Este termo pode estar provocando uma inibição do crescimento celular mais acentuada do que a verificada experimentalmente.

Figura 4.54: Resultados obtidos pela predição do modelo fenomenológico, considerando a inibição da velocidade de crescimento pelas concentrações de glicose e nitrogênio, e experimentalmente para um processo em modo batelada sequencial com reciclo externo de células para produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose, com exaustão de nitrogênio na fase de produção: (a) X_t (● ; —), P(3HB) (▲ ; —) e X_r (◇ ; —) (g.L^{-1}); (b) glicose (■ ; ---) e nitrogênio (○ ; —) (g.L^{-1}). Obs: o primeiro símbolo representa os dados experimentais e o segundo, a predição do modelo.



No caso da glicose, o valor de R^2 foi relativamente baixo. Nas primeiras 20 h, o modelo subestimou os valores de concentração, posteriormente, entre 20 e 35 h apresentou uma predição bastante próxima aos dados experimentais, e após 35 h a concentração de glicose foi sobrestimada. Coincidentemente, a partir de 35 h ocorre a exaustão do nitrogênio, e X_r para de ser produzido, entretanto ao verificar os

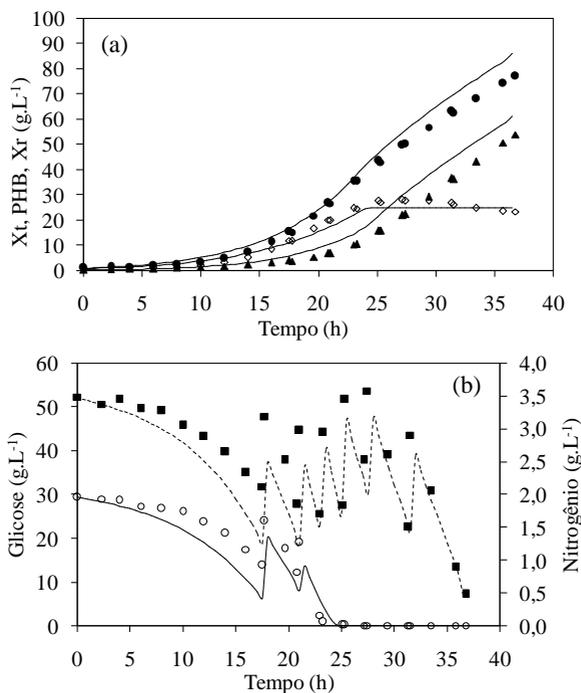
dados experimentais é possível observar que ocorre um pequeno aumento da concentração celular, mesmo após a exaustão do nitrogênio no meio. Como já foi comentado anteriormente, a concentração de proteínas na célula, assim como a composição elementar da biomassa, são diferentes na fase de crescimento e na fase de produção para *C. necator*, quando o cultivo é conduzido sob exaustão de um nutriente. Na fase de produção o teor de proteínas, e de nitrogênio na composição elementar, é inferior. Conforme Aragão (1996), quando a bactéria tem uma situação de estresse (exaustão de nitrogênio) ela muda sua composição elementar para ser capaz de continuar se reproduzindo. Efeito similar a este foi verificado por Grousseau (2012) em limitação de fósforo, na qual o teor de fósforo da composição elementar reduziu ao longo da fase de produção, porém como o fator de conversão de fósforo em X_r é mais elevado, o aumento da concentração celular verificado durante a exaustão de fósforo foi superior, quando comparada à exaustão de nitrogênio.

O modelo fenomenológico foi proposto considerando que a composição elementar da biomassa, e o teor de proteínas, não se alteram durante o cultivo, e foi considerada a composição elementar da fase de crescimento como constante. Possivelmente, se esta alteração de composição tivesse sido levada em conta, a predição da concentração de glicose durante a fase de produção seria mais próxima dos valores experimentais. A predição do consumo de nitrogênio apresentou algumas discrepâncias em relação aos dados experimentais, mas de forma geral, foi capaz de descrever seu comportamento (Figura 4.54 (b)).

A imposição da inibição do crescimento celular pelas concentrações de glicose e nitrogênio tornou o modelo capaz de prever tanto situações nas quais estes nutrientes não são inibidores, quanto situações nas quais ocorre inibição do crescimento por estes substratos, contornando o problema previamente verificado.

Uma terceira predição foi realizada para um cultivo em modo batelada alimentada sem o reciclo externo de células e em concentrações iniciais de glicose e nitrogênio que não estavam na faixa de inibição para *C. necator*. As condições que foram simuladas nesta etapa estão descritas no item 4.3.1.2.1. Vale ressaltar que os pulsos de glicose e nitrogênio foram realizados a partir de soluções concentradas. Os resultados preditos pelo modelo e obtidos experimentalmente são apresentados na Figura 4.55.

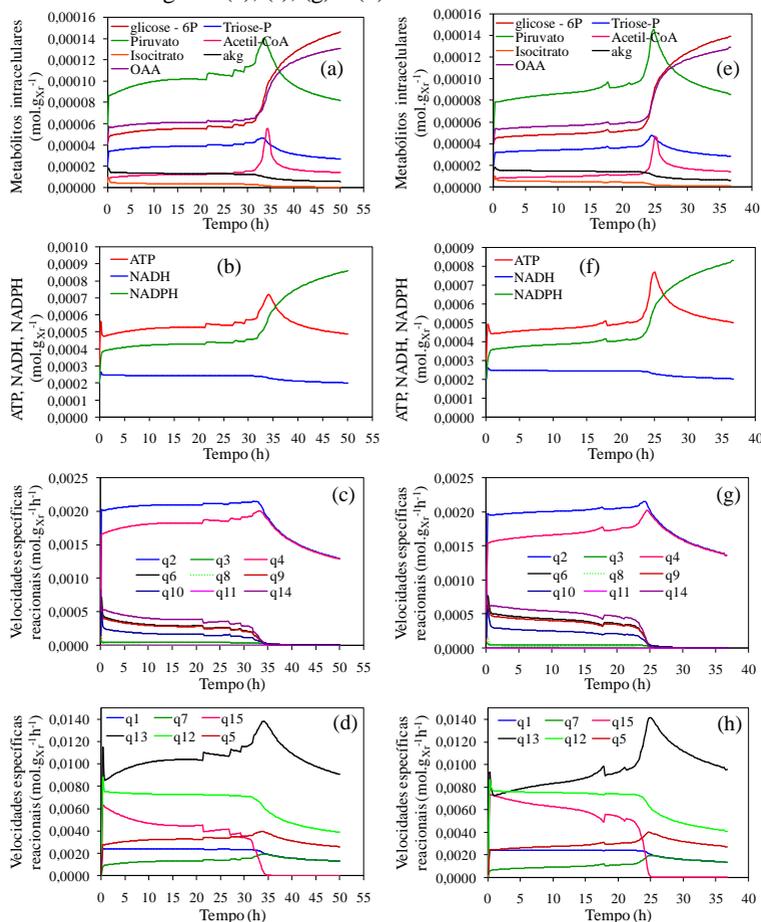
Figura 4.55: Resultados obtidos pela predição do modelo, considerando a inibição da velocidade de crescimento pelas concentrações de glicose e nitrogênio, e experimentalmente para um cultivo em modo batelada alimentada visando a produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose, com exaustão de nitrogênio na fase de produção: (a) X_t (● ; —), P(3HB) (▲ ; —) e X_r (◇ ; —) (g.L^{-1}); (b) glicose (■ ; ---) e nitrogênio (○ ; —) (g.L^{-1}). Obs: o primeiro símbolo representa os dados experimentais e o segundo, a predição do modelo.



Os valores de R^2 para a predição do modelo foram: 0,676, 0,925, 0,999, 0,997 e 0,990, para glicose, nitrogênio, X_t , P(3HB) e X_r , respectivamente. Mais uma vez, os valores de P(3HB) foram sobrestimados pelo modelo, porém nesta predição, a biomassa ficou próxima aos valores experimentais (Figura 4.55 (a)). A predição do consumo de glicose e nitrogênio apresentou comportamento similar ao experimental, porém a velocidade com que estes nutrientes foram consumidos foi superior na predição do modelo e, desta forma, as concentrações apresentaram valores inferiores aos experimentais ao longo de todo o cultivo (Figura 4.55 (b)).

A comparação da predição da evolução dos metabólitos intracelulares quando os cultivos são realizados em condições iniciais que inibem ou não o crescimento celular é apresentada na Figura 4.56.

Figura 4.56: Resultados obtidos pela predição dos cultivos realizados em condições iniciais que inibem ou não o crescimento celular visando a produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose, em exaustão de nitrogênio, a partir do modelo que considera a inibição de μ_{Xr} pelas concentrações iniciais de glicose e nitrogênio: (a) e (e) concentração dos metabólitos intracelulares (mol.g_{Xr}⁻¹); (b) e (f) concentração intracelular de ATP, NADH e NADPH (mol.g_{Xr}⁻¹); (c), (d), (g) e (h) velocidades específicas reacionais (q (mol.g_{Xr}⁻¹.h⁻¹)). As figuras (a), (b), (c) e (d) representam o cultivo com reciclo de células e as figuras (e), (f), (g) e (h) o cultivo batelada alimentada.



Os valores das concentrações dos metabólitos e das reações (q) ao longo dos cultivos em modo batelada sequencial com reciclo de células e condições iniciais que inibem o crescimento celular, e batelada alimentada sem reciclo de células e condições iniciais que não inibem o crescimento celular são apresentados (Figura 4.56). Comparando-se o comportamento nos dois cultivos, percebe-se que a evolução dos metabólitos ao longo dos cultivos é muito similar. Por exemplo, o acetil-CoA, em ambos os casos apresenta uma concentração constante até o momento da exaustão de nitrogênio, que logo após se eleva, e momentos depois volta a reduzir e se mantém novamente em valores praticamente constantes. Esta elevação no momento da exaustão de nitrogênio ocorre, pois, este metabólito deixa de ser consumido para o crescimento celular, e seu consumo para produção de P(3HB) apresenta uma demanda inferior ao da produção da biomassa. Assim, um reequilíbrio do sistema ocorre quando a reação q1 passa a ser inibida pela elevação das concentrações de NADPH e glicose-6P e, conseqüentemente, acetil-CoA passa a ser produzido em menores quantidades, porém ainda suficientes para manter uma elevada produção de P(3HB).

Outra observação interessante que pode ser feita a partir das Figuras 4.56 (c) e (g), é que após a exaustão da fonte de nitrogênio, com conseqüente interrupção do crescimento celular, as reações q6, q8, q9 e q10, que representam o ciclo TCA, alcançam valores próximos a zero, enquanto q2, referente a via de Entner-Dourdoroff, se mantém em velocidade elevada. A partir deste resultado pode-se inferir que em situação de exaustão de nitrogênio, com produção de P(3HB) a partir da glicose, o ciclo TCA não é necessário durante a fase de produção, já que os intermediários metabólicos necessários à produção de P(3HB) são gerados a partir da assimilação da glicose pela via de Entner-Dourdoroff.

Os valores de X_t , P(3HB) e X_r finais para o cultivo batelada alimentada foram: 314 g (77 g.L^{-1}), 220 g (54 g.L^{-1}) e 94 g (23 g.L^{-1}), respectivamente. E as produtividades global (Pr) (220 g_p , 36,75 h de cultivo e 4,07 L de meio) e de fase de produção (Prp) ($41,3 \text{ g}_p$ e 3,95 L de meio no início da fase de produção, 13,5 h de fase de produção) chegaram a valores de $1,47 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $3,23 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente. Os valores de produção mássica global e de fase de produção de P(3HB) foram iguais a $5,98 \text{ g.h}^{-1}$ e $13,23 \text{ g.h}^{-1}$, respectivamente. Ao comparar estes valores com os valores apresentados na Tabela 4.5 para o cultivo em modo batelada sequencial com reciclo externo de células e exaustão de nitrogênio durante a fase de produção, nota-se um aumento de 40 %

na produtividade volumétrica global do processo, já que o tempo de cultivo para o cultivo batelada alimentada foi aproximadamente 15 h inferior, devido às concentrações iniciais de substrato não inibidoras.

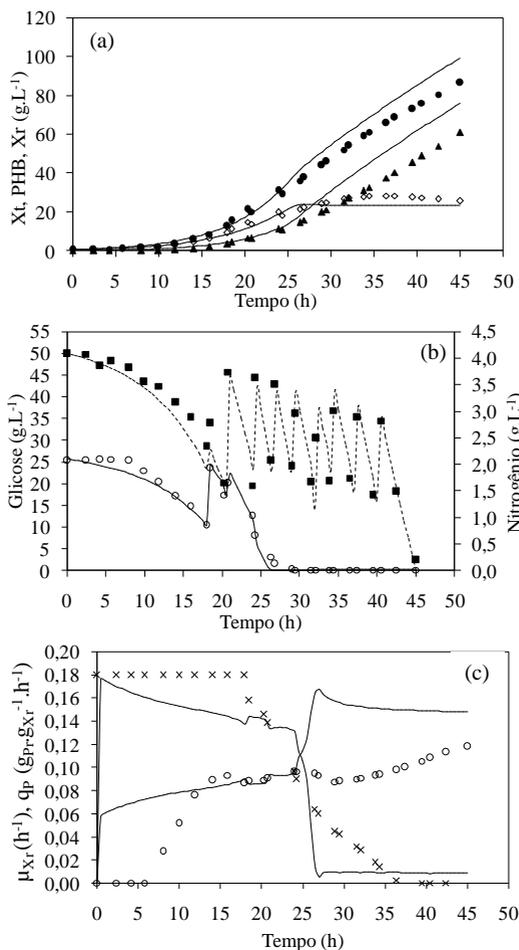
Os fatores de conversão de glicose em Xt ($Y_{Xt/G}$), Xr ($Y_{Xr/G}$) e P(3HB) ($Y_{Pr/G}$) e nitrogênio em Xr ($Y_{Xr/N}$) para este cultivo foram: 0,52 g_{Xt}/g_G , 0,48 g_{Xr}/g_G , 0,15 e 0,46 g_{Pr}/g_G (fase de crescimento e produção), e 8,5 g_{Xr}/g_N , respectivamente. Ao final da fase de crescimento, 29 % de P(3HB) havia sido produzido. Os fatores de conversão foram superiores aos verificados no cultivo com reciclo externo de células, o que mostra que a conversão da glicose em biomassa e em P(3HB) foi mais eficiente.

Os resultados obtidos neste cultivo mostram a importância de determinar as melhores condições de trabalho para um processo biológico. Pequenas alterações nas concentrações iniciais de substrato podem levar a um ganho considerável em termos de produtividade de processo e, conseqüentemente, na redução de preço do produto.

Uma vez que a única diferença entre os cultivos batelada sequencial com reciclo externo de células e batelada alimentada, além do pulso que envolve a recirculação celular pelas membranas de microfiltração, foi a menor concentração inicial de glicose e nitrogênio, um novo cultivo em modo batelada alimentada com reciclo externo de células foi realizado, incluindo as concentrações iniciais reduzidas de glicose e nitrogênio e alimentação limitante de nitrogênio durante a fase de produção, como descrito no item 4.3.1.2.2. A alimentação de nitrogênio foi introduzida, uma vez que os primeiros ensaios com reciclo externo de células mostraram que esta condição é favorável à obtenção de maiores concentrações finais de P(3HB) e conseqüente aumento de produtividade.

Os dados experimentais para este cultivo estão apresentados na Figura 4.57. As mesmas condições experimentais foram simuladas com o modelo fenomenológico, para verificar a predição do modelo com relação à alimentação de nitrogênio durante a fase de produção. Verificou-se a produção de 391 g ($86,3 \text{ g.L}^{-1}$), 275 g ($60,7 \text{ g.L}^{-1}$) e 116 g ($25,6 \text{ g.L}^{-1}$), de Xt, P(3HB) e Xr, o que resultou em produtividades global (275 g_P , 45 h de cultivo e 4,52 L de meio) e de fase de produção (Prp) (65 g_P e 4,14 L de meio no início da fase de produção, 18,2 h de fase de produção) iguais a 1,35 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e 2,48 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente. Os fatores de conversão de glicose em Xt ($Y_{Xt/G}$), Xr ($Y_{Xr/G}$) e P(3HB) ($Y_{Pr/G}$) e nitrogênio em Xr ($Y_{Xr/N}$) para a fase de crescimento e produção neste cultivo foram: 0,43 g_{Xt}/g_G , 0,27 e 0,042 g_{Xr}/g_G , 0,19 e 0,39 g_{Pr}/g_G , e 8,1 e 9,9 g_{Xr}/g_N , respectivamente.

Figura 4.57: Resultados obtidos pela predição do modelo, considerando a inibição de μ_{Xr} pelas concentrações de glicose e nitrogênio, e experimentalmente para um cultivo batelada sequencial com reciclo de células visando a produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose, com alimentação de nitrogênio na fase de produção: (a) X_t (● ; —), P(3HB) (▲ ; —) e X_r (◇ ; —) (g.L⁻¹); (b) glicose (■ ; ---) e nitrogênio (○ ; —) (g.L⁻¹); (c) velocidade específica de crescimento (μ_{Xr} (x ; —) (h⁻¹), velocidade específica de produção de P(3HB) (q_P (○ ; ---) (g_{Pr}.g_{Xr}⁻¹.h⁻¹). Obs: o primeiro símbolo representa os dados experimentais e o segundo, a predição do modelo.



Apesar dos resultados mássicos de P(3HB) terem sido superiores neste cultivo, quando comparados ao cultivo batelada alimentada sem

reciclo externo de células, a produtividade volumétrica global foi inferior. Este comportamento ocorre, pois, o volume final no presente cultivo foi aproximadamente 0,5 L superior, devido à adição da solução de nitrogênio durante a fase de produção (0,68 L de solução de nitrogênio foi adicionada ao biorreator). Se uma solução mais concentrada fosse utilizada, a variação de volume seria menor, e conseqüentemente, a produtividade volumétrica global seria maior. Entretanto, ao concentrar a solução de nitrogênio, torna-se mais difícil o controle da alimentação deste nutriente durante a fase de produção, pois pequenos erros de dosagem da solução, ou vazão da bomba, podem acarretar em uma alimentação exagerada de nitrogênio ao meio de cultivo, tornando este nutriente não limitante para a célula.

Mesmo iniciando o experimento com concentrações inferiores de glicose e nitrogênio, e mantendo estas concentrações em níveis não inibitórios, os fatores de conversão para o presente experimento foram inferiores aos verificados para o caso em que não houve o reciclo externo de células. No momento da recirculação as células sofrem um stress ao passar pela membrana, podendo, inclusive, ocorrer lise celular durante este período. Este stress pode ter influenciado nos resultados de fator de conversão.

Ao se comparar estes resultados com os resultados obtidos no cultivo batelada sequencial com reciclo externo de células e alimentação de nitrogênio em concentrações limitantes durante a fase de produção (Tabela 4.5), verifica-se que a alteração das concentrações iniciais de substrato promoveu o aumento da produtividade volumétrica global (Prod) em 16,4 %. O volume final para estes dois cultivos foi similar, pois ambos foram alimentados em nitrogênio durante a fase de produção.

Ao se avaliar a predição desta última condição experimental, com reciclo externo de células, pelo modelo fenomenológico, verifica-se que o modelo foi capaz de prever os resultados experimentais. Apesar do P(3HB) ter sido sobrestimado na fase de produção, o X_r final foi bastante próximo do valor experimental. Mesmo a predição do consumo das concentrações de glicose e nitrogênio foram mais precisas neste experimento, quando comparada aos demais. Na Figura 4.57 (c), verifica-se que o modelo considera um valor constante de μ_{X_r} durante a fase de produção, em torno de $0,01 \text{ h}^{-1}$. Este valor constante não é verificado a partir dos dados experimentais, sendo que, após 36 h, os valores de μ_{X_r} ficam próximos a zero. Os valores de q_p preditos pelo modelo ao final da fase de crescimento estão próximos aos experimentais, porém na fase de produção, enquanto os valores

experimentais começam a aumentar apenas no final da fase de produção, os valores preditos se elevam e posteriormente se mantêm praticamente constantes. Esta diferença entre q_p na fase de produção deve ser responsável pela sobrestimação dos valores de P(3HB) pelo modelo. O comportamento de q_p é bastante distinto neste experimento em relação aos demais, que apresentam um ponto de máximo e posteriormente decaem. Neste experimento, o valor máximo de q_p foi atingido ao final do cultivo, e aparentemente, continuaria aumentando se o cultivo não fosse parado, comportamento que pode ter relação à alimentação de nitrogênio durante a fase de produção, e também ao fato de que μ_{Xr} era superior no início da fase de produção (em torno de $0,07 \text{ h}^{-1}$). Nos demais experimentos com reciclo externo de células, o valor de μ_{Xr} no início da fase de produção se encontrava em torno de $0,06 \text{ h}^{-1}$ ou abaixo deste valor.

A partir dos resultados apresentados para validação do modelo, é possível afirmar que o modelo fenomenológico é capaz de prever o comportamento de diferentes situações experimentais para produção de P(3HB) por *C. necator*, a partir de glicose. Em todas as situações o modelo superestimou os valores de P(3HB) produzido e, ao se avaliar os valores máximos de q_p calculados a partir dos dados experimentais, verifica-se que em nenhum caso q_p alcançou os valores máximos relatados por Aragão (1996). Este autor verificou este valor máximo para uma situação bastante específica, que possivelmente não é verificada na maior parte das demais condições experimentais. Se este for o caso, o modelo sempre irá sobrestimar a produção de P(3HB). Além disso, a inibição da % de P(3HB) na reação q15 também pode estar contribuindo para esta sobrestimação. O comportamento das demais variáveis está próximo ao obtido de forma experimental.

Além disso, verificou-se que as concentrações iniciais dos substratos influenciam de forma decisiva nos resultados finais de produtividade do processo. O cultivo em modo batelada sequencial com reciclo externo de células, alimentação limitante de nitrogênio na fase de produção e concentrações iniciais de glicose e nitrogênio inferiores, promoveu o aumento de produtividade do processo, que poderia ter sido ainda superior, se a concentração da solução de nitrogênio alimentada fosse superior, ou se uma alimentação exponencial de nitrogênio fosse aplicada durante a fase de produção.

5. CONCLUSÕES

Os experimentos realizados em modo batelada sequencial com reciclo externo de células e alimentação limitante de nitrogênio na fase de produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) por *C. necator*, a partir de glicose e ácido propiônico, mostraram que a alimentação deste nutriente durante a fase de produção promove o aumento da produção de PHA. A correlação entre as velocidades específicas de produção de PHA e de crescimento celular, indicou que q_P aumenta de forma linear com o decréscimo de μ_{Xr} até valores entre 0,01 e 0,03 h⁻¹ e, abaixo desta faixa de valores, a correlação apresenta comportamento inverso, o que reafirma a importância de manter valores de μ_{Xr} na ordem de 0,02 h⁻¹ durante a fase de produção a fim de manter q_P em níveis máximos.

A rede metabólica da Análise de Fluxos Metabólicos para a produção de P(3HB) por *C. necator*, a partir de glicose pode ser resumida em 15 reações, envolvendo 17 metabólitos chave para o processo: glicose, glicose-6P, triose-P, piruvato, acetil-CoA, oxaloacetato, isocitrato, α -cetogluturato, P(3HB), biomassa, CO₂, NADH, NADPH, ATP, O₂, NH₃ e Enxofre (S). Esta rede metabólica é suficiente para descrever as principais reações envolvidas no metabolismo de *C. necator* e, através dela, um modelo fenomenológico estruturado foi proposto e é capaz de descrever diferentes condições de cultivo, incluindo a limitação por nitrogênio e oxigênio.

O modelo fenomenológico obtido através da AFM deve incluir inibições do crescimento celular pela concentração inicial de glicose (verificada acima de 50 g.L⁻¹) e nitrogênio (verificada acima de 2 g.L⁻¹), sendo que em 2 g.L⁻¹ de nitrogênio e 30 g.L⁻¹ de glicose observou-se μ_{Xrmax} para *C. necator*. O efeito inibidor de altas concentrações iniciais de N é inferior ao efeito inibidor de altas concentrações iniciais de glicose, dentro das faixas avaliadas.

O modelo fenomenológico, incluindo as inibições, foi validado e é capaz de prever o comportamento de diferentes estratégias de cultivo, entre elas, do cultivo em modo batelada sequencial com reciclo externo de células com e sem alimentação de nitrogênio durante a fase de produção. Observou-se, entretanto, que para todos os casos houve uma sobrestimação da produção de P(3HB), possivelmente, devido ao elevado q_{Pmax} considerado no modelo, que foi observado apenas em uma condição bastante específica de produção de P(3HB) por Aragão (1996). Além disso, o termo de inibição do crescimento celular pela porcentagem de P(3HB) pode estar causando uma redução mais

pronunciada do que a real para o crescimento celular, o que leva a estimativa de maiores concentrações de P(3HB).

Os resultados apresentados indicaram que para obter maior produtividade de processo, a concentração de glicose deve ser mantida abaixo de 50 g.L^{-1} e a concentração de nitrogênio até 2 g.L^{-1} para evitar a inibição do crescimento celular. Além disso, a alimentação de nitrogênio durante a fase de produção contribui para obtenção de maiores produtividades.

O cultivo em modo batelada sequencial com reciclo externo de células, alimentação de nitrogênio na fase de produção e concentrações iniciais de glicose e nitrogênio fora das faixas inibitórias sugeridas, apresentou produtividade volumétrica de $1,35 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, que é 16,4 % superior ao obtido pelo mesmo sistema em concentrações iniciais de glicose e nitrogênio elevadas.

Desta forma, é possível concluir que o modelo fenomenológico proposto no presente trabalho pode ser aplicado para prever e facilitar a obtenção de condições de processo que maximizem a produção de P(3HB) por *C. necator*, a partir de glicose.

6. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a alimentação exponencial de nitrogênio durante a fase de produção de P(3HB) no sistema com reciclo externo de células, a fim de manter uma velocidade específica máxima de crescimento em torno de $0,03 \text{ h}^{-1}$, que é o valor no qual os maiores valores de q_p são alcançados por *C. necator*, proporcionando maior produção de P(3HB) e promovendo aumento na produtividade do processo;
- Estudar uma estratégia de processo contínuo com reciclo externo de células, através de alimentação de meio rico em nutrientes e remoção de meio com baixa concentração de carbono de forma exponencial, no qual uma concentração residual constante de nutrientes possa ser mantida no meio de cultivo, evitando assim os problemas associados à dinâmica do processo com a realização da alimentação na forma de pulsos, e a inibição por substratos;
- Avaliar experimentalmente como evoluem os *pools* intracelulares desde a fase de crescimento até a fase de produção, de modo a verificar as evoluções qualitativas destes *pools* atualmente previstas pelo modelo;
- Incorporar a reação de degradação de P(3HB) no modelo fenomenológico proposto, para que, em situações de limitação em carbono, o consumo de P(3HB) possa ser predito pelo modelo.
- Estudar o efeito do stress provocado pela membrana no momento do reciclo e incorporar este efeito no modelo fenomenológico proposto;
- Considerar a assimilação do ácido propiônico e a produção das unidades de 3HV no modelo fenomenológico, para que o mesmo possa ser utilizado como preditivo também na produção do copolímero.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPLAST. **Indústria brasileira de transformação de material plástico – Perfil 2014**. Disponível em:

http://file.abiplast.org.br/download/links/2015/perfil_abiplast_2014_web.pdf. Acesso em: 05 julho 2015.

AGNEW, D. E.; PFLEGER, B. F.. Synthetic biology strategies for synthesizing polyhydroxyalkanoates from unrelated carbon sources. **Chemical Engineering Science**, v. 103, p. 58-67, 2013.

AHN, W.S.; PARK, S.J.; 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.

AHN, W.S.; PARK, S.J.; LEE, S.Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 235-240, 2001.

ALIAS, Z.; TAN, I. K. P.. Isolation of palm oil-utilizing, polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1229-1234, 2005.

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

ANDREWS, J. F.. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, p. 707 – 723, 1968.

ARAGÃO, G. M. F. **Production de polyhydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures**. These (Doctorat spécialité: Biologie et génétique Moléculaires et Cellulaires – Biotechnologie) – L'institut National des Sciences appliquées de Toulouse, Toulouse. 1996

ARAGÃO, G. M. F.; LINDLEY, N. D.; URIBELARREA, J. L.; 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.

ARAGÃO, G.M.F.; SCHMIDELL, W.; IENCZAK, J.L., SCHMIDT, F.C.; DALCANTON, F.; FIORESE, M.L.; RODRIGUES, R.; DEUCHER, R.; MARANGONI, C. **Preparation Of polyhydroxyalkanoates from a citric residue**. International Application Published Under the Patent Cooperation Treaty (PCT), WO2009/149529 A1, 2009.

ASHBY, R. D.; SOLAIMAN, D. K. Y.; FOGLIA, T. A.. Synthesis of Short-/Medium-Chain-Length poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 2106-2112, 2005.

ATLIÉ, A., KOLLER, M., SCHERZER, D., KUTSCHERA, C., GRILLO-FERNANDES, E., HORVAT, P., CHIellini, E., BRAUNEGG, G.. Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. **Applied Environmental Microbiology**, v. 91, p. 295–304. 2011.

BABEL, W., ACKERMANN, J. U., BREUER, U.. Physiology, regulation, and limits of the synthesis of poly(3HB). **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.71, p.125-57. 2001.

BAEI, M. S., NAJAFPOUR, G. D., YOUNESI, H., TABANDEH, F., ISSAZADEH, H., KHODABANDEH, M.. Growth kinetic parameters and biosynthesis of Polyhydroxybutyrate in *Cupriavidus necator* DSMZ 545 on selected substrates. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, v. 17(1) p. 1-8. 2011.

BASSAS, M.; RODRÍGUEZ, E.; LLORENS, J.; MANRESA, A.. Poly(3-hydroxyalkanoate) produced from *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (NCBIM 40045): Effect of fatty acid nature as nutrient. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 352, p. 2259–2263. 2006.

BELFARES, L.; PERRIER, M.; RAMSAY, B.A.; RAMSAY, J.A.; JOLICOEUR, M.; CHAVARIE, C. Multi-inhibition kinetic model for

the growth of *Alcaligenes eutrophus*. **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 41, p. 249-256, 1995.

BIDEAUX, C.. **Modélisation stoechiométrique des productions microbiennes par descripteur métabolique au moyen du calcul formel. Validation sur le modèle *Kluyveromyces marxianus***. Toulouse, Tese de doutorado (Engenharia Bioquímica e Alimentos), Institut National des Sciences Appliqués de Toulouse (INSA – Toulouse), França. 2000.

BIDEAUX, C.; GOMA, G.; URIBELARREA, J. L.. Stoichiometric modelling approach for microbial cultures monitoring. **Modelling, Identification and Control**, v.3, p. 413-426, 2008.

BIOCYCLE. **Biocycle – História**. Disponível em: <http://www.biocycle.com.br/site.htm>. Acesso em: agosto 2015.

BODIESEL. **Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB)**. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/pnpb.html>. Acesso em: agosto 2015.

BONOMI, A.; SCHMIDELL, W.. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: Schmidell, W.. **Biotecnologia Industrial**. 1ª Ed. São Paulo: Editora Blucher, 2001. V. 2, p. 123 – 178.

BOWIEN, B.; COOK, A. M.; SCHLEGEL, H. G.. Evidence for the in vivo regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in *Hydrogenomonas eutropha* H16 from measurements of the intracellular concentrations of metabolic intermediates. **Archives of Microbiology**, v. 97, p. 273 – 281. 1974.

BRAMER, C. O., STEINBUCHER, A.. The methylcitric acid pathway in *Ralstonia eutropha*: new genes identified involved in propionate metabolism. **Microbiology**, v.147(8), p.2203-2214. 2001.

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

BRAUNEGG, G., LEFEBVRE, G., RENNER, G., ZEISER, A., HAAGE, G., LOIDL-LANTHALER, K.. Kinetics as a tool for polyhydroxyalkanoate production optimization. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 239–248. 1995.

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

BUDDE, C. F.; RIEDEL, S. L.; WILLIS, L. B.; RHA, C. K.; SINSKEY, A. J.. Production of poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered *Ralstonia eutropha* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 2847 – 2854, 2011.

CESÁRIO, M. T., RAPOSO, R. S., ALMEIDA, M. C. M. D., KEULEN, F. V., FERREIRA, B. S., FONSECA, M. R.. Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. *New Biotechnology*, v. 31(1), p. 104-113. 2014.

CHAKRABORTY, P., GIBBONS, W., MUTHUKUMARAPPAN, K.. Conversion of volatile fatty acids into polyhydroxyalkanoate by *Ralstonia eutropha*. **Journal of Applied Microbiology**, v.106(6), p.1996-2005. 2009.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R.. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Advanced Enzymology**, v. 17, p. 65 – 134. 1965.

CHANG, H. M.; WANG, Z. H.; LUOL, H. N.; XU, M.; REN, X. Y.; ZHENG, G. X.; B. J.; WU, B. J.; ZHANG, X. H.; LU, X. Y.; CHEN, F.; JING, X. H.; WANG, L.. poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based scaffolds for tissue engineering. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, p. 533-539, 2014.

CHEN, G. Q.; WU, Q.. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, v. 26, p. 6565-6578, 2005.

CHEN, Y.; YANG, H.; ZHOU, Q.; CHEN, J.; GU, G.. Cleaner recovery of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 501–506. 2001.

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

COLOMBIÉ, V.. **Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel**. These (Doctorat spécialité: Microbiologie & Biocatalyse industrielles). L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Toulouse. 2005.

DAVIS, D. H.; DOUDOROFF, M.; STANIER, R. Y.. Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: Taxonomic implications. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 19, p. 375 – 390, 1969.

DIAS, J. M. L.; SERAFIM, L. S.; LEMOS, P. C.; REIS, M. A. M.; OLIVEIRA, R.. Mathematical modeling of a mixed culture cultivation process for the production of polyhydroxybutyrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 92, p. 209 – 222, 2005.

DOI, Y.; KUNIOKA, M.; NAKAMURA, Y.; SOGA, K.. Biosynthesis of copolesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from ¹³C-labeled acetate and propionate. **Macromolecules**, v. 20, p. 2988-2991, 1987.

DOI, Y., SEGAWA, A., KAWAGUCHI, Y., KUNIOKA, M.. Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.67(1-2), p.165-169. 1990.

DOI, Y., KAWAGUCHI, Y., KOYAMA, N., NAKAMURA, S., HIRAMITSU, M., YOSHIDA, Y., KIMURA, H.. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.103(2-4), p.103-108. 1992.

DU, G.; CHEN, J.; YU, J.; LUN, S. Feeding strategy of propanoic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*. **Biochemical Engineering Journal**, v.88, p. 103-110, 2001a.

DU, G.; CHEN, J.; YU, J.; 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, 2001b.

EDWARDS, J. S.; PALSSON, B. O.. How will bioinformatics influence metabolic engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, p. 162 – 169, 1998.

FRIEDLI, G. L.. Interaction of deaminated soluble wheat protein (SWP) with other food proteins and metals. 1996. Disponível em: <http://www.friedli.com/research/PhD/PhD.html#contents>. Acesso em: maio 2013.

FROST e SULLIVAN. New plastics expand applications and opportunities. **Plastics Additives and Compounding**, v. 6, p. 10, 2004.

GAUDIN, P. **Contribution de la synthèse de poly- β -hydroxybutyrate (PHB) à la croissance de *Ralstonia eutropha***. Toulouse. Tese de doutorado (Engenharia Bioquímica e de Alimentos). Instituto Nacional de Ciências Aplicadas de Toulouse - FR, 1998.

GOMBERT, A. K.; SANTOS, M. M.; CHRISTENSEN, B.; NIELSEN, J.. Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 1441 – 1451, 2001.

GOMES, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista brasileira de Engenharia Química**, v. 17, p. 24 – 29. 1997.

GOTTSCHALK, G., EBERHARDT, U., SCHLEGEL, H. G.. Utilization of Fructose by *Hydrogenomonas H 16*. **Archiv für Mikrobiologie**, v.48, p. 95-108. 1964.

GRAGE, K; PETERS, V.; PALANISAMY, R.; REHM, B.H.A. *Em Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors*. Bernd H.A. Rehm, eds. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2009, cap. 11.

GROUSSEAU, E.. **Potentialités de production de Poly-Hydroxy-Alcanoates chez *Cupriavidus necator* sur substrats de type acides gras volatils : études cinétiques et métaboliques**. Toulouse. Tese de

doutorado (Engenharia Enzimática e Microbiana). Instituto Nacional de Ciências aplicadas de Toulouse - FR, 2012.

GROUSSEAU, E.; BLANCHET, E.; DÉLÉRIS, S.; ALBUQUERQUE, M. G. E. ; PAUL, E. ; URIBELARREA.. Impact of sustaining a controlled residual growth on polyhydroxybutyrate yield and production kinetics in *Cupriavidus necator*. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 30 – 38, 2013.

GROUSSEAU, E.; BLANCHET, E.; DÉLÉRIS, S.; ALBUQUERQUE, M. G. E. ; PAUL, E. ; URIBELARREA.. Phosphorus limitation strategy to increase propionic acid flux towards 3-hydroxyvaleric acid monomers in *Cupriavidus necator*. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 206 – 215. 2014.

GU, J. D.. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. **International Biodegradation & Biodegradation**, v. 52, p. 69-91. 2013.

GUTFREUND, H. Transient and relaxation kinetic of enzyme reactions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 40, p. 315 – 344. 1971.

HAYWOOD, G. W., ANDERSON, A. J., DAWES, E. A.. The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.57(1), p.1-6. 1988.

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

HONG, S. H., PARK, S. J., MOON, S. Y., PARK, J. P., LEE, S. Y.. In silico prediction and validation of the importance of the Entner-Doudoroff pathway in poly(3-hydroxybutyrate) production by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83(7), p. 854-863. 2003.

HORVAT, P., VRANA, I., LOPAR, S. M., ATLIÉ, A., KOLLER, M., BRAUNEGG, G.. Mathematical modelling and process optimization of a continuous 5-stage bioreactor cascade for production of poly[-(R)-3-

hydroxybutyrate] by *Cupriavidus necator*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 1235 – 1250. 2013.

IENCZAK, J. L.. **Estratégia de cultivo em alta concentração celular para a produção de Poli(3-hidroxibutirato) em substratos com moderada concentração da fonte de carbono**. Florianópolis. Tese de doutorado (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

IENCZAK, J.L.; ARAGÃO, G.M.F. Biotechnologically Produced Biodegradable polyesters, *In: Handbook of biodegradable polymers*, LENDLEIN, A. E SISSON, A. (eds.) WILEY – VCH VERLAG GMBH & Co. KGaA.Weinheim, Alemanha, v. 1, p. 23-38, 2011.

IENCZAK, J. L.; QUINES, L. K.; MELO, A. A.; BRANDELLERO, M; MENDES, C. R.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F.. High cell density strategy for poly(3-hydroxybutyrate) production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28(4), p. 585-596. 2011.

IENCZAK, J. L., SCHMIDELL, W., ARAGÃO, G. M. F.. High-cell-density culture strategies for polyhydroxyalkanoate production: a review. **Industrial Microbiology and Biotechnology**, DOI: 10.1007/s10295-013-1236-z. 2013.

IENCZAK, J. L., SCHMIDT, M., QUINES, L. Q., ZANFONATO, K., PRADELLA, J. G. C., SCHMIDELL, W., ARAGÃO, G. M. F.. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production in Repeated fed-Batch with Cell Recycle Using a Medium with low Carbon Source Concentration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. DOI: 10.1007/s12010-015-1883-9. 2015

IWATANI, S.; YAMADA, Y.; USUDA, Y.. Metabolic flux analysis in biotechnology processes. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 791-799, 2008.

JANA, S.; TEFFT, B. J.; SPOON, D. B.; SIMARI, R. D.. Scaffolds for tissue engineering of cardiac valves. **Acta Biomaterialia**, v. 10, p. 2877–2893, 2014.

JOUGHTEN, P.; WIEBE, M.; PENTTILA, M.. Dynamic flux balance analysis of the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* during the shift

from fully respirative of respirofermentative metabolic states to anaerobiosis. **The FEBS Journal**, v. 279., p. 3338 – 3354. 2012

KAHAR, P.; TSUGE, T.; TAGUCHI, K; 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.

KATOH, T.; YUGUCHI, D.; YOSHII, H.; SHI, H.; SHIMIZU, K.. Dynamics and modeling on fermentative production of poly(β -hydroxybutyric acid) from sugars via lactate by a mixed culture of *Lactobacillus delbruekii* and *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Biotechnology**, v. 67, p. 113 – 134, 1999.

KEGG PATHWAY. **Wiring diagrams of molecular interactions, reactions, and relations**. Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>. Acesso em: 2013 e 2015.

KELLERHALS, M., HAZENBERG, W., WITHOLT, B.. High cell density fermentations of *Pseudomonas oleovorans* for the production of mcl-PHAs in two-liquid phase media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 111–116. 1999.

KESSLER, B.; WITHOLT, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 97-104, 2001.

KHANNA S. e SRIVASTAVA, A.K. Repeated batch cultivation of *Ralstonia eutropha* for poly(β -hydroxybutyrate) production. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 1401-1403, 2005a.

KHANNA S. e SRIVASTAVA, A.K. A simple structured mathematical model for biopolymer (PHB) production. *Biotechnology Process*, v. 21, p. 830 – 838. 2005b.

KHANNA S. e SRIVASTAVA, A.K. Computer simulated fed-batch cultivation for over production of PHB: A comparison of simultaneous and alternate feeding of carbon and nitrogen. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 197-203, 2006.

KHANNA S. e SRIVASTAVA, A.K. Continuous production of poly- β -hydroxybutyrate by high-cell-density cultivation of *Wautersia eutropha*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 799-805, 2008.

KIM, J. H.; KIM, B. G.; CHOI, C. Y.. Effect of propionic acid on poly(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acid production by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v. 44, p. 903 – 906. 1992.

KIM, B. S.; LEE, S. C.; LEE, S. Y. ; CHANG, H. N.; CHANG, Y. K.; WOO, S. I.. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, p. 892-898, 1994.

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

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

LEE, S. Y. Plastic bacteria – progress and prospects for polyhydroxyalcanoate production in bacteria. **Trends Biotechnology**, v. 14, p. 437 - 438. 1996b.

LEE, S.Y., KIM, M.K., CHANG, H.N., PARK, Y.H. Effects of propionate on accumulation of Poly(Beta-Hydroxytbutyrate-Co-Beta-Hydroxyvalerate) and excretion of pyruvate in *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 611 – 616. 1994.

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

LEE, I-Y; NAM, S-W; CHOI, E-S; CHANG, H-N; PARK, Y. H.. Production of poly-3-hydroxybutyrate and measurement of related

enzyme activities in *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 31(5), p. 416-418, 1993.

LEFEBVRE, G.; ROCHER, M.; BRAUNEGG, G.. Effects of low dissolved-oxygen concentrations on poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Alcaligenes eutrophus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 827-833, 1997.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D.L., COX, M. M.. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: W. H. Freeman. 2008. 1158 p.

LOPEZ, M. S. G.. **Produção de plásticos biodegradáveis utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. São Paulo. Tese de doutorado (Biotecnologia). Universidade Estadual de São Paulo – Instituto Butantan (IPT), São Paulo. 2010.

LUZIER, W. D. Materials derived from biomass/biodegradable materials. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 839–842. 1992.

MAHARJAN, R. P.; YU, P. L.; SEETO, S.; FERENCI, T.. The role of isocitrate lyase and the glyoxylate cycle in *Escherichia coli* growing under glucose limitation. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 178–183. 2005.

MARTINEZ, G. A.; BERTIN, L.; SCOMA, A.; REBECCHI, S.; BRAUNEGG, G.; FAVA, F.. Production of polyhydroxyalkanoates from dephenolised and fermented olive mill wastewaters by employing a pure culture of *Cupriavidus necator*. **Biochemical Engineer Journal**, v. 97, p. 92 – 100, 2015.

MARZAN, L. W.; SHIMIZU, K.. Metabolic regulation of *Escherichia coli* and its *phoB* and *phoR* genes knockout mutants under phosphate and nitrogen limitations as well as at acidic condition. **Microbial Cell Factories**, v.10, 2011.

MENDONÇA, T. T.; GOMEZ, J. G. C.; BUFFONI, E.; SANCHEZ, R. J. R.; SCHRIPSEMA, J.; LOPES, M. S. G.; SILVA, L. F.. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 815 – 829, 2013.

MIFUNE, J.; NAKAMURA, S.; FUKUI, T.. Engineering of pha operon on *Cupriavidus necator* chromosome for efficient biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from vegetable oil. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 1305 – 1312, 2010.

MONOD, J.. Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes. Hermann & Cie., Paris. 1942.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428. 1959.

OBRUCA, S.; BENESOVA, P.; PETRIK, S.; OBORNA, J.; PRIKRYL, R.; MAROVA, I. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 1409 – 1414, 2014.

OEDING, V.; 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.

ORITA, I., IWAZAWA, R., NAKAMURA, S., FUKUI, T.. Identification of mutation points in *Cupriavidus necator* NCIMB 11599 and genetic reconstitution of glucose-utilization ability in wild strain H16 for polyhydroxyalkanoate production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.113(1), p.63-69. 2012.

PENLOGLOU, G.; ROUSSOS, A.; CHATZIDOUKAS, C.; KIPARISSIDES, C.. A combined metabolic/polymerization kinetic model on the microbial production of poly(3-hydroxybutyrate). **New Biotechnology**, v. 27, p. 358 – 367. 2010

PIGOU, M.; MORCHAIN, J.. Investigating the interactions between physical and biological heterogeneities in bioreactor sustaining compartment population balance and metabolic models. **Chemical Engineering Journal**, v. 126, p. 267 – 282. 2015

PIRT, S. J.. The maintenance requirement of bacteria in growing cultures. **Proc. Roy. Soc. London**, 1966.

PIRT, S. J.. **Principles of microbe and cell cultivation**. Londres, Blackwell Scientific Publications. 1975.

QUINES, L. K. M., IENCZAK, J. L., SCHMIDT, M., ZANFONATO, K., RODRIGUES, M. I., SCHMIDELL, W., ARAGÃO, G. M. F.. Extração de poli(3-hidroxibutirato), produzido por *Cupriavidus necator*, com carbonato de propileno. **Química Nova**, v. 38(2), p. 214-220. 2015.

RABERG, M., PEPLINSKI, K., HEISS, S., EHRENREICH, A., VOIGT, B., DORING, C., BOMEKE, M. HECKER, M., STEINBUCHSEL, A.. Proteomic and transcriptomic elucidation of the mutant *Ralstonia eutropha* G⁺ with regard to glucose utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77(6), p. 2058-2070. 2011.

RAICHNER, G. Análise econômica da produção de polímeros biodegradáveis no contexto de uma biorefinaria a partir de cana-de-açúcar. São Paulo. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo. 2011.

RAMADAS, N.V.; SINGH, S.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52(1), p. 17-23, 2009.

RAMSAY, B. A. Production and use of biopolymers. **Proceedings of the Symposium on physiology**. Seggau, Austria, 1994.

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

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

RIASCOS, C. A. M.; GOMBERT, A. K.; PINTO, J. M.. A global optimization approach for metabolic flux analysis based on labeling balances. **Computers and Chemical Engineering**, v. 29, p. 447–458, 2005.

RIESENBERG, D.; GUTHKE, R. High-cell-density cultivation of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 422-430, 1999.

ROCHA, R.C.S.; SILVA, L.F.; TACIRO, M.K.; PRADELLA, J.G.C. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 24, p. 427-431, 2008.

RODRIGUES, R.C. **Condições de cultura para a produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de indústrias de alimentos.** Florianópolis. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina. 2005.

ROELS, J. A.. **Energetics and kinetics in biotechnology.** New York: Elsevier Biomedical Press, 1983.

RYU, H.W.; HAHN, S.K.; CHANG, Y.K.; CHANG, H.N. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55(1), p. 25-32, 1997.

SANTOS, E.; GAI, C. S.; ZANFONATO, K.; MARTINHAGO, F. M.; STEFFEN, W.; QUINES, L. K.; SCHMIDT, M.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F.. Production of polyhydroxyalkanoate biopolymer from vinasse using *Ralstonia eutropha*. **BMC Proceedings**, v. 8(Suppl 4), p. 132, 2014.

SAVINELL, J. M.; PALSSON, B. O.. Network analysis of intermediary metabolism using linear optimization. **Journal of Theoretical Biology**, v. 54, p. 421 – 454, 1992.

SCHMIDELL W. **Agitação e aeração em biorreatores.** In: W. Schmidell, U.A. Lima, E. Aquarone, W. Borzani. *Biotechnologia Industrial*: Engenharia Bioquímica São Paulo: Edgard Blücher, vol. 2.; p.277-331, 2001.

SCHMIDT, M.. **Produção de poli(3-hidroxiбутирато) por *Cupriavidus necator* DSM 545 em meio suplementado com óleo de soja miniemulsionado.** Florianópolis. Dissertação de mestrado (Engenharia de alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. 2011.

SHAH, A. A., HASAN, F., HAMEED, A., AHMED, S.. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 246-265. 2008.

SHANG, L.; JIANG, M.; CHANG, H. N.. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different glucose concentrations. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1415–1419, 2003.

SHI, H.; NIKAWA, J.; SHIMIZU, K.. Effect of Modifying Metabolic Network on Poly-3-Hydroxybutyrate Biosynthesis in Recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87(5), p. 666-677, 1999.

SHI, H.; SHIRAIISHI, M.; SHIMIZU, K.. Metabolic flux analysis for biosynthesis of poly(β -hydroxybutyric acid) in *Alcaligenes eutrophus* from various carbon sources. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, p. 579 – 587, 1997.

SHIMIZU, A. A Review on metabolic pathway analysis with emphasis on isotope labeling approach. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, p. 237-251, 2002.

SILVA, L. F., TACIRO, M. K., RAICHER, G., PICCOLI, R. A. M., MENDONÇA, T. T., LOPES, M. S. G., GOMEZ, J. G. C.. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 71, p. 2-7. 2014.

SILVA, L.F.; TACIRO, M.K.; RAMOS, M. E. M.; CARTER, J. M.; PRADELLA, J. G. C.; GOMEZ, J. G. C.. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bactéria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 245 – 254, 2004.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. C.. Produção biotecnológica de poli-hidroxicanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v.30(7), p. 1732-1743, 2007.

SIM, S. J., SNELL, K. D., HOGAN, S. A., STUBBE, J., RHA, C., SINSKEY, A. J.. PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate *in vivo*. **Nature Biotechnology**, v.15(1), p.63-67. 1997.

SLATER, S.; HOUMIEL, K. L.; TRAN, M.; MITSKY, T. A.; TAYLOR, N. B.; PADGETTE, S. R.; GRUYS, K. J.. Multiple β -ketotiolases mediate poly(β -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. **Journal of bacteriology**, p. 1979-1987. 1998.

SPOLJARIC, I. V.; LOPAR, M.; KOLLER, M.; MUHR, A.; SALERBO, A.; REITERER, A.; HORVAT, P.. *In silico* optimization and low structured kinetic model of poly((R)-3-hydroxybutyrate) synthesis by *Cupriavidus necator* DSM545 by fed-batch cultivation on glycerol. **Journal of Biotechnology**, v. 168, p. 625 – 635, 2013.

SQUIO, C. R. **Estratégia de alimentação e utilização de suplementos nutricionais na produção de poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxicanoato) por *Ralstonia eutropha***. Florianópolis. Dissertação de mestrado (Engenharia de alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. 2003.

STEINBÜCHEL, A., SCHLEGEL, H.G.. Excretion of pyruvate by mutants of *Alcaligenes eutrophus* which are impaired in the accumulation of poly(β -hydroxybutyric acid) (PHB), under conditions permitting synthesis of PHB. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 168-175. 1989.

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

SUWANNASING, W.; IMAI, T.; KAEWKANNETRA, P.. Cost-effective defined medium for the production of polyhydroxyalkanoates

using agricultural raw materials. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 67 – 74, 2015.

THIRUMALA, M.; REDDY, S. V.. Production of PHA by recombinant organisms. **International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research**, v. 1(2), p. 40-62. 2012.

VALLINO, J. J.; STEPHANOPOULOS, G.. Metabolic flux distribution in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 633 – 646, 1993.

VANDAMME, P.; COENYE, T.. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2285 – 2289, 2004.

VANROLLEGHEM, P. A.; HEIJNEN, J. J.. A structural approach for selection among candidate metabolic network models and estimation of unknown stoichiometric coefficients. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, p. 133 – 138, 1998.

VARMA, A. PALSSON, B. O.. Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. **Bio/Tecnology**, v. 12, p. 994-998, 1994.

VOLOVA, T. G., KALACHEVA, G. S., GORBUNOVA, O. V., ZHILA, N. O.. Dynamics of activity of the key enzymes of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Ralstonia eutropha*. **Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia**, v.40(2), p.201-209. 2004.

ZANFONATO, K.; GAI, C. S.; QUINES, L. K.; SCHMIDT, M.; MARTINHAGO, F. M.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F.. Produção de poli(3-hidroxibutirato) a partir de *Cupriavidus necator* utilizando vinhaça como substrato. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2014.

ZVALETA-PASTOR, M.; SOHLENKAMP, C.; GAO, J.-L.; GUAN, Z.; ZAHEER, R.; FINAN, T. M.; RAETZ, C. R. H.; LÓPEZ-LARA, I. M.; GEIGER, O.. Sinorhizobium meliloti phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation. **PNAS**, v. 107, p. 302-307, 2010.

ZHAO, H.; LU, Y.; WANG, L.; ZHANG, C.; YANG, C.; XING, X.. Disruption of lactate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase for increased hydrogen production and its effect on metabolic flux in *Enterobacter aerogenes*. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 99 – 107, 2015.

WANG, Z.; MAO, H.; LIU, H.; SU, T. ; JIANG, H.. Optimization of medium composition for 3-hydroxycarboxylic acid production by *Pseudomonas mendocina* - biodegraded Polyhydroxybutyrate. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 62, p. 260-267, 2015.

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

YAMANE, T.. Yield of Poly-D(-)-3-Hydroxybutyrate from various carbon source – a theoretical study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 165 – 170. 1993.

YANG, R. D., HUMPHREY, A. E.. Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 17, p. 1211-1235. 1975.

YU, S. T.; LIN, C. C.; TOO, J. R.. PHBV production by *Ralstonia eutropha* in a continuous stirred tank reactor. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2729 – 2734. 2005.

APÊNDICE I

I. ANÁLISE DE FLUXOS METABÓLICOS DE *C. necator* – MACRO EXCEL

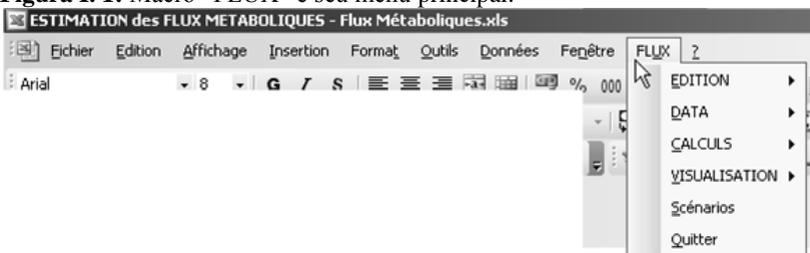
O Macro do Excel intitulado “FLUX” foi desenvolvido por Estelle Grousseau durante seu doutorado, sob orientação do professor Jean-Louis Uribellarea. Estelle defendeu seu doutorado no ano de 2012 no *Institut National des Sciences Appliquées* – INSA - Toulouse - Fr, fazendo parte da equipe do *Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés* - LISBP.

Este macro foi desenvolvido a fim de fornecer o Fluxo Metabólico mais provável na assimilação dos substratos glicose, ácido butírico, ácido acético e ácido propiônico, nas mais diversas situações, para a bactéria *Cupriavidus necator*. As reações consideradas na rede metabólica foram baseadas em estudos publicados na literatura para este microrganismo. A composição macromolecular (lipídeos, proteínas, polissacarídeos, entre outros) e elementar da biomassa foi obtida a partir dos resultados de Aragão (1996) e, em alguns casos, por falta de informação disponível na literatura e a dificuldade de obtenção dos dados, considerou-se que a composição de *C. necator* era muito próxima a de *E. coli*.

A seguir será apresentada uma breve explicação sobre o funcionamento deste macro, assim como a rede metabólica utilizada na construção do modelo fenomenológico durante o estágio de doutorado realizado por mim no INSA, sob orientação do professor Jean-Louis Uribellarrea.

I.1 ESTRUTURA E FUNCIONAMENTO DO MACRO “FLUX”

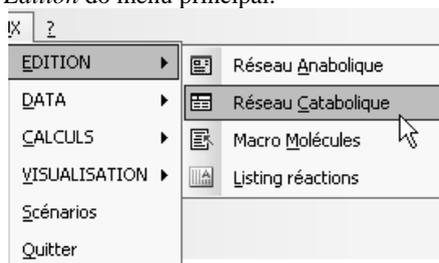
Após o Macro “FLUX” ser instalado, o mesmo aparecerá na barra menu do Excel, como pode ser visualizado na Figura I-1. Vale ressaltar que este macro permite a construção da rede metabólica para qualquer microrganismo, assimilando os mais diversos substratos e produzindo diferentes produtos, desde que os dados necessários estejam presentes na literatura ou seja possível obtê-los experimentalmente. Ao clicar no ícone FLUX, seis opções serão disponibilizadas para o usuário: *Edition, Data, Calculs, Visualisation, Scenario e Quitter*.

Figura I. 1: Macro “FLUX” e seu menu principal.

I.1.1 Menu principal

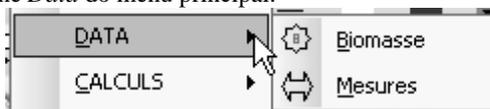
I.1.1.1 *Edition*

Permite a construção das redes anabólica (**Réseau Anabolique** - síntese de macromoléculas e sua composição) e catabólica (**Réseau Catabolique** - utilização das fontes de carbono e síntese dos produtos), identificação das macromoléculas (**Macro Molécules**) e edição do conjunto de reações constituintes da rede metabólica (**Listing réactions**). Os ícones descritos podem ser visualizados na Figura I-2.

Figura I. 2:Ícone *Edition* do menu principal.

I.1.1.2 *Data*

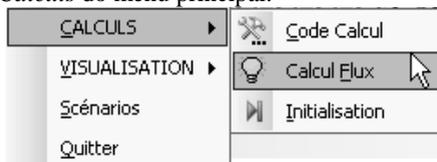
Inserção dos dados experimentais de composição macromolecular e elementar da biomassa (**Biomasse**) e especificações sobre os compostos: consumo, produção ou metabólito intracelular, e medidas dos fluxos de troca (**Mesures**) (Figura I-3).

Figura I.3: Ícone *Data* do menu principal.

I.1.1.3 *Calculs*

Implementação do código de cálculo conforme as modificações realizadas na rede metabólica (*Code Calcul*), construção do solucionador que permite o cálculo dos fluxos (*Calcul des Fluxes*) e inserção de valores para inicialização dos cálculos (*Initialisation*) (Figura I-4).

Figura I.4: Ícone *Calculs* do menu principal.



I.1.1.4 *Visualisation*

Os resultados (fluxos, balanços energéticos, rendimentos, etc) são apresentados em uma planilha do excel (*Resultats*), assim como em um esquema gráfico (*Graphe*) (Figura I-5).

Figura I.5: Ícone *Visualisation* do menu principal.



I.1.1.5 *Scenario* e *Quitter*

O ícone *Scenario* salva e direciona a visualização dos resultados de forma tabelada na planilha “Estim.Flux” do macro, e o ícone *Quitter* fecha o macro.

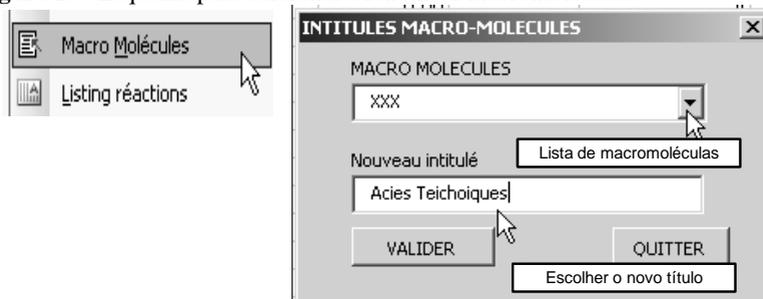
I.1.2 Construção da rede metabólica

I.1.2.1 Macromoléculas

As macromoléculas são limitadas a 13, das quais 10 fixas (proteínas, fosfolipídios, peptideoglicano, poliaminas, polissacarídeos, triglicerídeos, esteróis, RNA, DNA e LPS) e 3 que podem ser adicionadas em função do microrganismo estudado. A adição das macromoléculas deve ser realizada no ícone *Edition – Macro Molécules*,

conforme apresentado na Figura I-6. Primeiramente, selecionam-se as macromoléculas intituladas XXX e posteriormente define-se um novo título. Para finalizar, deve-se clicar em *Valider* e depois *Quitter* para fechar a aba.

Figura I.6: Esquema para adicionar e renomear macromoléculas.



I.1.2.2 Rede anabólica

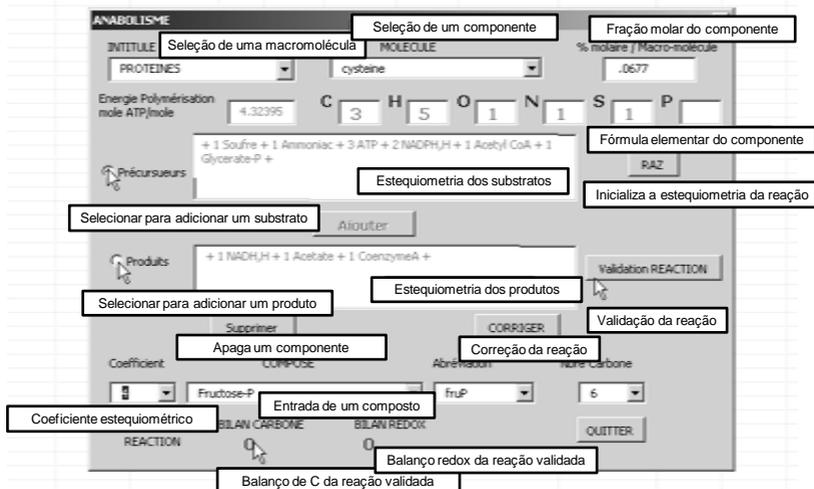
A construção da rede anabólica pode ser acessada em *Edition – Réseau Anabolique*. A rede anabólica é constituída pelo conjunto de reações que conduzem à síntese das macromoléculas da biomassa ativa, a partir dos precursores listados na Tabela I-1.

Tabela I.1: Precursores que constituem as macromoléculas da biomassa ativa. A abreviação apresentada refere-se a como o precursor é chamado no macro.

Precursor	Abreviação	Precursor	Abreviação
THF	THF	Oxaloacetato	oaa
Metileno-THF	Mylene-THF	Pentose - P	penP
Metil - THF	Methyl - THF	P-enolpiruvato	pep
Metenil - THF	Menyl - THF	Glicerol - P	pga
Formil - THF	F - THF	Piruvato	pyr
Enxofre	S	Glicerol - 3P	trioP
Amônio	NH ₃	CO ₂	CO2
ATP	ATP	Fumarato	Fum
NADH,H	NADH2	Acetato	Acet
NADPH,H	NADPH2	Sucinil - CoA	SucCoA
Acetil - CoA	AcCoA	Sucinato	Suc
Eritrose - P	eryP	Glicerol - P	GlyP
Frutose - P	fruP	Coenzima A	CoA
Glicose - P	gluP	Oxigênio	O2
α -cetogluturato	aKg		

Na Figura I-7, é possível visualizar a janela em que as macromoléculas que compõem a biomassa ativa são adicionadas à rede metabólica. Primeiramente, deve-se selecionar uma macromolécula, então selecionar um componente da macromolécula ou entrar com o nome de um novo componente e fornecer a fração molar deste componente na molécula. Ao final, a fração molar deve fechar 100 %. A reação que constitui a macromolécula é então escrita, e pode ser corrigida através da adição ou remoção de um componente.

Figura I.7: Janela de trabalho para criação da rede anabólica.



I.1.2.3 Rede catabólica

A construção da rede catabólica pode ser acessada em *Edition – Réseau Catabolique*. A rede catabólica é constituída pelo conjunto de reações que conduzem à síntese de intermediários precursores da rede anabólica, do catabolismo dos substratos à biossíntese dos produtos. A Figura I-8 mostra a janela de trabalho para construir a rede catabólica.

Se algum composto necessário à reação ainda não está presente no macro, o mesmo pode ser adicionado. Primeiramente, dá-se um nome, uma abreviação, adiciona-se o número de carbonos e a massa molar do composto e então valida-se. Para os metabólitos correspondentes aos intermediários precursores do anabolismo, é possível acrescentar sobre o gráfico da rede metabólica o valor do fluxo (μ molar) requerido para síntese da biomassa. Seleciona-se a planilha

“*Graphe*” do Excel com auxílio do cursor e então a célula na qual será indicado o fluxo anabólico do composto selecionado. Deve-se selecionar o ícone “*Graphe*” da janela e o valor do fluxo aparecerá em rosa no gráfico. Um esquema desta descrição pode ser visualizado na Figura I-9.

Figura I.8: Janela de trabalho para criação da rede catabólica.

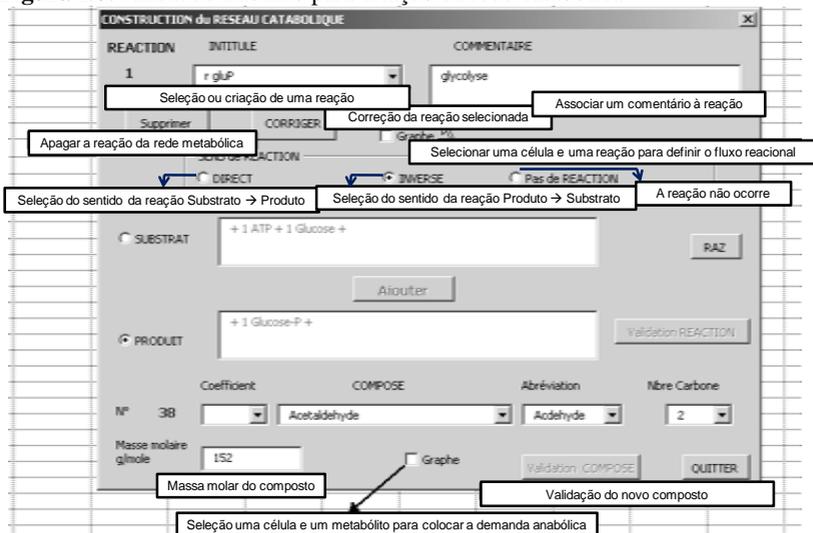
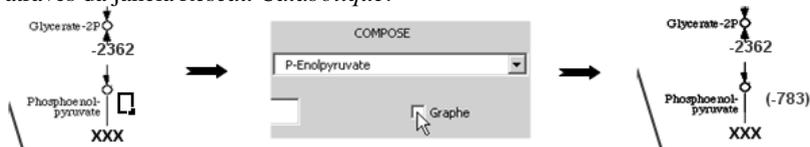


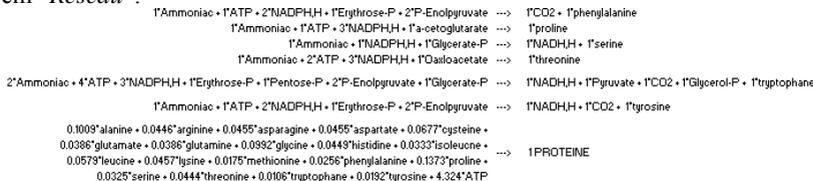
Figura I.9: Esquema para adição de composto no gráfico da rede metabólica através da janela *Reseau Catabolique*.



I.1.2.4 Edição da rede (*Listing réactions*)

O conjunto de reações anabólicas e catabólicas podem ser editadas no menu *Listing réactions*. A lista de reações pode ser visualizada na planilha “*Reseau*” do macro. Uma representação da lista está apresentada na Figura I-10.

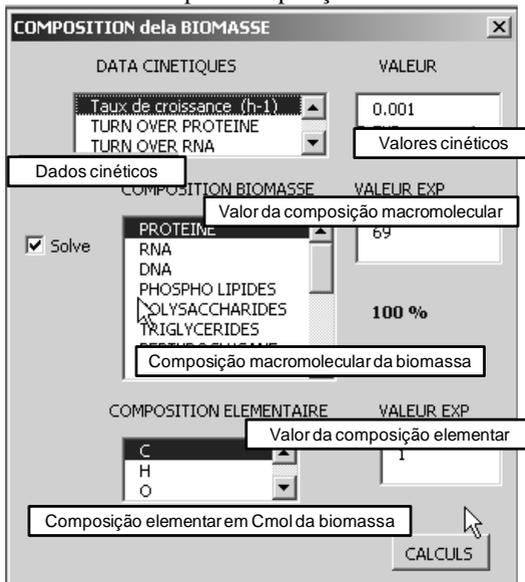
Figura I.10: Representação da lista de reações da rede metabólica apresentada em “*Reseau*”.



I.1.3 Características da biomassa

As características da biomassa, a estimativa da composição macromolecular e da demanda anabólica, em termos de precursores, podem ser acessadas em *Data – Biomasse*. A janela de trabalho neste item é apresentada na Figura I-11.

Figura I.11: Janela de trabalho para composição da biomassa.



I.1.3.1 Dados cinéticos

Todas as estimativas (demanda de precursores e fluxo) são calculadas em μmol , com relação a uma quantidade de biomassa. Essa quantidade é fornecida pelo parâmetro velocidade de crescimento (*Taux de croissance*). Assim, o fluxo estimado pode ser interpretado em

termos de velocidades específicas ($\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{gXr}^{-1}$) ou de velocidades ($\mu\text{mol.h}^{-1}$). Se o valor da velocidade de crescimento é igual a 1, o fluxo pode ser interpretado em termos de rendimento ($\mu\text{mol.gXr}^{-1}$). O valor de *turn over* (proteína e RNA) corresponde a um fator multiplicativo da energia de polimerização destas duas macromoléculas. A energia de manutenção é dada em $\mu\text{mol ATP.h}^{-1}.\text{gXr}^{-1}$.

I.1.3.2 Composição da biomassa e demanda anabólica em precursores

As demandas anabólicas em precursores são relativas a 1 grama de biomassa somada ao teor de cinzas. A fim de resolver o sistema é aconselhável estimar a composição macromolecular através do botão “*Calculs*” na janela “*Composition de la biomasse*”. Este cálculo minimiza os erros entre a composição macromolecular e elementar resultantes da rede anabólica e os dados experimentais correspondentes. A coerência global da rede anabólica é visualizada na planilha “*Precurseurs*” do macro, juntamente com os balanços de carbono e redox. A estimativa da composição em macromoléculas é reportada na planilha “*Estim.Flux*” do macro. A fórmula bruta correspondente, assim como as diferentes massas molares, em relação a biomassa orgânica e total, também são listadas (Figura I-12).

Figura I.12: Representação dos dados fornecidos na planilha *Estim.Flux*.

Composition BIOMASSE	DATA	ESTIME
PROTEINE	69.00%	63.60%
RNA	3.58%	3.29%
DNA	1.89%	1.68%
PHOSPHO LIPIDES	7.55%	8.86%
POLYSACCHARIDES	6.36%	8.54%
TRIGLYCERIDES	0.00%	0.00%
PEPTYDOGLYCAINE	5.64%	5.96%
LPS	3.98%	5.23%
STEROLS	0.00%	0.00%
POLYAMINE	1.00%	0.95%
XXX	0.00%	0.00%
XXXX	0.00%	0.00%
1-C	0.00%	0.00%
H2O	0.00%	0.97%
CO2	0.00%	0.00%
Précurseurs libres	1.00%	0.91%
Cendres	9.00%	8.20%
total	109.00%	108.20%
total organique	100.0%	100.0%

C	1.000	1.000
H	1.650	1.630
O	0.380	0.374
N	0.220	0.226
S	-	0.012
P	-	0.009

Masse molaire CHON / gX	22.786	22.786
Masse molaire CHOHPs / gX	23.447	23.447
Masse molaire / gX	24.655	24.655
redox / gX	4.232	4.232

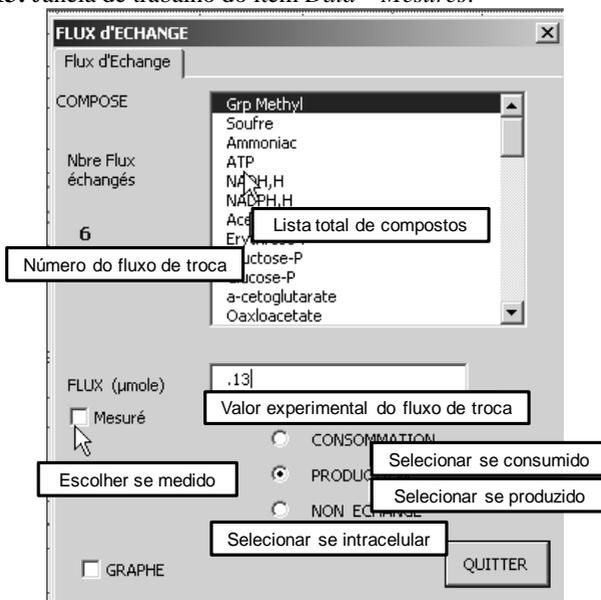
BILAN CARBONE	
0.04103167	
0.04103167	
Bilan redox	
0.174358382	
0.174373120	

I.1.4 Fluxo de troca - *Mesures*

A Figura I-13 apresenta a janela de trabalho do item *Data – Mesures*. Primeiramente escolhe-se um composto da lista e então, se define se o composto é consumido (substrato), produzido (produto) ou

se não há troca (metabólito intracelular). Para o caso dos substratos e produtos, seleciona-se a opção “*Mesuré*” caso se deseje impor um valor experimental para o fluxo, caso contrário, o valor do fluxo será calculado através da Análise de Fluxo. A opção “*Graphe*” permite que o valor do fluxo apareça no gráfico da rede metabólica. O valor aparecerá em verde.

Figura I.13: Janela de trabalho do item *Data – Mesures*.



I.1.5 Construção do código de cálculo

Sempre que uma modificação for realizada nas reações anabólicas, catabólicas, de fluxo de troca, entre outros, a reconstrução do código de cálculo deve ser refeita através do comando *Calculs – Code Calcul*. Esta reconstrução consiste em redefinir as dimensões dos vetores e matrizes utilizados para o cálculo, baseados em uma estimação paramétrica dos fluxos reacionais e dos fluxos de troca, com uma restrição de fluxo de acúmulo nulo para todos os metabólitos intracelulares e minimização dos erros entre os valores medidos e estimados.

A fim de garantir esta construção, as entradas devem respeitar certo número de restrições, por isto é aconselhável realizar todas as

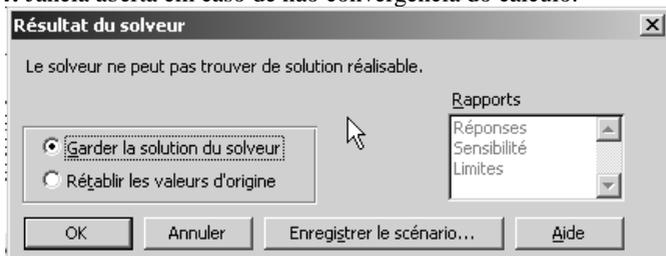
modificações nas janelas de diálogo e evitar modificar diretamente nas planilhas do macro.

I.1.6 Inicialização e cálculo

Os cálculos podem ser realizados através do comando *Calculs – Calcul Flux*. Quando uma modificação é feita na rede metabólica é aconselhável inicializar o vetor fluxo, antes de realizar o cálculo, pelo comando *Calculs – Initialization*.

O cálculo pode ser mais ou menos demorado em função da complexidade da rede, dos objetivos e das restrições específicas, mas leva normalmente apenas alguns minutos. Se não for possível encontrar uma resposta (não convergência), uma janela aparecerá na tela (Figura I-14) e as opções manter a solução do solucionador ou restabelecer os valores de origem poderão ser escolhidas.

Figura I.14: Janela aberta em caso de não convergência do cálculo.



Se a opção “Manter a solução do solucionador (*Garder la solution du solveur*)” for selecionada e o fluxo de acúmulo for não nulo, provavelmente uma reação foi esquecida, ou o sentido da reação está errado. Se a rede está corretamente construída, o problema deve estar na inicialização do cálculo. Neste último caso, a partir dos valores calculados pelo macro, deve-se inicializar o vetor fluxo através do comando *Calculs – Initialization* e então realizar o cálculo novamente. Caso o fluxo de acúmulo seja nulo, provavelmente uma ou mais restrições não podem ser satisfeitas e devem ser revistas e modificadas.

Se a opção “Restabelecer os valores de origem (*Rétablir les valeurs d'origine*)” for selecionada os valores que estavam apresentados no macro antes do novo cálculo ter sido solicitado serão restabelecidos.

I.1.7 Resultados

Na planilha *Estim.Flux* é possível visualizar os resultados do cálculo. Na linha 6 são apresentadas as velocidades líquidas das reações e na linha 23 os fluxos de troca (positivo caso consumido e negativo caso produzido) (Figura I-15).

Figura I.15: Resultados para as velocidades líquidas de reação e fluxos de troca.

2	VITESSES	r isocitrate	r a-kg	r SucCoA	r Succina	r fumarate	r malate
4	Vecteur vitesse estimé	9 253	9 181	9 195	9 195	15 602	15 603
5							
6	Vecteur vitesses nettes	9 253	9 181	9 195	9 195	15 602	15 603
9	COMPOSES		CoA	O2	Gluc	EtOH	Gluc
23	Flux Echangés ESTIMÉS (µmole/g)			22871.63			

Ao selecionar *Visualisation – Resultats*, o usuário será direcionado à uma zona da planilha *Estim.Flux* na qual os resultados de balanço são resumidos

Ao selecionar *Visualisation – Graphe* o usuário é direcionado para a planilha “*Graphe*” na qual é possível verificar os resultados graficamente. A Figura I-16 mostra uma parte do gráfico gerado.

Quando os valores aparecem na forma (XXX) significa que a reação não está ocorrendo, quando os valores de fluxo aparecem em azul, a reação está ocorrendo na direção correta, e em vermelho, quando a direção da reação é contrária. Os valores em verde são valores impostos pelo usuário como restrição.

I.1.7.1 Scenario

O comando *scenario* abre uma janela em que o usuário pode visualizar cálculos já realizados e salvos (*Affichage*), além de salvar o cálculo corrente (*Enregistrement*) (Figura I-17).

Ao selecionar *Enregistrement* deve-se dar um nome para o cenário que será salvo, escrever algum comentário, caso necessário ou desejado, e então clicar em *Enregistrement*. Se a opção *Affichage* for selecionada, escolhe-se um cenário já salvo e seleciona-se *Afficher* para abrir a opção. Caso algum cenário não seja mais necessário, o mesmo pode ser apagado ao clicar em *Supprimer*.

I.2 REDE METABÓLICA UTILIZADA PARA CONSTRUÇÃO DO MODELO FENOMENOLÓGICO

No presente trabalho o macro construído por Grousseau (2012) foi utilizado apenas para o consumo da glicose e produção de P(3HB). Assim, as reações que levam em conta a assimilação dos demais substratos e da produção do P(3HV) foram desconsideradas na rede catabólica. Apesar de acetato não ter sido fornecido para a bactéria, como substrato, a reação de consumo de acetato foi mantida, já que este metabólito é um produto das reações da rede anabólica. Da mesma forma, a reação de consumo do glicerol foi considerada, já que ele é produto das reações anabólicas. As reações do ciclo do glioxilato, nas quais o isocitrato é transformado em succinato e malato, foram desconsideradas, já que esta reação sofre forte repressão quando glicose é fornecida como substrato (MAHARJAM et al. 2005).

A síntese de folatos (reações 1 a 4) precisa ser mantida uma vez que os folatos são precursores na síntese de DNA e RNA. A via das pentoses-fosfato (reações 24 a 28) também é importante, pois produz precursores para as reações anabólicas. A reação 5 pode ocorrer em ambos os sentidos (produção ou consumo de glicose-6P), porém a enzima fosfofrutoquinase não foi detectada na bactéria *C. necator*, e desta forma apenas o sentido de produção de glicose-6P pode estar ativo (GOTTSCHALK; EBERHART; SCHLEGEL, 1964). Da mesma forma, a reação de consumo do gliconato pela via das pentoses-fosfato foi desconsiderada, já que a presença da enzima gliconato-6P-desidrogenase em *C. necator* não foi provada (GOTTSCHALK; EBERHART; SCHLEGEL, 1964). A degradação do P(3HB) foi desconsiderada, já que todas as situações avaliadas no presente trabalho não promovem a degradação do polímero. A reação 12 também pode ocorrer em ambos os sentidos, porém o sentido que considera o consumo do piruvato é improvável no caso em que a glicose é o substrato, logo este sentido foi desconsiderado.

Uma vez que obrigatoriamente grandes quantidades de NADPH são geradas pela assimilação da glicose na Entner-Doudoroff (ED), a enzima transidrogenase no sentido $\text{NADPH} \rightarrow \text{NADH}$ deve ser considerada. Se o NADPH for produzido em excesso, a enzima transidrogenase será ativada para que o mesmo seja consumido.

As reações que foram mantidas para a construção do modelo estão listadas na Tabela I-2 e representadas Figura I-18.

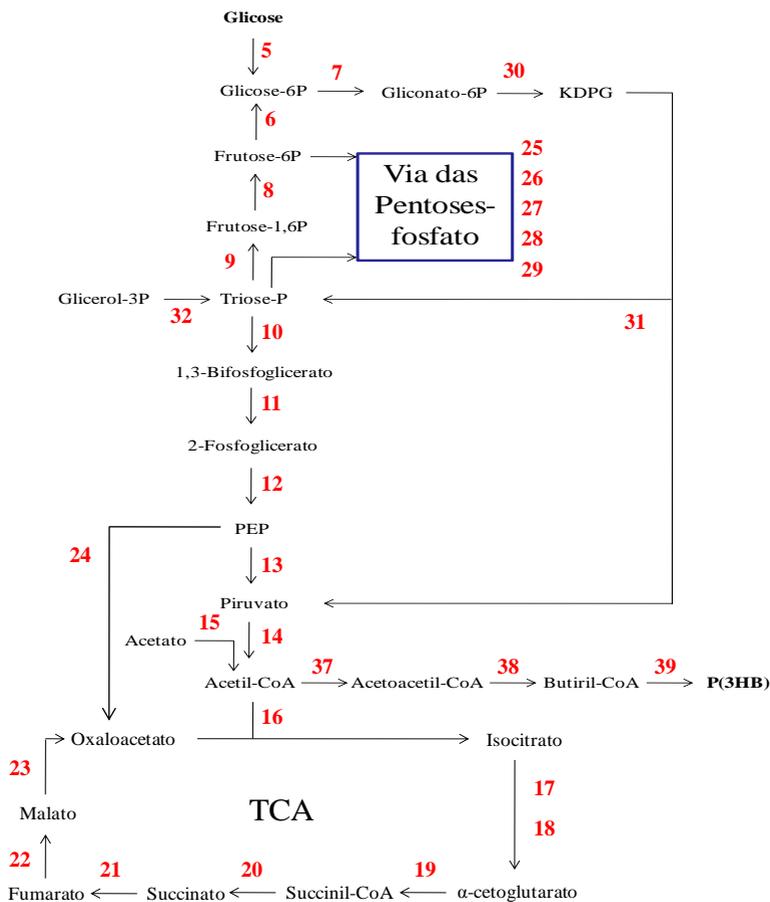
Tabela I.2: Reações consideradas no catabolismo de *C. necator* durante o consumo de glicose para produção de P(3HB).

1	1 THF + 1 NADPH + 1 CO ₂	→	1 Formil-THF
2	1 Metileno-THF + 1 NADPH	→	1 Metil-THF
3	1 Metileno -THF	→	1 Metenil-THF + 1 NADH
4	1 Metileno -THF	→	1 THF + 1 CO ₂
5	1 ATP + 1 Glicose	→	1 Glicose-6P
6	1 Frutose-6P	→	1 Glicose-6P
7	1 Glucose-6P	→	1 NADPH + 1 Gliconato-6P
8	1 Frutose 1,6P	→	1 Frutose-6P
9	2 Triose-P*	→	1 Frutose-1,6P
10	1NADH + 1 1,3Bifosfoglicerato	←	1 Triose-P
11	1 ATP + 1 2-Fosfoglicerato	←	1 1,3 Bifosfoglicerato
12	1 PEP*	←	1 2-Fosfoglicerato
13	1 PEP	→	1 ATP + 1 Piruvato
14	1 Piruvato + 1 CoenzimaA	→	1 NADH + 1 Acetil-CoA + 1 CO ₂
15	1ATP + 1Acetato + 1CoenzimaA	→	1 Acetil-CoA
16	1 Acetil-CoA + 1 Oxaloacetato	→	1 CoenzimaA + 1 Isocitrato
17	1 Isocitrato	→	1NADH+1 aKg + 1CO ₂
18	1 Isocitrato	→	1 NADPH + 1 aKg + 1 CO ₂
19	1 α-cetogluturato+ 1 CoenzimaA	→	1NADH+1CO ₂ +1Succinil-CoA
20	1 Succinil-CoA	→	1 ATP + 1 Succinato + 1 CoA
21	1 Succinato	→	1 Fumarato + 1 FADH
22	1 Fumarato	→	1 Malato
23	1 Malato	→	1 NADH + 1 Oxaloacetato
24	1 ATP + 1 Oxaloacetato	←	1 PEP + 1 CO ₂
25	1 Ribose-5P	→	1 Pentose-P
26	1 Xilulose-5P	→	1 Pentose-P
27	1Triose-P + 1 Sedoheptulose-7P	→	1 Ribose-5P + 1 Xilulose-5P
28	1 Frutose-6P + 1 Triose-P	→	1 Eritrose-4P + 1 Xilulose-5P
29	1 Frutose-6P + 1 Eritrose-4P	→	1Triose-P + 1 Sedoheptulose-7P
30	1 Gliconato 6-P	→	1 KDPG*
31	1 KDPG	→	1 Piruvato + 1 Triose-P
32	1 Glicerol-3P	→	1 NADH + 1 Triose-P
33	1 NADH + 0.5 O ₂	→	6 Prótons
34	0.5 O ₂ + 1 FADH	→	3 Prótons
35	3 Prótons	→	1 ATP
36	1 ATP	→	1 ADP
37	2 Acetil-CoA	→	1CoenzimaA+1Acetoacetil-CoA
38	1 Acetoacetil-CoA + 1 NADPH	→	1 Butiril-CoA
39	1 Butiril-CoA	→	1CoenzimaA+1 monômero HB
40	1 NADPH	→	1 NADH

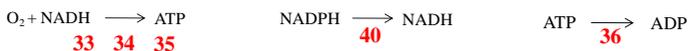
*KDPG: 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato, *TrioseP: gliceraldeído-3P,

*PEP = fosfoenolpiruvato, * aKg: α-cetogluturato.

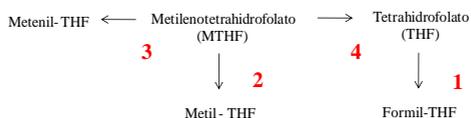
Figura I.18: Esquema das reações consideradas no catabolismo de *C. necator* durante o consumo de glicose para produção de P(3HB). Os números em vermelho representam as reações listadas na Tabela I-2.



Fosforilação oxidativa: Transdogenase: Dissipação de energia:



Ciclo do folato:



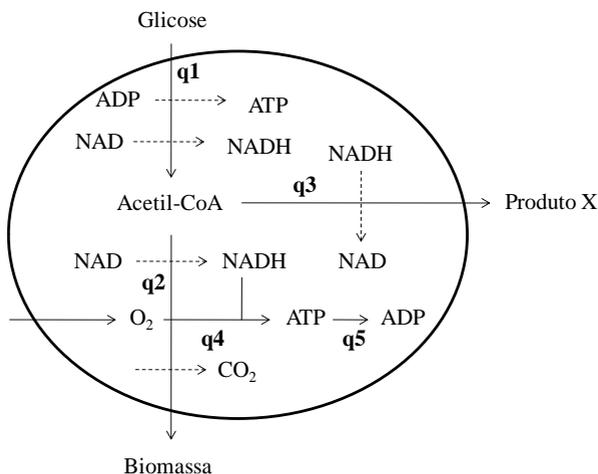
APÊNDICE II

II.1 MODELO FENOMENOLÓGICO

Uma abordagem sobre as etapas e os equacionamentos envolvidos na construção de um modelo fenomenológico será realizada neste apêndice.

A Figura II.1 apresenta o esquema de um metabolismo hipotético, para produzir um produto X e biomassa a partir de glicose, que será utilizado de forma a exemplificar e facilitar o entendimento da construção do modelo.

Figura II.1: Metabolismo hipotético para produção de X e biomassa a partir de glicose.



Neste metabolismo são considerados oito metabólitos e cinco reações (q), em que a velocidade das reações é função dos efeitos de ativação ou inibição (substratos, produtos, coenzimas, etc.), expressos em funções com a estrutura da Equação II.1.

$$q = q_{\max} \cdot \prod_i \frac{C_i^{n_i}}{k_{C_i}^{n_i} + C_i^{n_i}} \cdot \prod_j \left(1 - \frac{C_j^{n_j}}{k_{C_j}^{n_j} + C_j^{n_j}} \right) = q_{\max} \cdot \prod_i \frac{C_i^{n_i}}{k_{C_i}^{n_i} + C_i^{n_i}} \cdot \prod_j \frac{k_{C_j}^{n_j}}{k_{C_j}^{n_j} + C_j^{n_j}} \quad (\text{II.1})$$

Sendo q a velocidade específica da reação, q_{\max} a velocidade específica máxima que a reação pode atingir, k uma constante de

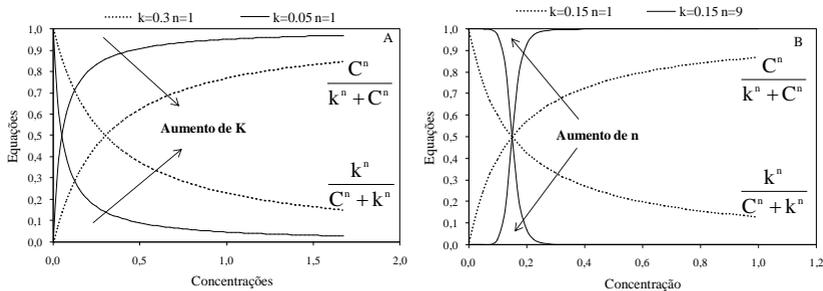
ativação/inibição e n fornece o grau de ativação/inibição pelo metabólito C.

Os termos representados nas equações II.2 e II.3 referem-se a ativação e a inibição da reação, respectivamente. O comportamento destas equações em relação aos valores de k e n pode ser observado na Figura II.2.

$$\frac{C_i^{n_i}}{k_{C_i}^{n_i} + C_i^{n_i}} \tag{II.2}$$

$$\frac{k_{C_j}^{n_j}}{k_{C_j}^{n_j} + C_j^{n_j}} \tag{II.3}$$

Figura II.2: Influência dos valores de k (A) e n (B) nas funções de ativação/inibição por um metabólito, em diferentes concentrações.

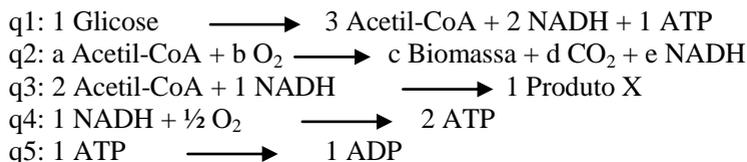


Para cada reação q, uma Equação do tipo II.1 deve ser escrita. Por exemplo, se a equação q1 é ativada pela glicose e inibida por ATP, tem-se a Equação II.4, em que Gli e ATP representam a concentração de glicose e de ATP, respectivamente.

$$q1 = q1_{max} \cdot \frac{Gli^{n_{gli}}}{Gli^{n_{gli}} + k_{gli}^{n_{gli}}} \cdot \frac{k_{ATP}^{n_{ATP}}}{ATP^{n_{ATP}} + k_{ATP}^{n_{ATP}}} \tag{II.4}$$

As velocidades específicas máximas (q_{max}) podem ser obtidas experimentalmente, ou então, podem ser estimadas a partir da Análise de Fluxos Metabólicos para este metabolismo hipotético. Além de q_{max}

deve-se determinar a estequiometria de todas as reações. Para o sistema da Figura II.1, propõem-se a seguinte estequiometria:



Os valores dos coeficientes estequiométricos da equação q2 (formação da biomassa) dependem da composição da biomassa. Com as estequiometrias definidas, uma conferência tanto do balanço redox, quanto do balanço em carbono, precisa ser feita. A quantidade de C e de H⁺ produzidos precisa ser a mesma de C e H⁺ consumidos, para todas as reações. Após conferência dos balanços redox e de carbono, uma matriz estequiométrica deve ser escrita para os metabólitos intracelulares (bióticos), outra para os metabólicos extracelulares (abióticos) e outra para os metabólitos gasosos. Da mesma forma, três vetores contendo a massa molar dos componentes abióticos, bióticos e gasosos devem ser escritos (Figura II.3).

Figura II.3: Esquema das matrizes e dos vetores da massa molar para o metabolismo hipotético. A massa molar da biomassa e do produto está representada por Y e X, respectivamente. Quando o valor da massa molar é 1 implica em o resultado ser expresso em mol.L⁻¹.

Matriz abiótica (M ^{abi})				Matriz biótica (M ^{bi})			
Reação	Glicose	Biomassa	Produto X	Reação	Acetil-CoA	NADH	ATP
q1	-1	0	0	q1	3	2	1
q2	0	c	0	q2	-a	e	0
q3	0	0	1	q3	-2	-1	0
q4	0	0	0	q4	0	-1	2
q5	0	0	0	q5	0	0	-1

Matriz biótica (M ^{gd^s})			Vetores massa molar (MM)			
Reação	CO2	O2	MM ^{abi}	Glicose	Biomassa	Produto X
q1	0	0	MM ^{bi}	86	Y	X
q2	d	0		Acetil-CoA	NADH	ATP
q3	0	-1		1	1	1
q4	0	-1/2	MM ^{gd^s}	CO2	O2	
q5	0	0		1	1	

A partir das velocidades específicas (q), das matrizes estequiométricas (M) e dos vetores da massa molar (MM), é possível calcular as velocidades específicas líquidas (q_{liq}) das reações. As

Equações 3.5, 3.6 e 3.7 são utilizadas para calcular as velocidades líquidas das variáveis abióticas, bióticas e gasosas, respectivamente.

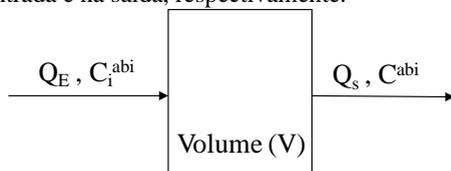
$$q_{\text{liq}}^{\text{abi}} = |M^{\text{abi}}| \cdot |MM^{\text{abi}}| \cdot q \quad (\text{II.5})$$

$$q_{\text{liq}}^{\text{bi}} = |M^{\text{bi}}| \cdot |MM^{\text{bi}}| \cdot q \quad (\text{II.6})$$

$$q_{\text{liq}}^{\text{gás}} = |M^{\text{gás}}| \cdot |MM^{\text{gás}}| \cdot q \quad (\text{II.7})$$

As velocidades líquidas são posteriormente aplicadas no sistema de equações do balanço material para o sistema reacional representado na Figura II.4.

Figura II. 4: Sistema reacional considerado para o balanço material, sendo Q_E e Q_S as vazões de entrada e de saída, C_i^{abi} e C^{abi} as concentrações dos metabólitos abióticos na entrada e na saída, respectivamente.



Variáveis abióticas, com X representado a biomassa:

$$\frac{d(V \cdot C^{\text{abi}})}{dt} = V \cdot X \cdot q_{\text{liq}}^{\text{abi}} + Q_E \cdot C_i^{\text{abi}} - Q_S \cdot C^{\text{abi}} \quad (\text{II.8})$$

Variáveis bióticas:

$$\frac{d(C^{\text{bi}})}{dt} = q_{\text{liq}}^{\text{bi}} - q_{\text{liq}}^X \cdot C^{\text{bi}} \quad (\text{II.9})$$

Variáveis gasosas:

$$\frac{d(C^{\text{gás}})}{dt} = X \cdot q_{\text{liq}}^{\text{gás}} \quad (\text{II.10})$$

Oxigênio dissolvido (O_2d), sendo O_2^{sat} a concentração de saturação de O_2 :

$$\frac{d(O_2d)}{dt} = X \cdot q_{\text{liq}}^{O_2} + k_L a (O_2^{\text{sat}} - O_2d) \quad (\text{II.11})$$

Volume:

$$\frac{dV}{dt} = Q_E - Q_S \quad (\text{II.12})$$