



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

**PRODUÇÃO DE PHB POR *Cupriavidus necator*
RECOMBINANTE EM GLICERINA E VINHAÇA**

CAROLINA ZULIAN BOEIRA

Florianópolis
2018

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

Boeira, Carolina Zulian

PRODUÇÃO DE PHB POR *Cupriavidus necator*
RECOMBINANTE EM GLICERINA E VINHAÇA / Carolina
Zulian Boeira ; orientadora, Gláucia Maria Falcão
de Aragão, coorientador, Willibaldo Schmidell Netto,
coorientadora, Kellen Zanfonato, 2018.

190 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. poli
hidroxialcanoatos. 3. *Cupriavidus necator*_glpFK. 4.
glicerina bruta. 5. vinhaça. I. Aragão, Gláucia
Maria Falcão de. II. Schmidell Netto, Willibaldo.
III. Zanfonato, Kellen IV. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos. V. Título.

Carolina Zulian Boeira

PRODUÇÃO DE PHB POR *Cupriavidus necator* RECOMBINANTE
EM GLICERINA E VINHAÇA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de mestre em Engenharia de Alimentos.

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

Coorientadores: Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto e Dr.^a Kellen Zanfonato

Florianópolis
2018

**PRODUÇÃO DE PHB POR *Cupriavidus necator*
RECOMBINANTE EM GLICERINA E VINHAÇA**

Por

Carolina Zulian Boeira

Dissertação julgada para a obtenção do Título de Mestre 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.

Prof. Bruno Augusto Mattar Carciofi, Dr.

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos

Prof.^a Gláucia M^a Falcão de Aragão, Dr.^a

Orientadora / UFSC

Prof. Willibaldo Schmidell

Netto, Dr.

Coorientador / UFSC

Kellen Zanfonato, Dr.^a

Coorientadora / UFSC

Prof.^a Patrícia Poletto, Dr.^a

UFSC

Prof.^a Jaciane Lutz Ienczak,

Dr.^a

UFSC

Florianópolis, 14 março de 2018.

Dedico esse trabalho aos meus pais Giovane e Gecilda, por serem os melhores exemplos de AMOR, dedicação e trabalho e por nunca duvidarem do meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer coisa, agradeço a **Deus** pela vida e pela saúde, para correr atrás dos meus sonhos.

À minha querida orientadora, **Prof.^a Gláucia**, agradeço pela confiança, paciência, disponibilidade e generosidade, assim como pelas críticas, correções e ideias estimulantes. Você tem o meu respeito e admiração. Muito obrigada!

Ao meu coorientador, **Prof. Willibaldo**, a quem eu admiro desde meu primeiro ano de graduação. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos comigo, pelo carinho e compreensão em todos os momentos. Sinto-me honrada de trabalhar ao seu lado. Obrigada!

À minha coorientadora e querida amiga, **Kellen**, que me ensinou com prazer e dedicação muito do que sei, sempre apostando e confiando no meu trabalho. Obrigada pelas discussões de ideias, pelas correções, pelos puxões de orelha, por impulsionar minhas decisões e me amparar nos momentos difíceis. Você é parte fundamental desse trabalho. Muito obrigada!

Às professoras e pesquisadoras que aceitaram ler, avaliar e contribuir com esta dissertação como membros da banca examinadora: **Prof^a Jaciane Ienczak** e **Prof^a Patrícia Poletto**, obrigada!

Ao **Grupo PHB**, minha Equipe de trabalho, que foi tão importante para realização deste trabalho e que me fez crescer pessoal e profissionalmente. Em especial à **Pâmela**, amiga querida, pelos ensinamentos e conselhos, por ser essa pessoa vibrante que contagia e alegra. Com certeza as noites em claro foram melhores na tua companhia. Obrigada! E aos queridos, **Hélia** e **Gabriel**, que sempre estiveram prontos a ajudar e aprender junto comigo durante essa jornada.

À minha família querida que sempre me acompanhou e torceu por mim. Aos meus pais, **Giovane** e **Gecilda**, por nunca duvidarem do meu trabalho e potencial, por entenderem minhas ausências e apoiarem todas as minhas decisões. Vocês são as pessoas mais maravilhosas que já conheci. E à minha irmã caçula, **Ana Júlia**, pela parceria, pelos conselhos, pelas brigas e por sempre estar disposta a ajudar e acolher. Muito obrigada por tudo, eu os amo incondicionalmente!

Ao meu namorado, melhor amigo e companheiro de todas as horas, **Rafael**, pelo carinho, compreensão e amor. Por ajudar a manter minha mente a salvo e, principalmente, por sempre entender e apoiar minhas escolhas profissionais. ¡Te quiero, cariño!

Aos amigos do Engebio, **Camila, Danielle, Natiele, Cíntia, Gabriela, Jefferson, Wiaslan, Denise, Andréia, Sidnei, Lindomar**, pela amizade, pelo incentivo diário, pelas risadas e por serem minha família nestes dois anos. Tenho muito orgulho de ter convivido e aprendido com cada um de vocês. Obrigada! Agradeço também aos professores e colegas do LTBR da UFSC que sempre estiveram dispostos a emprestar equipamentos e dividir ideias.

Às empresas, **Usina Iracema e Biocapital**, pelas doações das matérias-primas que foram utilizadas durante este estudo.

E por fim, agradeço ao **Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos** da UFSC, pelo acolhimento e oportunidade; e à **CAPES** pelo suporte financeiro.

*“Olhos abertos, o longe é perto.
O que vale é o sonho.”*

Sérgio Napp e Mário Barbará

RESUMO

Os poli-hidroxicanoatos (PHA), com destaque para o poli-hidroxibutirato (PHB), são biopolímeros biodegradáveis produzidos intracelularmente por diversos microrganismos. A bactéria *Cupriavidus necator* é potencial produtora de PHB, com capacidade de acumular até 90% de sua massa seca em biopolímero. Na tentativa de reduzir os custos do processo de produção de PHB, vários subprodutos agroindustriais podem ser utilizados como substratos desse bioprocessamento. Na produção de biocombustíveis, dois subprodutos se destacam: a glicerina e a vinhaça, respectivamente, gerados pelas indústrias de biodiesel e de bioetanol. Esses subprodutos podem ser utilizados como substrato por microrganismos, inclusive por *C. necator*. O baixo teor de carbono de alguns subprodutos faz com que estratégias de cultivo sejam avaliadas, quando pretende-se produzir PHB. O objetivo deste trabalho foi estudar o crescimento e a produção de PHB por *C. necator* recombinante, com glicerina e vinhaça como substratos. Duas estratégias de cultivo foram avaliadas: batelada e batelada alimentada, incluindo a combinação de substratos (vinhaça e glicerina). Os resultados demonstraram que o crescimento de *C. necator* não foi afetado pelas possíveis impurezas presentes nas gliceras (refinada e bruta) e na vinhaça. Nas gliceras, *C. necator* foi capaz de crescer com μ_{\max} de $0,10 \text{ h}^{-1}$, enquanto que, em vinhaça com μ_{\max} de $0,29 \text{ h}^{-1}$. A produção de PHB por *C. necator* recombinante em batelada foi observada nas duas gliceras em estudo. As produções finais de PHB foram de 31% e 50% com glicerina refinada e bruta, respectivamente. Os cultivos em batelada alimentada com glicerina refinada e glicerina bruta obtiveram produtividade de $0,15 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{L.h}$, com acúmulo de 52% e 43% de PHB, respectivamente. Quando vinhaça foi utilizada como único substrato, a produção de PHB foi menor que $1 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{L}$, provavelmente devido à baixa quantidade de carbono presente neste substrato. No entanto, a combinação de substratos (vinhaça e glicerina bruta) foi satisfatória, com esta estratégia, μ_{\max} de *C. necator* foi de $0,29 \text{ h}^{-1}$ com acúmulo de PHB de 64% e produtividade de $0,22 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{L.h}$. Assim, é possível afirmar que *C. necator* recombinante é capaz de crescer e produzir PHB nos principais subprodutos da indústria de biocombustíveis. O cultivo em batelada alimentada, em vinhaça combinada à glicerina bruta, apresenta melhor desempenho quanto à produtividade e acúmulo de PHB, dentre as condições estudadas.

Palavras-chave: PHB; Cupriavidus necator glpFK; glicerina bruta; glicerina refinada; vinhaça.

ABSTRACT

Poly-hydroxyalkanoates (PHA), highlighting the poly-hydroxybutyrate (PHB), are biopolymers biodegradable and produced intracellularly by several microorganisms. The bacteria *Cupriavidus necator* is a potential PHB producer, with the capacity to accumulate up to 90% of its dry mass in biopolymer. Aiming to reduce the costs of the PHB production process, several agroindustry byproducts are being used as carbon source in this bioprocess. The production of biofuels brings forth two main byproducts: glycerin and vinasse, respectively, generated by the biodiesel and bioethanol industries. These byproducts can be used as carbon source by microorganisms, including by *C. necator*. The low carbon content present in some byproducts motivates the study of different cultivation strategies, when the goal is PHB production. The aim of this work was to study the growth and PHB production by recombinant *C. necator*, using glycerin and vinasse as substrates. Two cultivation strategies were used to increase productivity of the biopolymer: batch and fed-batch; including the combination of substrates (vinasse and glycerin). The results show that *C. necator_glpFK* growth wasn't inhibited by the possible impurities present in the glycerin (refined or crude). In glycerin, *C. necator* was able to growth with μ_{\max} 0.10 h^{-1} , while, in vinasse with μ_{\max} 0.29 h^{-1} . The production of PHB by recombinant *C. necator* in batch was observed in the two glycerin evaluated. The final PHB productions were 31% and 50% with refined and crude glycerin, respectively. The fed-batch cultures in refined and crude glycerin presented a volumetric productivity of $0.15 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{L.h}$, with a PHB production of 52% and 43%, respectively. When vinasse was used, the PHB production was less than $1 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{L}$, probably due to its low carbon content. However, the combination of substrates (vinasse and crude glycerin) was satisfactory. Under its condition, μ_{\max} of *C. necator* was 0.29 h^{-1} with PHB production of 64% and productivity of $0.22 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{L.h}$. Thus, it is possible to say that recombinant *C. necator* is capable to growth and produce PHB using biofuels byproducts. The cultivation performed on fed-batch, using vinasse plus crude glycerin, presented the best productivity and accumulation of PHB, among the studied conditions.

Key-words: PHA; Cupriavidus necator_glpFK; crude glycerin; refined glycerin; vinasse.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Estrutura química geral dos PHAs.....	33
Figura 3.2. Célula bacteriana contendo PHB na forma de grânulos vistos por microscopia eletrônica de transmitância (MET).....	36
Figura 3.3. Via metabólica simplificada da produção de PHB em <i>C.necator</i>	40
Figura 3.4. Representação do metabolismo de <i>C.necator</i> para produção de PHB e crescimento celular tendo glicerol como fonte de carbono... ..	42
Figura 3.5. Estrutura química da molécula de glicerol.....	49
Figura 3.6. Reação de transesterificação para produção de biodiesel ..	49
Figura 3.7. Fluxograma do processo de tratamento da glicerina bruta originária da produção de biodiesel.....	51
Figura 4 1. Representação da metodologia utilizada para realização dos cultivos	57
Figura 4 2. Detalhamento dos cultivos realizados em agitador orbital	59
Figura 4 3. Esquema ilustrativo dos cultivos realizados em biorreator	60
Figura 5.1. Cultivos de <i>C. necator_glpFK</i> em (A) vinhaça, (B) glicerol, (C) glicerina refinada e (D) glicerina bruta em agitador orbital; glicerol (□), ART (x) e biomassa total (Xt) (●).....	70
Figura 5.2. Cultivo de <i>C. necator_glpFK</i> em vinhaça, em batelada. (A) biomassa total (Xt) (●), biomassa residual (Xr) (-) e PHB (◇); (B) concentração de glicerol (□), de nitrogênio (Δ) e de ART (x)	74
Figura 5.3. Cultivo de <i>C. necator_glpFK</i> em glicerina refinada, em batelada. (A) biomassa total (Xt) (●), biomassa residual (Xr) (-) e PHB (◇); (B) concentração de glicerol (□) e de nitrogênio (Δ).....	77
Figura 5.4. Cultivo de <i>C. necator_glpFK</i> em glicerina bruta, em batelada. (A) biomassa total (Xt) (●), biomassa residual (Xr) (-) e PHB (◇); (B) concentração de glicerol (□) e de nitrogênio (Δ).....	79
Figura 5.5. Velocidade específica de produção de PHB (qP) em função do tempo para os cultivos em batelada com (A) glicerina refinada e (B) glicerina bruta durante a fase de produção	83

Figura 5.6. Cultivo de <i>C. necator_glpFK</i> em glicerina refinada, em batelada alimentada. (A) biomassa total (Xt) (●), biomassa residual (Xr) (-), PHB (◇) e proteína intracelular (+); (B) concentração de glicerol (□) e de nitrogênio (Δ)	86
Figura 5.7. Correlação entra a proteína intracelular e a biomassa residual (Xr) durante o cultivos de <i>C. necator_glpFK</i> em glicerina em batelada alimentada, a seta indica o início da fase de produção	89
Figura 5.8. Cultivo de <i>C. necator_glpFK</i> em glicerina bruta, em batelada alimentada. (A) biomassa total (Xt) (●), biomassa residual (Xr) (-), PHB (---) e proteína intracelular (+); (B) concentração de glicerol (□) e de nitrogênio (Δ)	90
Figura 5.9. Cultivo de <i>C. necator_glpFK</i> em vinhaça e glicerina bruta, em batelada alimentada. (A) biomassa total (Xt) (●), biomassa residual (Xr) (-), PHB (◇) e proteína intracelular (+); (B) concentração de glicerol (□), de nitrogênio (Δ) e de ART (x).....	94
Figura 5 10. Correlação entra a proteína intracelular e a biomassa residual (Xr) durante o cultivos de <i>C. necator_glpFK</i> em vinhaça e glicerina em batelada alimentada, a linha pontilhada indica o início da fase de produção (FP) e final da fase de crescimento (FC).....	96
Figura 5 11. Velocidade específica de produção de PHB (qP) em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada com (A) glicerina refinada, (B) glicerina bruta e (C) vinhaça e glicerina bruta durante a fase de produção.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Composição química média da vinhaça de melão de cana-de-açúcar	46
Tabela 5.2 Componentes da vinhaça de cana-de-açúcar utilizada nesse trabalho.....	68
Tabela 5.3 Quantidade de glicerol e demanda química de oxigênio (DQO) das amostras de glicerol e glicerinas utilizadas nesse trabalho.	69
Tabela 5.4. Valores de velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), fatores de conversão de glicerol em biomassa residual ($Y_{Xr/\text{Glicerol}}$) e de glicerol em PHB ($Y_{\text{PHB}/\text{Glicerol}}$), produtividade (Q), produtividade em biomassa (Q_X), produtividade na fase de produção (Q_P) e velocidade específica máxima de formação de PHB (qP_{\max}), para os cultivos realizados com <i>C. necator_glpFK</i>	101

NOMENCLATURA E ABREVIACÕES

ATP	Adenosina trifosfato
Ca	Concentração de cálcio total (mg/L)
CoA	Coenzima A
CoASH	Coenzima A não ligada a um grupo acil
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DQO	Demanda química de oxigênio (g/L)
ED	Entner-Doudorrof
FAD	Flavina adenina dinucleotídio (forma oxidada)
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídio (forma reduzida)
FC	Fase de crescimento
FP	Fase de produção
GlpF	Aquaporina
<i>glpF</i>	Gene que codifica a aquaporina
GlpK	Enzima glicerol quinase
<i>glpK</i>	Gene que codifica a enzima glicerol quinase
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
MM	Meio mineral
MONG	Material orgânico não glicerol
N	Nitrogênio
Na	Concentração de sódio total (mg/L)
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma

	oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NB	Meio de cultura <i>Nutrient broth</i>
PEP	Fosfoenolpiruvato
PHA	Poli-hidroxiálcanoato
PHB	Poli-hidroxi-butilato
PP	Polipropileno
Prod	Produtividade
Prod_P	Produtividade em produto (PHB)
Prod_X	Produtividade em biomassa
qP	Velocidade específica de produção de PHB ($g_{PHB}/g_{Xr}.h$)
qP _{max}	Velocidade específica máxima de produção de PHB ($g_{PHB}/g_{Xr}.h$)
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
Xr	Concentração de biomassa residual (g/L)
Xt	Concentração de biomassa total (g/L)
Y _{PHB/Glicerol}	Fator de conversão de glicerol em PHB ($g_{PHB}/g_{glicerol}$)
Y _{Xr/Glicerol}	Fator de conversão de glicerol em biomassa residual ($g_{Xr}/g_{glicerol}$)
μXr	Velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
μXrmax	Velocidade específica máxima de crescimento celular em relação a Xr (h^{-1})
μXtmax	Velocidade específica máxima de crescimento celular em

relação a X_t (h^{-1})

3HH

3-hidroxiheptanoato (unidade monomérica)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	27
2.	OBJETIVOS.....	31
2.1	OBJETIVO GERAL.....	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
3.1	POLI-HIDROXIALCANOATOS (PHAs).....	33
3.1.1	Poli-hidroxibutirato (PHB).....	34
3.2	MICROORGANISMOS PRODUTORES DE PHB	35
3.2.1	<i>Cupriavidus necator</i>	36
3.2.2	Microrganismos recombinantes.....	37
3.3.	METABOLISMO DE PRODUÇÃO DE PHB EM <i>C. necator</i>	39
3.3.1	Metabolismo de produção de PHB em <i>C. necator</i> em glicerol.....	41
3.4	BIOCOMBUSTÍVEIS E SEUS SUBPRODUTOS.....	44
3.4.1	Vinhaça.....	45
3.4.2	Glicerina	48
3.5	ESTRATÉGIA DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE PHB	52
4.	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1	FONTES DE CARBONO	55
4.1.1	Caracterização das fontes de carbono.....	55
4.1.2	Preparo das fontes de carbono	56
4.2	MICROORGANISMO.....	56
4.3	MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	57
4.3.1	Comparação do crescimento celular.....	58
4.3.2	Crescimento celular e produção de PHB	59
4.4	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	61
4.4.1	Amostragem	61
4.4.2	Concentração celular	62
4.4.3	Concentração de açúcares redutores totais, glicerol e nitrogênio	62
4.4.4	Concentração de PHB	63

4.4.5	Concentração de proteína intracelular	63
4.5	TRATAMENTO DOS DADOS	64
4.5.1	Velocidades específicas de crescimento celular e produção de PHB.....	65
4.5.2	Produtividade (Q), produtividade na fase de produção de PHB (Q _p) e produtividade em biomassa (Q _x)	65
4.5.4	Fatores de conversão.....	66
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS: VINHAÇA, GLICERINA REFINADA E GLICERINA BRUTA E COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>C. necator_glpFK</i> NESSES SUBSTRATOS EM AGITADOR ORBITAL	67
5.3	PRODUÇÃO DE PHB POR <i>C. necator_glpFK</i> EM BATELADA COM VINHAÇA, GLICERINA REFINADA E GLICERINA BRUTA EM BIORREATOR.....	73
5.4	PRODUÇÃO DE PHB POR <i>C. necator_glpFK</i> EM BATELADA ALIMENTADA COM OS SUBPRODUTOS EM ESTUDO	85
6.	CONCLUSÃO	104
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	106
	REFERÊNCIAS	108
	APÊNDICE	124

1. INTRODUÇÃO

A utilização de biopolímeros biodegradáveis é uma forma de diminuição da poluição ambiental, uma vez que, os plásticos de origem petroquímica geram impactos ambientais negativos. O poli-hidroxitirato (PHB) é um biopolímero de origem microbiana, biodegradável com propriedades similares ao polipropileno (PP), polímero de origem petroquímica (RAZA; ABID; BANAT, 2018). Dentre os microrganismos produtores de PHB destaca-se a bactéria *Cupriavidus necator* que tem a capacidade de acumular até 90% de sua massa seca em biopolímero (OBRUCA et al., 2014).

Os custos de obtenção dos plásticos petroquímicos ainda tornam a produção dos biopolímeros economicamente desfavorável. As análises de custos do processo de produção de PHB indicam que a fonte de carbono utilizada é responsável por, aproximadamente, 40% dos custos de produção deste biopolímero (NARANJO et al. 2013). A busca por substratos de baixo custo, para produção de PHB, é uma possibilidade amplamente avaliada na literatura.

Nessa temática, o Brasil é um dos maiores produtores de biocombustíveis, tendo como principais subprodutos a vinhaça e a glicerina, provenientes da indústria do etanol e do biodiesel, respectivamente. O governo brasileiro através de leis federais e programas como o RenovaBio (2017) incentiva a produção e a utilização dos biocombustíveis no país. Estima-se que, em 2022, a adição de etanol à gasolina será de 30% e de biodiesel ao óleo diesel combustível de 15%. Em 2017, estas misturas foram de 27% e 8%, respectivamente (GOMES, 2017).

O aumento da produção de biocombustíveis leva à maior geração de seus subprodutos e consequentemente a problemas relacionados aos seus destinos. A glicerina tem como principal componente o glicerol em porcentagens que podem variar de 60 a 99% (QUISPE; CORONADO; CARVALHO, 2013). A vinhaça proveniente da produção de etanol de primeira geração, por sua vez, tem como principais componentes o glicerol e ácidos orgânicos voláteis (ROBLES-GONZÁLEZ et al., 2012).

A Agência Nacional de Petróleo, Gás-Natural e Biocombustíveis (ANP, 2017) divulgou que a produção brasileira de etanol biocombustível e biodiesel em 2017 foi de 27,4 milhões m³ e 3,9

milhões m³, respectivamente. Essa produção gerou cerca de 324 milhões m³ vinhaça e 390.000 m³ de glicerina.

A fertirrigação de lavouras de cana-de-açúcar ainda é o principal destino dado à vinhaça. Estudos ambientais contestam essa prática por gerar problemas como a lixiviação de metais para águas subterrâneas e mudanças na qualidade do solo devido ao desequilíbrio de nutrientes (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). A utilização da vinhaça como fonte de carbono por microrganismos pode ser viável, visto que ela possui composição orgânica variada, é abundante e de baixo custo.

A glicerina possui mercado consumidor amplo, sendo utilizada principalmente nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e alimentícias. Contudo, os mercados consumidores desse subproduto encontram-se em vias de saturação devido à alta geração de glicerina residual do biodiesel. Como forma de atrair o consumo e aumentar o valor agregado da glicerina algumas indústrias de biodiesel realizam tratamento prévio desse subproduto. Dentre os tipos de glicerinias mais comumente comercializadas estão a glicerina bruta (80 a 85% de glicerol) e a glicerina refinada (95 a 99% de glicerol) (MENDES; VALDÉS, 2012), industrialmente também denominadas como glicerina loira e bidestilada, respectivamente.

O Grupo de Pesquisa em PHB, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, desenvolve trabalhos com produção e extração de biopolímeros há mais de 15 anos. Recentemente, foi construída uma cepa de *C. necator* recombinante (*C. necator_glpFK*) capaz de utilizar glicerol, mais eficientemente que a cepa parental *C. necator* DSM 545 (ZANFONATO, 2016). A avaliação dessa cepa em glicerinias provenientes do biodiesel ainda não está reportada na literatura.

A vinhaça foi avaliada como substrato para produção de PHB. Em função de sua baixa concentração de carbono, não são alcançadas altas concentrações de PHB por *C. necator* somente com vinhaça. No entanto, a velocidade específica de crescimento do microrganismo em vinhaça apresenta valores próximos aos obtidos com glicose (ZANFONATO, 2016). Demonstrando que, a combinação de vinhaça a outro substrato, com maior concentração de carbono, pode gerar bons resultados na produção de PHB.

Nesse sentido, o aproveitamento dos subprodutos glicerina e vinhaça, para a produção de PHB, pode ser uma alternativa promissora. Além disso, a utilização de microrganismo geneticamente modificado

associada com estratégia de cultivo adequada pode ser avaliada, a fim de aperfeiçoar a produção de PHB nestes subprodutos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi estudar a produção de poli-hidroxibutirato por *Cupriavidus necator* recombinante, com a utilização de glicerina e vinhaça como substratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a vinhaça (proveniente da produção de etanol) quanto à composição de sais e DQO, e as gliceras refinada e bruta (provenientes da produção do biodiesel) quanto à DQO;
- Comparar o crescimento celular de *C. necator_glpFK* em meio de cultivo contendo glicerol, glicerina refinada, glicerina bruta ou vinhaça;
- Estudar o crescimento celular e a produção de PHB por *C. necator_glpFK*, com vinhaça, glicerina refinada e glicerina bruta em cultivos conduzidos em batelada e batelada alimentada.

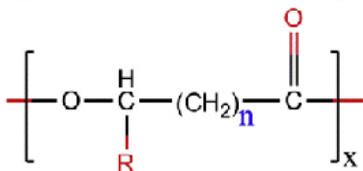
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 POLI-HIDROXIALCANOATOS (PHAs)

Os poli-hidroxicanoatos (PHAs) são uma classe de poliésteres naturais compostos por monômeros de hidroxiácidos conectados por ligações tipo éster, são insolúveis em água, biodegradáveis e de origem renovável (KOURMENTZA et al., 2017; LEE, 1996)

Os PHAs têm origem microbiana, principalmente, e podem ser encontrados em algumas algas também. Os PHAs bacterianos são sintetizados intracelularmente e armazenados na forma de grânulos, podendo representar até 90% da massa seca da célula. Sua composição depende tanto do microrganismo utilizado, quanto da natureza da fonte de carbono (OBRUCA et al., 2014; BASSAS et al., 2006). A Figura 3.1 mostra a estrutura química principal dos PHAs.

Figura 3.1. Estrutura química geral dos PHAs



Fonte: LEE, 1996.

Na Figura 3.1, as letras n , R e x representam, respectivamente, o número de carbonos que compõe a cadeia principal do monômero, o radical que compõe na cadeia lateral e o número de vezes que esse monômero é repetido para formação do PHA. A unidade monomérica principal dos PHAs pode ser repetida de 100 a 30.000 vezes (SURIYAMONGKOL et al., 2007).

A classificação dos PHAs é realizada de acordo com o número de carbonos que constitui sua cadeia principal (n) (Figura 3.1). Dessa forma são classificados em: PHAs de cadeia curta (*scl*-PHAs, do inglês *short-chain-length PHA*) que apresentam de 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal; e PHAs de cadeia média (*mcl*-PHAs) que possuem de 6 a 14 átomos de carbonos (MADISON; HUISMAN, 1999).

Mais de 150 unidades monoméricas diferentes já foram identificadas como possíveis substratos da enzima PHA sintase, enzima

chave na biossíntese destes biopolímeros. Portanto, existe uma variedade muito grande quanto à composição destes biopolímeros. Os PHAs que apresentam cadeia carbônica formada por repetições de uma única unidade monomérica são conhecidos como homopolímeros, enquanto que aqueles formados por repetições de duas ou mais unidades monoméricas são ditos como copolímeros. O PHB e o poli(3-hidroxiбутирато-*co*-hidroxivaletarato) (PHB-*co*-HV) são exemplo de homopolímero e copolímero, respectivamente (RAZA; ABID; BANAT, 2018).

Considerado um dos polímeros verdes do futuro, é esperado que os PHAs, juntamente com o poliácido láctico (PLA) e polisuccinato de butileno (PBS), substituam gradualmente os plásticos convencionais (KOURMENTZA et al., 2017). Uma vez que, as ferramentas de avaliação ambiental mostraram que os PHA podem contribuir para metas de redução de emissões de gases de efeito estufa, redução de resíduos, além de proporcionar inovações no setor biotecnológico (DIETRICH et al., 2017).

Provavelmente um dos maiores entraves para a maior produção e utilização dos PHA sejam os custos de produção e extração desses biopolímeros. Enquanto os plásticos petroquímicos, como polipropileno (PP) e polietileno (PE), apresentam custos entre U\$ 0,60 – 0,87 por quilo de polímero, o quilo do PHA fica entre U\$ 2,25 – 2,75, cerca de 4 vezes maior (RAZA; ABID; BANAT, 2018).

O preço do biopolímero depende basicamente do custo do substrato, rendimento de PHA no substrato, do microrganismo produtor e da eficiência de recuperação e purificação do produto (DIETRICH, et al. 2017). Do custo total do processo de produção de PHA, estima-se que 50% são gastos com a etapa de produção e os outros 50% na fase a extração do biopolímero. Dos 50% gastos com o processo de produção do biopolímero entre 25 e 40% pode-se atribuir ao substrato utilizado nesse bioprocessos (NARANJO et al. 2013).

3.1.1 Poli-hidroxiбутирато (PHB)

O poli-hidroxiбутирато (PHB) foi o primeiro PHA a ser descoberto e é o biopolímero mais conhecido e estudado. O PHB é um homopolímero com quatro átomos de carbono na cadeia principal e que o radical (R) é um metil (CH₃). Esse biopolímero tem atraído a atenção por apresentar propriedades físicas semelhantes às do polipropileno (PP), plástico de origem petroquímica (PEÑA et al., 2014).

O PHB pode apresentar massa molecular variável entre 10^4 a 10^6 Da, dependendo do microrganismo e das condições de cultivo em que foi produzido. Quanto à cristalinidade é um polímero semicristalino, apresentando grau de cristalinidade variável entre 55 e 80% (LEE, 1996). O processo de cristalização pode afetar as propriedades térmicas e mecânicas do PHB, bem como sua biodegradabilidade (PAN; INOUE, 2009). Como característica indesejável, o PHB apresenta alta rigidez o que o torna muito quebradiço e inviabiliza algumas aplicabilidades desse biopolímero. Alternativamente são produzidas blendas com PHB e outros polímeros obtendo-se materiais mais maleáveis que possuem maior aplicabilidade (RAZA; ABID; BANAT, 2018).

Dentre as principais características do PHB destaca-se a termoplaticidade, resistência á mistura, pureza óptica, boa estabilidade frente à radiação ultravioleta, barreira à permeabilidade de gases, biocompatibilidade e alta regularidade da cadeia carbônica. Porém, provavelmente a maior qualidade desse biopolímero seja sua biodegradabilidade. Em condições adequadas de temperatura e umidade, a cadeia polimérica do PHB pode ser totalmente degradada a dióxido de carbono (CO_2) e água (MACHADO et al., 2010).

As características do PHB como material polimérico proporcionam a ele uma variedade de aplicações. O PHB e seus copolímeros podem ser utilizados em embalagens de alimentos (sacolas, garrafas, copos descartáveis), embalagens de cosméticos e em uma diversidade de utensílios descartáveis (canetas, pentes, lâminas de barbear, copos descartáveis) (REDDY et al., 2003).

Em função de sua biocompatibilidade e não toxicidade, uma vez que não são geradas substâncias tóxicas quando se decompõe, o PHB pode ser utilizado como material biomédico. Na engenharia de tecidos, pode ser aplicado como matriz para crescimento de células animais. Na forma de blendas ou copolímeros, pode ser utilizado na fabricação de próteses, de fios de sutura e na formulação de cápsulas para liberação controlada de fármacos (REDDY et al., 2003; DIETRICH, et al. 2017).

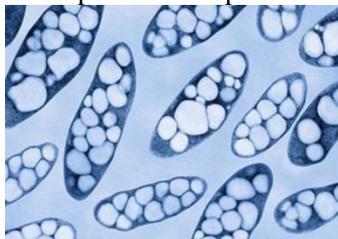
3.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE PHB

Assim como os demais PHA, o PHB bacteriano é sintetizado intracelularmente, na forma de grânulos de reserva de energia. Na Figura 3.2 observa-se a microscopia eletrônica de uma célula bacteriana contendo grânulos de PHB.

Existem mais de 300 espécies de bactérias com capacidade de síntese do PHB. Dentre essas foram identificadas cepas que necessitam

da limitação de algum nutriente essencial ao seu crescimento para acúmulo do biopolímero e outras que não necessitam de limitação de nutriente, produzindo PHB durante a fase de crescimento (SILVA et al, 2007).

Figura 3.2. Célula bacteriana contendo PHB na forma de grânulos vistos por microscopia eletrônica de transmitância (MET)



Fonte: SILVA et al, 2007.

Somente algumas das bactérias identificadas como produtoras foram estudadas e efetivamente empregadas na produção de PHA. Incluem-se neste grupo *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans* e, recentemente, as versões recombinantes de *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* e *Burkholderia sacchari* (PEÑA et al., 2014).

3.2.1 *Cupriavidus necator*

Cupriavidus necator, inicialmente denominada como *Alcaligenes eutropha*, *Ralstonia eutropha* e *Wautersia eutropha*, é um microrganismo procariótica, Gram-negativa, que pode ser encontrada naturalmente no solo e na água. Apresenta-se na forma de bastonetes com diâmetro médio de 0,5 μm e comprimento entre 1,8 e 2,6 μm . É uma bactéria aeróbia, com metabolismo respiratório no qual o oxigênio e o nitrato podem servir de receptor final de elétrons na cadeia respiratória.

A produção de PHB com *C. necator* ocorre geralmente por processo composto por duas etapas. Na primeira etapa, ocorre o crescimento celular em meio rico em nutrientes. Na segunda etapa, devido à limitação de nitrogênio, ou outro nutriente essencial do meio (P, Mg ou O) e excesso da fonte de carbono, ocorre o acúmulo de

polímero. A produtividade em polímero pode ser melhorada aumentando a concentração de células, o conteúdo de polímeros dentro das células e/ou diminuindo o tempo de cultivo. O tempo de cultivo corresponde ao tempo gasto nas duas etapas, crescimento e produção (SILVA et al., 2007).

A bactéria *C. necator* é capaz de metabolizar uma variedade de fontes de carbono como ácidos orgânicos, resíduos agroindustriais e de biodiesel, óleos vegetais e dióxido de carbono. Dependendo da fonte de carbono, *C. necator* podem sintetizar homopolímeros ou heteropolímeros, como PHB e PHB-*co*-HV. O PHB-*co*-HV é sintetizado pela bactéria em meio contendo uma fonte de carbono, como glicose ou frutose, e um co-substrato como o ácido propiônico (SURIYAMONGKOL et al., 2007).

Dentre os substratos de baixo custo consumidos por *C. necator*, podem-se destacar melação de cana-de-açúcar (KULPREECHA et al., 2009), soro de leite (MARANGONI; FURIGO; ARAGÃO, 2000), hidrolisado de amido (DALCANTON et al., 2010), melação cítrica (ARAGÃO et al., 2009), glicerol (CAVALHEIRO et al., 2009), vinhaça (ZANFONATO, et al., 2014), entre outros. O substrato utilizado é decisivo para definir a velocidade específica de crescimento do microrganismo, a produtividade em polímero, os fatores de conversão de substrato em PHB e, conseqüentemente, os custos de produção do biopolímero.

C. necator tornou-se um microrganismo modelo para a biossíntese de PHB por apresentar grande quantidade de informações acerca de sua genética e por conseguir acumular até 90% de sua massa seca em PHB. Dada à sua habilidade de utilizar uma ampla variedade de fontes de carbono, essa bactéria é um organismo que apresenta grande potencial para aplicação industrial na produção de PHA (LUENGO et al., 2003; OBRUCA et al., 2014).

3.2.2 Microrganismos recombinantes

O estudo para desenvolvimento de bactérias recombinantes que produzem PHA pode ser dividido em três abordagens principais. Na primeira, os genes de biossíntese de PHA são introduzidos em bactérias não produtoras, mas capazes de utilizar eficientemente um substrato desejado. Na segunda, os genes de utilização do substrato desejado podem ser introduzidos em bactérias produtoras de PHA. E uma terceira abordagem é realizada quando ocorre a troca de genes entre bactérias produtoras de PHA visando à obtenção de um PHA específico ou com

características desejáveis (REDDY et al., 2003). As bactérias mais comumente usadas como hospedeiras nessas transformações são *C. necator*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas oleovorans* e *Escherichia coli* (WANG; LEE, 1998).

A fim de tornar um microrganismo não produtor de PHA em produtor algumas características do microrganismo hospedeiro (que será transformado) devem ser avaliadas. Em geral são procurados microrganismos que facilitem a produção de PHA. Nesse sentido, *E. coli* ganha destaque como potencial hospedeiro dos genes de produção de PHA. Pois, além de ter o genoma bastante conhecido, esta bactéria apresenta facilidade de crescimento com alta velocidade e membrana celular de fácil lise. Estas duas características são procuradas na produção de PHA, a primeira porque pode aumentar as produtividades e a segunda porque, no processo de extração do PHA, é necessária a lise celular (SURIYAMONGKOL et al., 2007).

A inserção dos genes de síntese de PHA (*operon phaABC*) de *C. necator* foi realizada em *E. coli* transformando essa bactéria em produtora de PHA. Resultados de até 90% de acúmulo de PHA em massa seca já foram obtidos por *E. coli* recombinante. Contudo, foram encontrados problemas de estabilidade das cepas transformadas; em geral os PHA produzidos apresentam menor massa molecular e, durante cultivos em alta concentração celular, a manutenção da demanda de oxigênio é dificultada (WANG; LEE, 1998; SURIYAMONGKOL et al., 2007).

Melhoria na produção de PHA pode ser alcançada pela inserção de genes de interesse em bactérias já produtoras de biopolímero. Zanfonatto (2016) construiu a cepa *C. necator_glpFK* pela inserção dos genes *glpF* e *glpK* na cepa *C. necator* DSM 545. Esse estudo teve como objetivo a construção de uma cepa com melhor consumo de glicerol. Os genes inseridos (*glpF* e *glpK*) foram retirados de uma linhagem de *E. coli* e são responsáveis pelo transporte e fosforilação do glicerol no interior da célula bacteriana, respectivamente.

Budde e colaboradores (2011) construíram *C. necator* Re2058 / pCB113 pela inserção de dois genes: um que codifica a enzima PHA sintase da bactéria *Rhodococcus aetherivorans*; e outro que codifica a enoil-CoA hidrolase da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Essas duas enzimas fazem com que o acúmulo de PHB-co-HH da cepa geneticamente modificada tenha uma maior proporção do monômero 3-hidroxihexanoato (3HH) quando óleos vegetais são utilizados como

fonte de carbono. Essa maior proporção de 3HH altera positivamente as características e aplicabilidade de copolímero.

Sendo assim, a utilização da engenharia genética é uma alternativa na resolução de problemas encontrados durante o processo de produção de PHA e tornou-se uma aliada na busca por um processo mais rentável.

3.3. METABOLISMO DE PRODUÇÃO DE PHB EM *C. necator*

O conhecimento das vias bioquímicas e enzimas envolvidas na biossíntese e degradação do PHA tornou-se ferramenta importante tanto no controle de processo, como na aplicação da engenharia genética. A biossíntese de PHB está amplamente descrita na literatura principalmente em *C. necator*, em que as rotas metabólicas, e as respectivas enzimas e genes envolvidos, estão bem caracterizados e definidos (STUBBE et al., 2005).

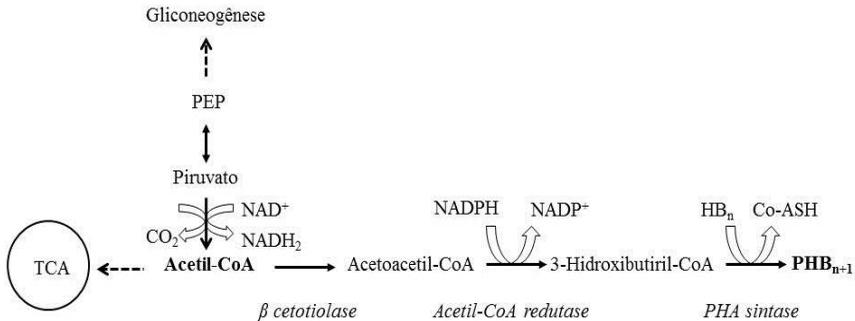
C. necator cataboliza os carboidratos a piruvato, pela via de Entner-Doudoroff (ED), uma das rotas metabólicas da gliconeogênese. O piruvato é então desidrogenado a acetil-CoA, por ação da enzima piruvato desidrogenase. Durante a fase de crescimento celular (sem limitação nutricional), o metabolismo microbiano requer muita energia o que direciona o acetil-CoA para o ciclo do ácido tricarbóxico (TCA). No TCA, o acetil-CoA é oxidado a CO₂ e gera energia em forma de ATP, NADH, NADPH, FADH₂ e precursores biossintéticos. Esta energia gerada, na forma de cofatores e precursores biossintéticos, é utilizada na síntese de proteínas aumentando a biomassa celular (IENCZAK; ARAGÃO, 2011).

Em situação de limitação nutricional, como limitação de nitrogênio, a síntese de proteínas é cessada, provocando elevação nas concentrações intracelular de NADH e NADPH. O aumento de NADH e NADPH inibe a atividade das enzimas reguladoras do TCA e, conseqüentemente, ocorre a redução do TCA. Quando a fonte de carbono (carboidratos) está em excesso, as células da bactéria continuam catabolizando os carboidratos a acetil-CoA mesmo com a atividade do TCA reduzida. O acetil-CoA é então direcionado à via de biossíntese de PHB (HAYWOOD; ANDERSON; DAWES, 1989).

Em *C. necator*, os genes *phbA*, *phbB*, *phbC* codificam as enzimas β-cetotiolase (PhbA), acetoacetil-CoA redutase (PhbB) e PHA sintase (PhbC), respectivamente. Estas três enzimas catalisam as três principais reações de síntese do PHB (MADISON; HUISMAN, 1999). Na Figura

3.3 está demonstrada de forma simplificada as principais reações metabólicas envolvidas na síntese do PHB.

Figura 3.3. Via metabólica simplificada da produção de PHB em *C.necator*



Fonte: Adaptado de MADISON; HUISMAN, 1999.

A partir do acetil-CoA, três etapas de reações enzimáticas ocorrem até a produção do PHB (Figura 3.3). A primeira etapa consiste na ligação de duas moléculas de acetil-CoA formando uma molécula de acetoacetil-CoA, reação catalisada pela enzima β -cetotiolase. Na segunda etapa, a enzima acetoacetil-CoA redutase provoca a redução do acetoacetil-CoA a 3-hidroxiabutiril-CoA. A atividade da acetoacetil-CoA redutase determina a velocidade específica de formação do biopolímero. Por fim, a enzima PHA sintase realiza a conversão do 3-hidroxiabutiril-CoA em PHB (HAYWOOD; ANDERSON; DAWES, 1989; MADISON; HUISMAN, 1999).

Uma vez que o PHB é acumulado em grânulos no interior da bactéria, já foram identificadas proteínas associadas aos grânulos de PHB, como as fasinas que, indiretamente, facilitam a produção e acúmulo do polímero. As fasinas são proteínas especificamente ligadas aos grânulos do polímero, que facilitam a síntese de PHB e controlam o tamanho dos grânulos. Na ausência das fasinas, as células acumulam o PHA produzido em um grande e único grânulo, ocupando todo espaço disponível na célula (IENCZAK; ARAGÃO, 2011).

Ainda não se tem total entendimento de como atuam as enzimas de despolimerização do PHB. Sabe-se que, quando o microrganismo se encontra em estado de necessidade energética, ocorre a degradação do polímero para liberação de energia (acetil-CoA) possibilitando a sobrevivência no microrganismo. No entanto, algumas das enzimas de

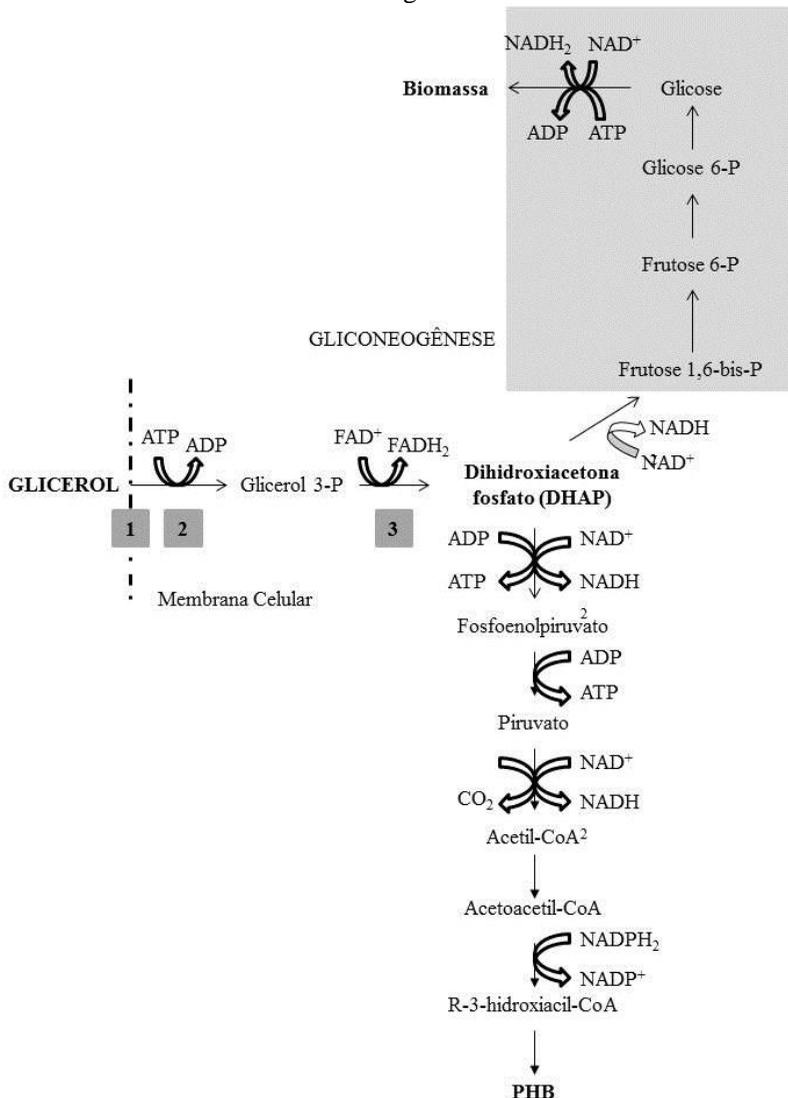
despolimerização também desenvolvem papel importante na produção de PHA, regulando tanto a massa molar como o rendimento final no polímero (LUENGO et al., 2003).

3.3.1 Metabolismo de produção de PHB em *C. necator* em glicerol

Diferentemente da biossíntese de PHB em algumas fontes de carbono, como glicose, que estão amplamente reportadas na literatura, a biossíntese de PHB em glicerol ainda não está claramente elucidada. Em muitos casos, a comparação entre o metabolismo em glicose (fonte preferencial da *C. necator*) com o metabolismo em glicerol se faz necessário para um melhor entendimento.

Os microrganismos são capazes de metabolizar o glicerol como fonte de carbono através das vias de degradação de açúcares, porém ele precisa ser fosforilado e oxidado a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) primeiramente (TANADCHANGSAENG; YU, 2012). Na Figura 3.4 está apresentado o metabolismo geral da produção de PHB em *C. necator* tendo glicerol como única fonte de carbono. Nessa figura pode ser evidenciado que a síntese de PHB a partir de acetyl-CoA possui a mesma rota já demonstrada anteriormente (Figura 3.3).

Figura 3.4. Representação do metabolismo de *C.necator* para produção de PHB e crescimento celular tendo glicerol como fonte de carbono



Fonte: Adaptado de TANADCHANGSAENG; YU (2012).

Após a entrada do glicerol na célula (reação 1 indicada na Figura 3.4), duas reações enzimáticas levam à obtenção de DHAP. Na primeira

reação (reação 2 – Figura 3.4), a enzima glicerol quinase realiza a fosforilação do glicerol a glicerol 3-fosfato. O glicerol 3-fosfato é então convertido a DHAP pela enzima glicerol-3-fosfato dehidrogenase (reação 3 – Figura 3.4) (KOLLER; MARSALEK, 2015). DHAP é um intermediário glicolítico e pode ser introduzida à gliconeogênese ou ser levada à produção de PHB.

A gliconeogênese (mostrada na Figura 3.4 em quadro cinza) é a formação de glicose a partir de precursores como acetato, lactato, malato e o glicerol. Este processo fornece os carboidratos necessários para biossíntese de ácidos nucleicos e outros compostos celulares. Esta via metabólica é parte essencial para a principal via metabólica de utilização de glicerol por microrganismos. Em adição a isso, parte da DHAP formada é levada à via de produção de PHB: o glicerol convertido DHAP é convertido primeiramente a fosfoenolpiruvato (PEP) e então a piruvato via enzimas glicolíticas. Estes passos completam a via EMP (Embden Meyerhof-Parnas) para sintetizar PHB (TANADCHANGSAENG; YU, 2012).

Estudos apontam dois principais entraves metabólicos para a produção de PHB em glicerol. O primeiro é que a velocidade específica de crescimento de *C. necator* é menor em glicerol ($0,17 \text{ h}^{-1}$) (ZANFONATO, 2016), que em glicose ($0,26 \text{ h}^{-1}$) (IENCZAK et al., 2011) e o crescimento em glicerol usualmente ocorre muito lentamente em cultivos com composição de meio e condições de cultivo semelhantes.

O segundo é de que as produtividades e fatores de conversão de glicerol em PHA são menores do que em glicose (ŠPOLJARIĆ et al., 2013). Cavalheiro e colaboradores (2009) reportam fator de conversão de glicerol em PHB próximo a $0,35 \text{ g/g}$. Ao passo que, Yamane (1993) reportou fator de conversão de glicose em PHB de $0,48 \text{ g/g}$.

Lopar e colaboradores (2014) realizaram estudos *in silico* para analisar o metabolismo de glicerol por *C. necator* e evidenciam que resultados similares aos obtidos experimentalmente com glicose podem ser alcançados em glicerol, desde que não haja limitações no transporte do glicerol (reação 1 – Figura 3.4), na fosforilação do glicerol (reação 2 – Figura 3.4) e dehidrogenação do glicerol 3-fosfato (reação 3 – Figura 3.4).

Nesse sentido, algumas cepas de *C. necator* recombinantes foram construídas na tentativa de viabilizar a produção de PHB em glicerol empregando a melhoria nos genes *glpF*, *glpK* e *glpD*. Estes genes codificam, respectivamente, proteína/aquaporina de transporte do

glicerol para o interior da célula; a enzima glicerol quinase e a enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase (LOPAR et al., 2014).

Fukui e colaboradores (2014) transformaram *C. necator* H16 com os genes de *E. coli*. Os genes foram inseridos tanto separadamente (*glpF* ou *glpK*) como juntos (*glpFK*). Ambos os ensaios geraram cepas com maior velocidade de crescimento que a parental e possibilitaram o acúmulo de PHB. Zanfonato (2016) também realizou inserção dos genes *glpF* e *glpK* derivados de *E.coli* a cepa *C. necator* DSM. A cepa *C. necator_glpFK* apresentou velocidade específica de crescimento maior do que a parental, 0,17 e 0,10 h⁻¹, porém a produtividades de PHB foram iguais para as duas cepas (0,15 g/L.h). Porém, estudos de otimização da produção de PHB com glicerol utilizando estas cepas recombinantes ainda não foram reportados.

3.4 BIOCOMBUSTÍVEIS E SEUS SUBPRODUTOS

A busca por soluções alternativas ao petróleo e seus derivados, aliada à preocupação com a poluição ambiental, reforçam cada vez mais a importância da produção dos biocombustíveis. Os biocombustíveis são derivados de biomassa que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural (LEITE; LEAL, 2007).

Estes combustíveis renováveis são pesquisados desde o início do século XX, principalmente na Europa. No entanto, foi na década de 70, após a primeira crise do petróleo, que a produção e uso dos biocombustíveis ganharam destaque no Brasil (LEITE; LEAL, 2007). Inicialmente o uso de biocombustíveis no país foi incentivado com a criação do Programa Nacional de Álcool Combustível (Pro-Álcool) em 1990. O Pró-Álcool incentivou a produção de etanol de cana-de-açúcar, a criação e utilização de motores a álcool (etanol) no país e implantou a adição de etanol biocombustível na gasolina (MME, 2017).

Os dois principais biocombustíveis líquidos produzidos e utilizados no Brasil são o etanol, produzido principalmente da cana-de-açúcar; e o biodiesel, produzido a partir de óleos vegetais ou gordura animal (OLIVEIRA; BATISTA, 2015). No ano de 2017, a produção brasileira de etanol e biodiesel foi de 27,4 milhões m³ e 3,9 milhões m³, respectivamente (ANP, 2017). O país é o segundo maior produtor de etanol biocombustível do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos, e possui a terceira maior produção mundial de biodiesel. Segundo Coelho (2017), até 2022 são esperados aumentos na produção de biocombustíveis em cerca de 2% ao ano, principalmente graças ao aumento da mistura desses aos combustíveis fósseis.

Um dos problemas enfrentados por essa indústria é a geração de subprodutos em grande volume. A vinhaça, no caso da produção de etanol, e a glicerina na produção do biodiesel são os principais subprodutos gerados pela indústria de biocombustíveis (SAMPAIO; VITAL; SAMPAIO, 2011). A crescente produção de etanol e biodiesel levou ao aumento da disponibilidade de vinhaça e glicerina, o que acarretou a diminuição do preço desses subprodutos.

A utilização de materiais como a vinhaça e a glicerina, pode ser de grande valia para muitos processos biotecnológicos, uma vez que, são ricos em material orgânico e, atualmente, apresentam baixo custo quando comparados a outras fontes de carbono (OLIVEIRA; BATISTA, 2015). A seguir será apresentado como esses dois subprodutos são gerados, quais suas composições e em quais bioprocessos estão ou podem ser aplicados.

3.4.1 Vinhaça

Por definição, a vinhaça é o efluente líquido da destilação de uma solução alcoólica denominada vinho, o qual é obtido pelo processo de fermentação do caldo de cana-de-açúcar, melaço ou da mistura dos dois. (LAIME et al., 2011). A vinhaça pode ser também denominada vinhoto ou restilo.

O etanol é um importante componente da matriz energética brasileira, pois além de ser utilizado como combustível (etanol hidratado) é também empregado como aditivo da gasolina, na sua forma anidra. No Brasil, o etanol é produzido a partir da cana-de-açúcar principalmente, pelo processo de fermentação dos açúcares e posterior destilação, para separação do álcool. Na etapa de destilação é produzida a vinhaça, em que para cada 1 L de etanol são gerados de 12 L a 16 L de vinhaça (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009). Na safra de 2017 foram produzidos aproximadamente 27 bilhões de litros de etanol no Brasil (ANP, 2017), o que gerou um volume de cerca de 324 bilhões de litros de vinhaça, considerando a proporção de 1:12 (etanol:vinhaça).

A vinhaça possui pH baixo, em torno de 4,5, coloração marrom escura, e pode ser considerada uma suspensão de sólidos orgânicos e minerais (visualmente homogênea). Quanto à composição química, esse subproduto apresenta diversidade de componentes. De maneira geral, a composição da vinhaça é dependente da matéria-prima, da espécie de levedura utilizada na fermentação e do tipo de processo empregado para a produção de etanol (ESPANA-GAMBOA et al., 2011). Na Tabela 3.1

tem-se a composição média da vinhaça oriunda da fermentação dos açúcares da cana-de-açúcar.

O potencial poluidor da vinhaça é determinado, principalmente, pelos seus altos valores de DQO e DBO (Tabela 3.1) e seu pH ácido (LAIME et al., 2011). Esse alto poder poluidor, cerca de cem vezes maior que o esgoto doméstico, aliado ao grande volume gerado desse resíduo, fazem da vinhaça um problema ambiental para a indústria (GARCIA et al., 2017).

Tabela 3.1. Composição química média da vinhaça de melação de cana-de-açúcar

Grandeza ou Componente	Faixa de Valor
Demanda química de oxigênio (DQO) (g/L)	10 – 89
Demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (g/L)	17 – 40
Sólidos suspensos (g/L)	3 – 25
Sólidos voláteis (g/L)	2,5 – 9
Sólidos totais (g/L)	63 – 79
Polifenóis (mg/L)	470
Glicerol (g/L)	3,2 – 10
Ácidos orgânicos voláteis totais (base ác. acético) (mg/L)	8500
N total (mg/L)	21 – 1200
P (mg/L)	30 – 60
Na (mg/L)	51
K (mg/L)	203
Ca (mg/L)	515
Mg (mg/L)	225

Fe (mg/L)	12 – 150
Cu (mg/L)	0,27 – 1,71
Pb (mg/L)	0,02 – 0,48
Zn (mg/L)	1,70

Fonte: ESPANA-GAMBOA et al., 2011; ROBLES-GONZÁLEZ et al., 2012.

O principal destino da vinhaça é sua utilização *in natura* como fertilizante na irrigação das lavouras de cana-de-açúcar, na chamada fertirrigação (CAMARGO et al., 2009). No entanto, estudos alertam sobre problemas que essa prática pode causar, como salinização, lixiviação de metais presentes no solo às águas subterrâneas, mudanças na qualidade do solo devido ao desequilíbrio de nutrientes, redução da alcalinidade, aumento da fitotoxicidade e odor desagradável (CHRISTOFOLETTI et al., 2013)

De acordo com Santana e Machado (2008), a fertirrigação pode ser uma prática paliativa que fornece uma falsa impressão de resolver de forma eficiente o problema da eliminação da vinhaça. Mesmo assim, Laime e colaboradores (2011), defendem o uso da vinhaça na fertirrigação e alertam que os problemas atribuídos à prática podem ser resolvidos com estudos e avaliações técnicas prévias, tanto da vinhaça quanto do solo que receberá a fertirrigação.

Diversas alternativas para utilização da vinhaça estão sendo propostas e avaliadas. Dentre elas, destaca-se o processo de evaporação ou secagem da vinhaça para concentração de seus componentes sólidos e retirada de água (GOMES; EÇA; VIOTTO, 2011). Dessa forma, o volume desse subproduto seria bastante reduzido possibilitando maior facilidade de transporte e sua utilização em outros processos de produção, como na fabricação de alimentos para animais (SIMÕES; SENA; CAMPOS, 2004). Entretanto, a alta quantidade de energia demandada pelo processo de concentração da vinhaça tem destaque negativo frente sua aplicabilidade (GOMES; EÇA; VIOTTO, 2011).

A biotecnologia vem se destacando na tentativa de utilização da vinhaça como matéria-prima em processos biotecnológicos. Das alternativas propostas, a utilização da vinhaça como matéria-prima no processo de digestão aeróbica ou biodigestão parece promissora (FUESS; ZAIAT, 2018). Nesse caso, a vinhaça serve de matéria-prima

para uma cultura múltipla de bactérias que produzem uma mistura de gases, principalmente metano (biogás) quando em anaerobiose (CORTEZ et al., 2007). O resíduo gerado pode ser utilizado como fertilizante nas lavouras de cana-de-açúcar, uma vez que, a carga orgânica foi reduzida. Já o produto, o biogás, pode ser queimado gerando energia para a indústria sucroalcooleira (SZYMANSKI et al., 2010).

Além da biodigestão a vinhaça já foi utilizada como meio de cultivo, ou componente do meio de cultivo, na produção de hidrogênio, via fermentação (KAPDAN; KARGI, 2006); na produção de surfactante por cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (NASPOLINI et al., 2017) e na produção de biomassa microbiana de *Geotricum candidum*, *Candida krusei*, *Hansenula anamola* e *Spirulina platensis* (BARKER; QUINN; MARCHANT, 1982; COCA et al., 2015).

A produção de PHA utilizando vinhaça como substrato também já está reportada na literatura pelos estudos de Flieger e colaboradores (2003), Pramanik e colaboradores (2012) e Zanfonato (2016) que objetivaram produzir PHB; e Bhattacharyya e colaboradores (2012) para produção do copolímero poli(3-hidroxiobutirato-co-3-hidroxi valerato) (PHB-co-HV). Segundo alguns desses autores, o principal inconveniente sobre do uso desse substrato foi sua baixa concentração de carbono, que inviabilizou o aumento da produção do biopolímero.

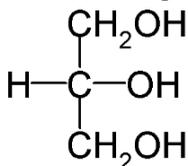
3.4.2 Glicerina

Segundo Knothe e colaboradores (2006), o termo glicerol aplica-se somente ao componente químico puro 1,2,3-propanotriol; e o termo glicerina refere-se aos produtos comerciais purificados, normalmente, contendo pelo menos 95% de glicerol. Vários níveis e designações de glicerina estão disponíveis comercialmente e diferem ligeiramente em seu conteúdo de glicerol e em outras características, tais como cor, odor e impurezas.

O glicerol é um composto orgânico de fórmula química $C_3H_8O_3$ com estrutura química mostrada na Figura 3.5. A presença de três grupos hidroxílicos na estrutura do glicerol é responsável por sua solubilidade em água. Seu ponto de fusão e ebulição é de 18 e 290 °C, respectivamente, tornando-se inflamável a partir de 177 °C. Em condições normais de pressão e temperatura, o glicerol possui massa molar de 92,09 g/mol, densidade de 1261 g/cm³ e viscosidade de 1,5

Pa.s. Visualmente é um líquido claro, incolor, inodoro, hidrocópio e bastante viscoso (SPEIGHT, 2002 aput TAN; AZIZ; AROUA, 2013).

Figura 3.5. Estrutura química da molécula de glicerol

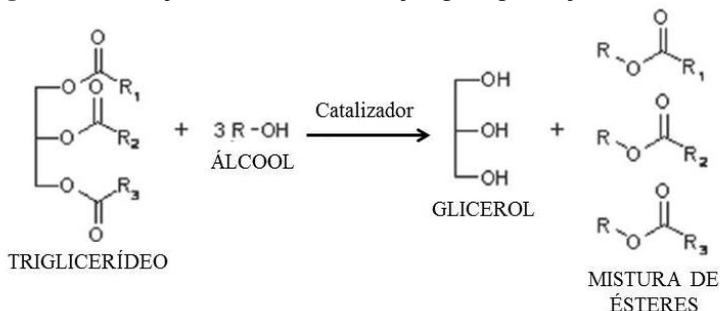


Fonte: TAN, AZIZ; AROUA, 2013.

A obtenção de glicerol se dá por via química, pela síntese do propeno; ou pela purificação da glicerina gerada nas reações de transesterificação, que tem como principal produto o biodiesel (KONG; AROUA; DAUD, 2016). A produção de glicerol via propeno representa aproximadamente 12% da capacidade de produção mundial de glicerol, mas muitas unidades estão sendo desativadas em virtude da grande oferta de glicerol oriundo da produção de biodiesel (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

O processo de produção do biodiesel tem como principal etapa uma reação de transesterificação. A Figura 3.6 mostra de forma simplificada a reação de transesterificação.

Figura 3.6. Reação de transesterificação para produção de biodiesel



Fonte: LAN; LEE; MOHAMMED, 2010

Em uma reação de transesterificação uma mistura de triglicerídeos e metanol (álcool primário) é convertida em metil ésteres (biodiesel) e glicerina. A reação necessita de um catalizador que pode

ser de caráter ácido (H_2SO_4 ou HCl), básico (NaOH ou KOH, mais utilizado industrialmente), ou enzimático (LAN; LEE; MOHAMMED, 2010). Na produção de 100 kg de biodiesel, são gerados cerca de 10 kg de glicerina bruta, sendo a relação entre a produção de biodiesel e glicerina de 10:1 (CHI et al., 2007).

A origem da gordura animal ou do óleo vegetal, de onde os triglicerídeos são extraídos, bem como o tipo de processo utilizado na produção do biodiesel geram glicerinas com composição diferentes (HU et al., 2012). Em geral, a glicerina obtida pela reação de transesterificação apresenta composição variável entre glicerol, água, sais, álcool e material orgânico não glicerol (MONG) (principalmente ácidos graxos livres) (QUISPE; CORONADO; CARVALHO, 2013). No Brasil a produção de biodiesel é realizada, principalmente, tendo óleos vegetais como matéria-prima, sendo o óleo de soja o mais utilizado.

Como resultado da expansão da produção de biodiesel em todo o mundo, cerca 2 milhões de toneladas de glicerina está disponível no mercado todos os anos. Atualmente, o fornecimento de glicerina é inteiramente independente de sua demanda (CRIMINNA et al., 2014). Uma vez que a produção de biodiesel no Brasil em 2017 foi de aproximadamente 3,9 milhões m^3 (ANP, 2017), cerca de 390.000 m^3 de glicerina foram gerados só no país, mantendo a proporção (10:1) (biodiesel:glicerina).

A purificação da glicerina proveniente do biodiesel pode ser realizada por diversos processos, como destilação a vácuo, filtração por membranas, troca iônica, dentre outros (ISAHAK et al., 2015; BUENEMANN et al., 1991; LOPES et al., 2014). Normalmente a escolha do processo de purificação está associada ao tipo de glicerina e, principalmente, à finalidade ou aplicabilidade do produto purificado (ARDI; AROUA; HASHIM, 2015). A Figura 3.7 mostra esquematicamente, o processo geral de tratamento da glicerina gerada pela indústria do biodiesel.

Figura 3.7. Fluxograma do processo de tratamento da glicerina bruta originária da produção de biodiesel

Resíduo da Reação de
Transesterificação



Fonte: Adaptado de ARDI; AROUA; HASHIM, 2015; XIAO; XIAO; VARMA, 2013.

A glicerina bruta, também conhecida pela indústria do biodiesel como glicerina loira, é oriunda dos processos de produção do biodiesel, em que a fase glicerínica sofreu um tratamento ácido para neutralização do catalisador e remoção de ácidos graxos. Em geral, esta glicerina contém cerca de 80% de glicerol, além de água, metanol e sais dissolvidos (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

Após a etapa de neutralização, a glicerina (80% glicerol) pode passar por um processo de evaporação ou destilação a vácuo para retirada do metanol, atingindo composição de aproximadamente 85% de glicerol (BUENEMANN et al., 1991). Normalmente, a indústria realiza novamente o processo de destilação da glicerina gerando a glicerina refinada, também denominada glicerina bidestilada, que apresenta teor de glicerol de até 99,5% (YONG et al., 2001). Essa etapa de purificação da glicerina requer grande capital para instalação e custos operacionais altos, tornando o processo inviável economicamente para indústrias de pequeno porte (XIAO; XIAO; VARMA, 2013).

A aplicabilidade da glicerina está relacionada com o seu grau de pureza. De acordo com a concentração de glicerol, a glicerina pode ser classificada como glicerina de grau USP ou glicerina farmacêutica (99,5% de glicerol ou mais), glicerina refinada (entre 90 e 99% de glicerol) e glicerina bruta (60 a 85% de glicerol) (ISAHAK et al., 2015). A glicerina de grau USP tem ampla aplicação nos setores de cosméticos, higiene pessoal, alimentos e medicamentos; já a glicerina refinada é normalmente utilizada na produção de explosivos, na indústria de papel e celulose, na formação de resinas e demais processos em que a possível

presença de contaminantes nesse produto seja aceitável (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

Quanto aos preços, a glicerina bruta custa cerca de 600,00 (US\$/t) e a glicerina refinada 1.235,00 (US\$/t), enquanto a glicerina grau USP chegava ao mercado a 1.470,00 (US\$/t). Uma vez que a produção de glicerina, no Brasil, é maior que a demanda interna, esse subproduto tem sido exportado para a China, por um preço que varia entre 50,00 e 70,00 (US\$/t) (QUISPE; CORONADO; CARVALHO, 2013).

Uma vez que o processo de tratamento da glicerina ainda é dispendioso para indústria e que o mercado para glicerina está tecnicamente saturado, é importante encontrar alternativas para a glicerina gerada pelo biodiesel (TAN; AZIZ; AROUA, 2013). A utilização da glicerina em processos biotecnológicos está sendo avaliada principalmente na produção de biogás em fermentação anaeróbia (FOUNTOULAKIS, PETOUSI e MANIOS, 2010); via fermentação aeróbia na produção intracelular de lipídios e carotenoides por *Chlorella protothecoides* (CHEN; WALKER, 2011) e produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* (PAPANIKOLA; AGGELIS, 2009), entre tantos outros.

A produção de PHAs a partir de glicerina é reportada na literatura por diversos autores. Alguns exemplos são: Cavalheiro e colaboradores (2009) e Mothes, Schnorpfell e Ackermann (2007) visando a produção de PHB por *C. necator*; Moita, Feche e Lemos (2014) que produziram PHB e o copolímero PHB-co-HV em cultura microbiana mista (MMC) e o estudo de De Paula e colaboradores (2017) que isolaram da glicerina uma nova cepa produtora de PHB (*Pandoraea* sp.) e realizaram a produção de PHAs em cultivos com glicerina.

3.5 ESTRATÉGIA DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE PHB

Apesar de a cepa microbiana ser fator determinante para o tipo de PHA sintetizado, além dela, a fonte de carbono e o modo de operação do processo são fatores que também influenciam a síntese desses biopolímeros (PEÑA, 2014). A forma mais comum de produção de PHB é em cultura submersa em modo batelada, batelada alimentada ou de forma contínua (KOLLER; BRAUNEGG, 2015). Porém Castilho, Mitchell e Freire (2009) apontaram o uso de culturas em estado semi-sólido para a produção de PHB como alternativa para utilização de resíduos agroindústrias sólidos.

A condução em modo batelada para produção de PHB é o modo de operação mais comum devido à flexibilidade e baixos custos operacionais que esse tipo de operação proporciona. No entanto, os processos em batelada apresentam a desvantagem de, em geral, apresentarem baixos rendimentos e produtividades de PHB (PEÑA et al., 2014).

Os problemas de rendimento e produtividade são aumentados no processo em batelada para produção de PHB quando o substrato do processo é algum subproduto ou resíduo agroindustrial com baixa quantidade de carbono.

Estudos como o de Schmidt e colaboradores (2016) que visam à produção de PHB em alta concentração celular utilizando substrato de baixa concentração de carbono são desafiadores. Nesse trabalho a síntese de PHB-co-HV por *C. necator* a partir de glicose e ácido propiônico foi avaliada em batelada sequencial com reciclo de células. O sistema de batelada sequencial consiste na remoção de um volume de meio do biorreator para posterior alimentação do mesmo volume de meio rico em nutriente. Os resultados demonstraram que a alimentação de ácido propiônico durante a fase de produção promove aumento de 18% na produção de copolímero.

Zanfonato (2016) propôs a utilização de vinhaça como fonte de carbono para produção de PHB por *C.necator* DSM 545, operando em batelada. Nesse estudo foi demonstrado que a bactéria conseguiu crescer com velocidade específica considerável (μ_{\max} 0,23 h⁻¹). Porém a produção de biopolímero foi afetada, uma vez que o subproduto não apresentou quantidade de carbono suficiente para a síntese do PHB.

Cultivos em batelada alimentada são os mais utilizados na produção de PHB. Tradicionalmente, nesse modo de operação um ou mais nutrientes no meio de cultivo são adicionados (alimentados) ao biorreator sem a retirada de qualquer volume até o final do processo. Nesse caso existe um fluxo de entrada sem qualquer saída o que implica em alterações do volume do biorreator. Com esse modo de operação são atingidas alta densidade celular e alta concentração de PHA (MEJÍA et al., 2010)

Usualmente, na produção de PHB, cultivos em batelada alimentada são realizados de duas formas diferentes. Na primeira forma, a alimentação é realizada de forma contínua através de um fluxo intermitente de uma solução ao biorreator, essa forma é tradicionalmente utilizada na alimentação da fonte de nitrogênio ou quando existe algum componente tóxico na composição do meio de cultivo. A segunda forma

de realizar um cultivo em batelada alimentada é por pulsos, nesse caso uma solução concentrada é adicionada ao biorreator em momentos determinados, ao longo do cultivo (PEÑA et al, 2014).

Kanjanachumpol e colaboradores (2013) realizaram cultivo de *B. megaterium* BA-019 com alimentação intermitente do melão de cana-de-açúcar. Segundo os autores o aumento da relação carbono nitrogênio do cultivo aumentou a biomassa e produtividade volumétrica do PHB, atingindo 45,84% (p/p) de PHB com produtividade de 1,73 g /L.h.

A utilização de glicerina como fonte de carbono na produção de PHB por *C. necator* já foi avaliada tanto em batelada como em batelada alimenta. De acordo com Cavalheiro e colaboradores 2009, a velocidade específica de crescimento dessa bactéria em glicerina é reduzida quando a concentração do substrato é superior a 40 g/L. Dessa forma, os processos em batelada alimentada, em que a concentração de carbono é adicionada aos poucos geram resultados de velocidade de crescimento e produção de PHB mais altos, além de evitarem problemas de inibições pelos possíveis contaminantes (sais, metanol, etc) presentes na glicerina (MOTHES; SCHNORPFELL; ACKERMANN, 2007)

Tanadchangsang e Yu (2012) relataram aumento da produtividade de PHB (0,92 g/L.h) por *C. necator* operando em batelada alimenta tendo glicerina como fonte de carbono. Para os referidos autores, a glicerina seria um substrato ideal para produção de bioplásticos devido à sua ubiquidade, baixo custo e alto grau de redução. No entanto, as produtividades relatadas usando glicerina como fonte de carbono são ainda relativamente baixas comparadas com outros subprodutos (CAVALHEIRO et al., 2009). Exemplos de baixa produtividade em glicerol podem ser dados nos trabalhos de Kanjanachumpol e colaboradores (2013) em que a produtividade de PHB foi de 1,73 g/L.h utilizando melão de açúcar e no trabalho de Pradella e colaboradores (2012) que utilizaram óleo de soja e obtiveram produtividade de 2,5 g/L.h de PHB em *C. necator*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 FONTES DE CARBONO

As glicerinas bruta e refinada foram gentilmente doadas pela empresa Biocapital (produtora de biodiesel e solventes especiais), localizada na cidade de Charqueadas - SP. As glicerinas foram mantidas em recipiente plástico de 5 L, à temperatura ambiente e fora do alcance da luz, até sua utilização. O glicerol comercial utilizado foi da marca Neon Comercial.

A vinhaça utilizada foi doada pela Usina Iracema (produtora de etanol e açúcar), localizada no município de Iracemópolis - SP. Essa foi mantida em recipientes plásticos de 5 L e congeladas a -20°C , até o momento de sua utilização.

4.1.1 Caracterização das fontes de carbono

As glicerinas em estudo foram caracterizadas quanto a demanda química de oxigênio (DQO), com intuito de verificar a possível existência de matéria orgânica, além de glicerol, presente nas mesmas. A análise de DQO foi realizada segundo o procedimento do *Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 1995). A DQO foi determinada colorimetricamente pela oxidação da matéria orgânica com o dicromato de potássio em meio ácido, utilizando sulfato de prata como catalisador. A quantificação foi feita pela determinação colorimétrica do Cr^{3+} , gerado pela redução do dicromato ao oxidar a matéria orgânica.

Para caracterização da vinhaça foram realizadas quantificações de: cloretos totais por eletrodo de íon seletivo seguindo o protocolo distrito pela ASTM D512 (Orion 920 A, eletrodo combinado Cole Parmer 27504-D8); sulfatos, utilizando método por gravimetria de acordo com protocolo ASTM D516 (Balança Analítica AND HR 200); Ca, Fe, Mn, Mg, Cu, Zn foram quantificados por absorção atômica (Perkin Elmer-PinAAcle 900T0); K foi determinado por emissão atômica (Perkin Elmer – PinAAcle 900T0) e Na por fotometria de chama (Cole Parmer 265500). As amostras foram preparadas de acordo com o protocolo descrito pela ASTM D 1971/16 Prática B (APHA; AWWA; WEF, 1995). Essas determinações foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. As análises de nitrogênio total, açúcares redutores, demanda química de oxigênio

(DQO) e glicerol foram feitas conforme metodologias analíticas descritas nas seções a seguir.

4.1.2 Preparo das fontes de carbono

Para sua utilização como fonte de carbono dos experimentos, as glicerinas refinada e bruta e o glicerol comercial foram diluídos em água destilada nas proporções 1:1,5; 1:1,5 e 1:0,66, respectivamente. Estas diluições foram realizadas para reduzir a viscosidade das glicerinas e atingir concentração de glicerol de aproximadamente 500 g/L. As soluções foram submetidas à esterilização em autoclave (121 °C, 1,1 atm, 15 min) e posteriormente quantificadas quanto ao teor de glicerol, de acordo com determinação descrita a seguir.

O pH da vinhaça foi corrigido para 7,0, pela adição de solução de NaOH 10% (v/v). Após a correção do pH, ocorreu a precipitação de alguns sólidos suspensos. A vinhaça foi, então, submetida à centrifugação 2000 xg durante 10 min, para retirada do precipitado formado pela correção do pH. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi submetido à esterilização em autoclave (121 °C, 1,1 atm, 15 min). Os açúcares redutores totais e glicerol foram determinados (metodologias descritas no item 4.4.3) antes e depois do processo de esterilização, para confirmar que o método de esterilização utilizado não alterou a composição da vinhaça.

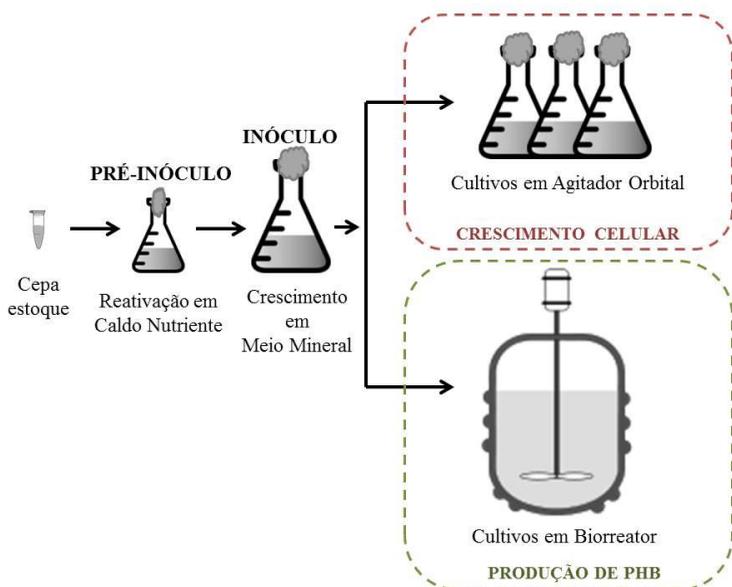
4.2 MICRORGANISMO

Nesse trabalho foi utilizada a bactéria *Cupriavidus necator_glpFK*, cepa recombinante construída a partir da cepa parental *Cupriavidus necator* DSM 545, com a inserção dos genes *glpF* e *glpK* de *Escherichia coli* JM109 (ZANFONATO, 2016). A cepa *C. necator_glpFK* foi mantida a - 80 °C (em microtubos de plástico) em caldo nutriente NB (Nutrient Broth – Difco™), contendo peptona de carne (5 g/L) e extrato de carne (3 g/L), e glicerol (1:1 (v/v)), até o início de cada cultivo.

4.3 MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os cultivos (agitador orbital ou biorreator) foram realizados a partir de dois pré-cultivos, sendo o primeiro para reativação da cepa (pré-inóculo) e o segundo para preparo do inóculo. A Figura 4.1 mostra, esquematicamente, como foram realizados os cultivos, tanto em agitador orbital como em biorreator.

Figura 4 1. Representação da metodologia utilizada para realização dos cultivos



No pré-inóculo, o microrganismo foi transferido de microtubo plástico (cepa estoque) para frasco *Erlenmeyer* aletado de 500 mL contendo 150 mL de caldo nutriente NB, e incubada em agitador orbital (New Brunswick Sci. Company Inc., New Jersey, USA) a 150 rpm e 30°C. O tempo de incubação foi o requerido para obter-se absorbância (600 nm) de aproximadamente 2,0, em espectrofotômetro (modelo 1105, BEL). Esse valor de absorbância representa a concentração máxima em que as células ainda se encontram na fase exponencial de crescimento e foi determinado em estudos anteriores realizados no nosso grupo de pesquisa.

Para os cultivos realizados em agitador orbital, o inóculo foi preparado em *Erlenmeyer* aletado de 1000 mL contendo 300 mL de meio mineral (MM), descrito por Aragão et al. (1996) com modificações, sem limitação de nitrogênio.

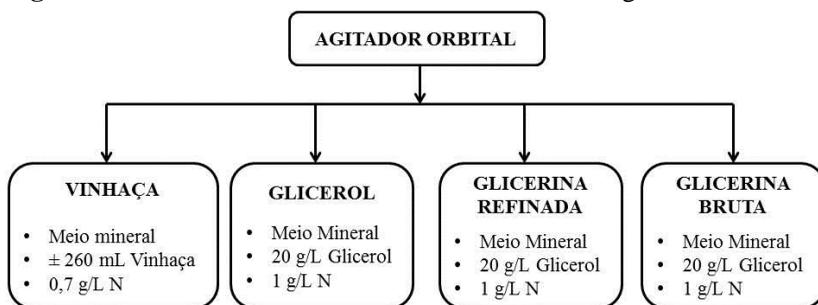
Para os cultivos realizados em biorreator, o inóculo foi realizado em *Erlenmeyer* aletados de 1000 mL contendo 400 mL de MM, sem limitação de nitrogênio. Ambos foram inoculados com o pré-inóculo, em seguida, incubados a 30 °C, em agitador orbital a 150 rpm durante o tempo necessário para obter-se absorbância (600 nm) de aproximadamente 8, em espectrofotômetro. Esse valor de absorbância representa a concentração máxima em que as células ainda se encontram na fase exponencial e foi determinado em estudos anteriores do grupo de pesquisa.

O MM continha (em g/L): 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 de nitrogênio) e elementos traço 1 mL/L. A solução de elementos traço apresentou a seguinte composição (em g/L): 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. A fonte de carbono de cada inóculo foi de 20 g/L de glicerol da respectiva glicerina (glicerol, glicerina refinada ou glicerina bruta). Para os cultivos realizados em vinhaça, a fonte de carbono foi a própria vinhaça (sem diluição), com adição dos sais do MM.

4.3.1 Comparação do crescimento celular

Para avaliação do crescimento de *C. necator_glpFK* nas fontes de carbono em estudo, foram realizados cultivos em agitador orbital, sem limitação de nitrogênio. As condições desses cultivos são mostradas esquematicamente na Figura 4.2.

Figura 4 2. Detalhamento dos cultivos realizados em agitador orbital



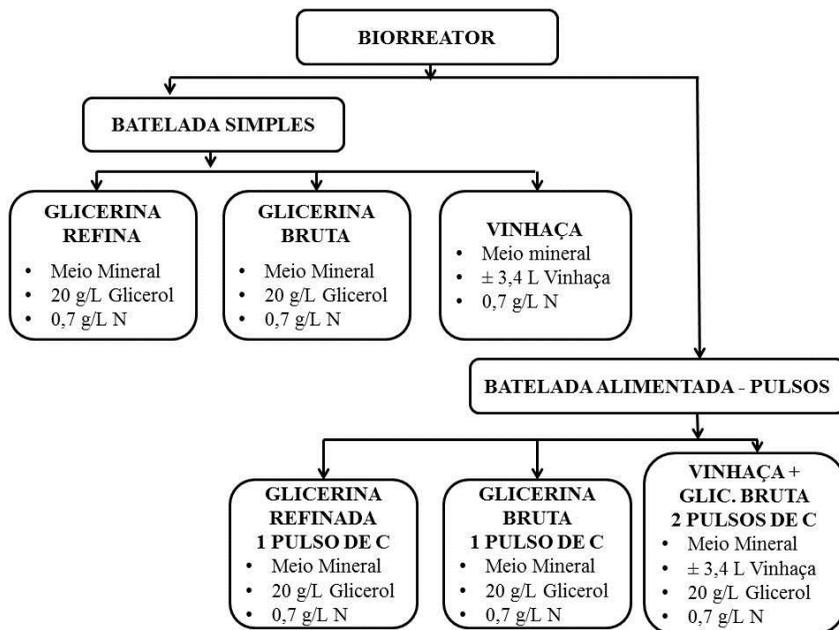
Nos experimentos tendo como fonte de carbono glicerol, glicerina refinada e glicerina bruta, as concentrações iniciais foram de 20 g/L de glicerol e 1 g/L de nitrogênio em MM. Os cultivos foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 1000 mL aletados contendo 300 mL de meio (10% (v/v) de inóculo), mantidos a 30 °C, em agitador orbital a 150 rpm.

O cultivo realizado em vinhaça, também foi conduzido em frasco *Erlenmeyer* aletado de 1000 mL contendo 300 mL de meio, desses 10% (v/v) foi adicionado de inóculo. Esse cultivo, da mesma forma que seu inóculo, foi obtido pela mistura dos nutrientes presentes do MM sendo completado o volume (± 270 mL) com vinhaça (ZANFONATO, 2016). As condições de cultivo foram de 30 °C e 150 rpm.

4.3.2 Crescimento celular e produção de PHB

Os cultivos foram realizados em biorreator (BIOFLO III, New Brunswick Scientific) de 5 L, com volume útil de 4 L. A Figura 4.3 ilustra uma visão geral dos cultivos realizados nesta etapa.

Figura 4 3. Esquema ilustrativo dos cultivos realizados em biorreator



Primeiramente, três cultivos em modo batelada foram realizados: um com glicerina refinada, um com glicerina bruta e outro com vinhaça. Os cultivos realizados em glicerina tiveram concentração inicial de 20 g/L em glicerol e de 0,7 g/L de nitrogênio, em meio mineral. O cultivo com vinhaça foi realizado com adição dos nutrientes presentes do MM, sendo o restante do volume adicionado de vinhaça (± 3,4 L).

As concentrações iniciais de glicerol e nitrogênio, dos cultivos operados em modo batelada alimentada, também foram de 20 g/L e 0,7 g/L, respectivamente. Nesses cultivos, a concentração de glicerol foi aumentada durante o experimento na forma de pulso. Quando a concentração de glicerol no reator estava menor do que 5 g/L (verificada pela determinação de glicerol durante o cultivo), um volume de solução concentrada da respectiva glicerina foi adicionado ao biorreator. O volume adicionado foi propício para que a concentração de glicerol no meio fosse aumentada para 20 g/L de glicerol.

O cultivo com vinhaça e glicerina bruta como substratos foi iniciado somente com a vinhaça (± 3,4 L) em MM, e posteriormente dois pulsos de glicerina bruta foram adicionados ao biorreator. O

primeiro pulso de glicerina bruta foi realizado nas primeiras horas de cultivo, quando a concentração de glicerol (presente na vinhaça) estava em, aproximadamente, 2 g/L e após a adição do volume de glicerina bruta foi elevada a 20 g/L. O segundo pulso foi realizado da mesma forma que os cultivos anteriores (somente em glicerina).

Quanto à variação no volume útil do biorreator, pela amostragem e alimentação de fonte de carbono, esta se manteve inferior a 10% em todos os cultivos realizados, demonstrando que a operação em batelada alimentada na forma de pulsos não influencia no volume de reação do processo.

O biorreator foi operado, em todos os cultivos, com temperatura em 30 °C e pH em 7,0 pela adição de NaOH (2,5 mol/L) ou HCL (2,7 mol/L), ambos controlados automaticamente. A agitação e aeração iniciais foram de 450 rpm e 0,1 vvm, respectivamente, sendo aumentadas gradual e manualmente ao longo dos cultivos, permitindo que a concentração de oxigênio dissolvido no meio fosse superior a 30%, em relação à saturação com ar atmosférico. Polipropilenoglicol foi utilizado como antiespumante, quando necessário.

4.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.4.1 Amostragem

A amostragem dos cultivos (agitador orbital e biorreator) foi realizada em intervalos de aproximadamente 3 h, até verificação do término do cultivo por decaimento da leitura de absorbância.

A cada amostragem, foram retiradas 7 alíquotas de 2 mL cada, em microtubos de plástico, em seguida centrifugados a 10956 \times g durante 3 min. Os sobrenadantes foram separados das células em microtubos vazios e congelados para sua posterior utilização nas determinações analíticas. Os precipitados foram lavados duas vezes com 1 mL de água destilada, dentre estes, 3 amostras foram submetidas à secagem (análise gravimétrica); e outras 4 amostras foram congeladas para posterior quantificação do biopolímero produzido e proteína intracelular.

Nos cultivos realizados em agitador orbital foram retiradas 3 alíquotas a cada intervalo de amostragem as quais eram submetidas ao mesmo procedimento já descrito. Esse menor volume de amostragem foi devido ao menor volume de meio e a não necessidade da quantificação do biopolímero.

4.4.2 Concentração celular

A concentração celular foi determinada indiretamente por leitura das amostras em espectrofotômetro (600 nm) e diretamente por gravimetria. Para realização do método gravimétrico, o precipitado, obtido pela centrifugação de 2 mL da amostra, foi seco em estufa a 100 °C, durante 24 h. Após esse tempo, as amostras foram colocadas em dessecador durante, aproximadamente 30 min e pesadas em balança analítica.

Como a vinhaça apresenta coloração marrom, realizou-se a leitura da absorbância da vinhaça pura (600 nm) e este valor foi descontado na leitura das amostras. Mesmo com a centrifugação realizada após a correção do pH da vinhaça (procedimento já descrito), foi verificada a ocorrência de precipitação desse substrato, sendo assim este foi quantificado e sua massa descontada dos resultados de gravimetria.

4.4.3 Concentração de açúcares redutores totais, glicerol e nitrogênio

A concentração de açúcares redutores totais das amostras de vinhaça (tanto na vinhaça pura quanto das amostras retiradas dos cultivos) foi determinada utilizando o método do ácido 3,5 dinitrisalicílico (DNS), método colorimétrico descrito por Miller (1959).

A concentração de glicerol foi determinada pelo *kit* Triglicérides Liquiform (Labtest Diagnóstica). Nesse método, o glicerol é convertido, primeiramente, a glicerol-3-fosfato e posteriormente a dihidroxicetona, através de duas reações enzimáticas. A segunda reação enzimática tem como subproduto peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, por ação de uma peroxidase, é transformado em um composto colorimétrico diretamente proporcional à concentração de glicerol da amostra, que foi determinado a 505 nm.

O nitrogênio foi determinado pelo *kit* Ureia ES (Gold Analisa), que determina ureia pelo método enzimático-colorimétrico. No método, a ureia, por meio da ação enzimática, é decomposta em nitrogênio amoniacal que é determinado por colorimetria a 600 nm.

4.4.4 Concentração de PHB

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

Após descongelamento das amostras de biomassa úmida, o precipitado foi ressuspensão em um volume de 2 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol acidificado, o qual continha ácido benzóico (0,4 g/L) como padrão interno e 15% de H₂SO₄, com agitação em vórtex. A mistura foi então aquecida a 100 °C, durante 140 min. Passados os primeiros 60 min de aquecimento, a mistura foi homogeneizada 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 e adicionou-se 1 mL de água destilada às amostras que foram agitadas durante 30 s (vórtex). A fase orgânica (inferior) foi retirada com pipeta *Pasteur* e armazenada sob refrigeração para posterior análise em cromatografia gasosa.

O cromatógrafo utilizado foi um SHIMADZU GC-14B equipado com detector de ionização de chama (FID ar-hidrogênio). Utilizou-se coluna capilar Rtx®-Wax (Crossbond® polyethylene glycol - 30m x 0,25mm x 0,25 µm) com sílica fundida e o gás de arraste foi o nitrogênio com vazão constante de 40 mL/mim. As temperaturas de injeção, detecção e coluna foram de 250, 250 e 120 °C, respectivamente.

A curva padrão foi estabelecida através da relação das áreas de PHA/padrão interno e a massa de polímero, utilizando-se polihidroxibutirato (Sigma-Aldrich), com massa variando entre 0,001 a 0,03 g. Submeteu-se as amostras da curva padrão à mesma metodologia de metanólise que as amostras.

4.4.5 Concentração de proteína intracelular

A determinação da concentração de proteína intracelular foi realizada pelo método de Biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949) com modificações (ARAGÃO et al., 1996). Albumina bovina (*Bovine Serum Albumine* - BSA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) foi utilizada como padrão.

Nessa determinação a biomassa úmida de cada ponto de amostragem, que foi armazenada congelada até momento da análise, foi ressuspensa em 5,5 mL de água destilada aos quais foi adicionado 1 mL de NaOH (100 g/L). As amostras foram incubadas a 100 °C durante 5

min. Após resfriamento, foi adicionado 170 μL de solução de CuSO_4 25% (m/v) as amostras e todas foram agitadas em agitador tipo vórtex. O sobrenadante obtido após centrifugação a 2800 $\times g$ durante 5 min foi analisado a 560 nm em espectrofotômetro.

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 (FRIEDLI, 1996)) e para *C. necator* (0,94 ligações/g (ARAGÃO, 1996)).

4.5 TRATAMENTO DOS DADOS

Como o acúmulo de PHB é intracelular, é importante a definição dos termos a seguir, para melhor entendimento da metodologia adotada para os cálculos:

X_t (biomassa total) = biomassa contendo PHB intracelular

X_r (biomassa residual) = X_t – PHB intracelular

Um ajuste polinomial foi realizado aos dados obtidos de X_t e PHB com auxílio do *software* Microsoft Excel 2010 suplementado do macro Lissage (desenvolvida por Simões, Arroyo e Uribe Larrea, *Institut National des Sciences Appliquées* - Toulouse, França). A biomassa residual (X_r) foi obtida pela subtração dos ajustes obtidos para X_t e PHB. A partir destes ajustes, determinaram-se as velocidades específicas de crescimento celular (μ_{X_r}) e produção de PHB (q_p), as produtividades (Prod) e da fase de produção de PHB (Prod_P).

Para sistemas em modo batelada alimentada, é necessário considerar os efeitos de diluição, referentes às alimentações de substrato e das amostragens. Contudo, como nos cultivos realizados em modo batelada alimentada na forma de pulso, a variação de volume ao longo de todo o cultivo foi inferior a 10%, para mais ou para menos do volume total de reação, os cálculos destes foram realizados da mesma forma que os sistemas em modo batelada.

4.5.1 Velocidades específicas de crescimento celular e produção de PHB

A partir dos perfis de crescimento celular (X_r) e formação de produto, foi possível determinar, as velocidades instantâneas de crescimento microbiano (dX_r/dt) e de formação de produto ($dPHB/dt$). Dividindo-se as velocidades instantâneas pela concentração celular residual no tempo t , as velocidades específicas de crescimento celular (μ_{X_r}) e formação de produto (q_p) foram obtidas (Equações 3.1 e 3.2).

$$\mu_{X_r} = \frac{1}{X_r} \cdot \frac{dX_r}{dt} \quad (3.1)$$

$$q_p = \frac{1}{X_r} \cdot \frac{dPHB}{dt} \quad (3.2)$$

Sendo:

μ_{X_r} – velocidade específica de crescimento celular (h^{-1});

q_p – velocidade específica de produção de PHB ($g_{PHB}/g_{X_r} \cdot h$);

Ao se integrar a Equação 3.1 de $t = 0$ a t , foi possível obter uma equação de primeiro grau (Equação 3.3), onde X_{r0} é a concentração inicial de X_r . Na fase exponencial de crescimento, μ_{X_r} é máximo ($\mu_{X_{rmax}}$) e constante (SCHIMIDELL et al., 2001) O valor de $\mu_{X_{rmax}}$ foi calculado através da Equação 3.3 com os dados de X_r da fase exponencial.

$$\ln(X_r) = \ln(X_{r0}) + \mu_{X_{rmax}} \cdot t \quad (3.3)$$

4.5.2 Produtividade (Q), produtividade na fase de produção de PHB (Q_p) e produtividade em biomassa (Q_x)

A produtividade (Q) foi calculada utilizando a Equação 3.4, a produtividade da fase de produção de PHB (Q_p) a Equação 3.5 e a produtividade em biomassa (Q_x), a Equação 3.6.

$$Q = \frac{PHB_{tf} - PHB_{ti}}{t_f} \quad (3.4)$$

$$Q_p = \frac{PHB_{tf} - PHB_{tp}}{t_f - t_p} \quad (3.5)$$

$$Q_X = \frac{X_{r_{tp}} - X_{r_{ti}}}{t_p} \quad (3.6)$$

Sendo:

Q – produtividade em PHB ($g_{PHB}/L.h$);

Q_P – produtividade na fase de produção de PHB ($g_{PHB}/L.h$);

Q_X – produtividade em biomassa ($g_{Xr}/L.h$)

PHB_{ti} – concentração de PHB no tempo inicial de cultivo (g_{PHB}/L);

PHB_{tf} – concentração de PHB no tempo final de cultivo (g_{PHB}/L);

PHB_{tp} – concentração de PHB no tempo de início da fase de produção (FP) (g_{PHB}/L);

$X_{r_{ti}}$ – concentração de biomassa no tempo inicial de cultivo (g_{Xr}/L);

$X_{r_{tp}}$ – concentração de biomassa no tempo final de cultivo (g_{Xr}/L);

t_f – tempo final do cultivo (h);

t_i – tempo inicial do cultivo (h);

t_p – tempo inicial da fase de produção (h).

OBS: o início da fase de produção foi definido como o momento em que o nitrogênio não estava mais disponível no meio.

4.5.4 Fatores de conversão

Os fatores de conversão de substrato em célula ($Y_{Xr/Glicerol}$), e substrato em PHB ($Y_{PHB/Glicerol}$) foram calculados por meio do coeficiente angular da reta obtida relacionando-se a concentração celular (X_r) ou a concentração de PHB com o consumo de substrato (glicerol), ao longo do tempo.

Tendo em vista que o crescimento celular só ocorre quando o nitrogênio está presente no meio, o fator de conversão de substrato em célula ($Y_{Xr/Glicerol}$) foi obtido do início dos cultivos até o tempo em que a concentração de nitrogênio determinada estava a baixo de $0,2 g_N/L$. O fator de conversão de substrato em PHB ($Y_{PHB/Glicerol}$) foi calculado do momento em que a exaustão de N foi determinada até o final do cultivo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Essa seção foi dividida em três partes para melhor entendimento dos resultados obtidos durante a realização deste trabalho. Na primeira parte, são apresentadas as caracterizações quanto à composição dos substratos: vinhaça e glicerinas residuais, juntamente com os cultivos realizados com *C. necator_glpFK* nos substratos em estudo visando a comparação do crescimento celular. Na segunda parte, estão demonstrados os cultivos realizados em modo batelada para estudo do crescimento celular e produção de PHB, por *C. necator_glpFK*. E na terceira parte, encontra-se a avaliação dos cultivos em batelada alimentada, cujo principal objetivo foi o aumento da produção e produtividade de PHB, em glicerina e vinhaça.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS: VINHAÇA, GLICERINA REFINADA E GLICERINA BRUTA E COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *C. necator_glpFK* NESSES SUBSTRATOS EM AGITADOR ORBITAL

A Tabela 5.1 apresenta a composição da vinhaça de cana-de-açúcar que foi utilizada neste trabalho. Esse subproduto foi uma doação da Usina Iracema, localizada no município de Iracemápolis – SP, proveniente da fabricação de etanol de melaço de cana.

Como pode ser observado na Tabela 5.1, a vinhaça é um subproduto de composição variada. Com pequenas variações principalmente nas concentrações de Na e Ca, a composição na vinhaça em estudo foi bem semelhante à composição média desse subproduto (Tabela 3.1- Seção 3.1.1) reportada na literatura (ESPANA-GAMBOA et al., 2011; ROBLES-GONZÁLEZ et al., 2012). A determinação da concentração de sódio (Na) é importante, uma vez que, concentrações maiores que 20 g/L desse íon são reportadas na literatura como possível causa de inibição do crescimento de *C. necator* e menores produtividades de PHB (MOZUNDER et al., 2015).

Tabela 5.2 Componentes da vinhaça de cana-de-açúcar utilizada nesse trabalho

Parâmetro/Componente	Valor/Concentração
pH	4,9
DQO (g/L)	29,3
Nitrogênio (g/L)	0,06
Açúcares redutores totais (g/L)	2,5
Glicerol (g/L)	3,4
Cloretos (%)	0,262
Sulfatos (%)	0,152
Ca total (mg/L)	800
Fe total (mg/L)	23,3
Mn total (mg/L)	5,73
Mg total (mg/L)	231,25
Cu total (mg/L)	0,54
Zn total (mg/L)	1,03
K total (g/L)	1,9
Na total (mg/L)	129

Dos materiais orgânicos que foram determinados na vinhaça, destaca-se a quantidade de açúcares redutores totais (2,5 g/L) e de glicerol (3,4 g/L). É importante salientar que, apesar de não terem sido quantificados no presente estudo, a vinhaça também pode apresentar em sua composição alguns ácidos orgânicos. De maneira geral, a vinhaça de cana-de-açúcar contém principalmente ácido acético (2,5 g/L) (RYZNAR-LUTY et al., 2008), ácido láctico (1,5 g/L) (DOELSCH et al., 2009) e ácido butírico (3 g/L) (SEDENHO, 2016). Na Tabela 3.1 (Seção 3.1.1) é reportado concentração de ácidos orgânicos totais de 8500 mg/L presente na composição média da vinhaça.

A valorização da vinhaça, como substrato para a produção de PHAs, é devido, principalmente, à presença de ácidos orgânicos, glicerol e sais minerais (PARNAUDEAU et al., 2008). Os ácidos butírico, propiônico e acético já foram reportados como possíveis fontes de carbono para o crescimento e produção de PHA por *C. necator* (ARAGÃO, 1996; CHAKRABORTY et al., 2009 e GROUSSEAU, 2012). Logo, os ácidos orgânicos, os açúcares redutores e o glicerol são os principais componentes presentes na vinhaça que a bactéria *C. necator* é capaz de metabolizar.

A glicerina refinada e a glicerina bruta, ambas geradas pela produção de biodiesel, foram doadas pela empresa Biocapital de Charqueadas – SP. A porcentagem de glicerol e DQO desses subprodutos foram avaliadas e estão apresentadas na Tabela 5.2.

De acordo com Albuquerque (2014), a glicerina, proveniente do biodiesel, pode apresentar valores de DQO entre 925 e 1600 g/L. As amostras de glicerina analisadas (refinada e bruta) apresentaram valores dentro desta faixa. A proximidade dos valores de DQO obtidos para a glicerina refinada e para o glicerol corrobora com a alta pureza em glicerol desse subproduto.

Tabela 5.3 Quantidade de glicerol e demanda química de oxigênio (DQO) das amostras de glicerol e glicerinas utilizadas nesse trabalho

Amostra	Glicerol (%)	DQO (g/L)
Glicerol	99,9	1597
Glicerina Refinada	99,5	1551
Glicerina Bruta	83	1425

A determinação da DQO foi realizada como indicativo de que as amostras de glicerina refinada e glicerina bruta não continham maiores quantidades de matéria orgânica que o indicado pela porcentagem de glicerol. Uma vez que, as glicerinas em estudo são subprodutos e que podem apresentar diferentes concentrações de glicerol, sais, MONG (material orgânico não glicerol) e impurezas (QUISPE, CORONADO e CARVALHO, 2013). É possível constatar que o aumento nas porcentagens de glicerol das amostras é acompanhado pelo aumento da DQO das mesmas. Sendo assim, o glicerol provavelmente é o

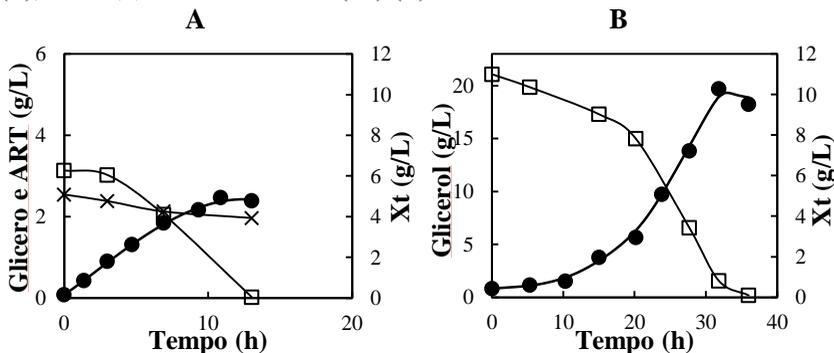
componente orgânico majoritário das amostras de glicerina refinada e glicerina bruta.

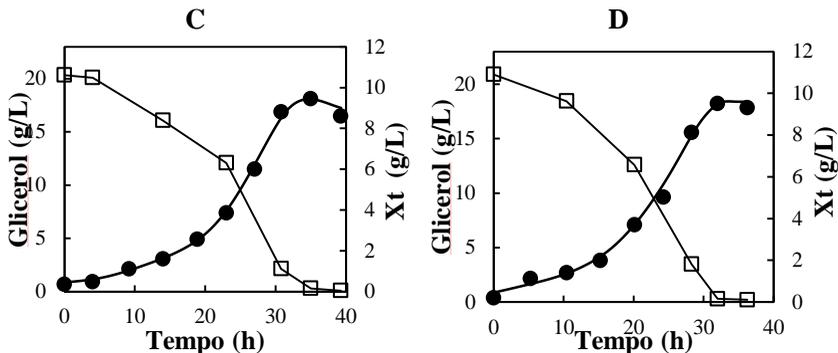
A fim de comparar o crescimento de *C. necator_glpFK* em vinhaça, glicerol, glicerina refinada e glicerina bruta, foram realizados cultivos em agitador orbital, com esses substratos, sem a adição de outra fonte de carbono. Tendo em vista que a produção de PHB não foi avaliada nessa etapa, a concentração de nitrogênio (1 gN/L) foi suficiente para evitar a limitação desse nutriente. A concentração de nitrogênio residual foi acompanhada em todos os cultivos (dados não apresentados) e verificou-se a não limitação deste nutriente.

De acordo com Cavalheiro e colaboradores (2009), o crescimento de *C. necator* em glicerina pode apresentar maiores velocidades específicas máximas quando a concentração de glicerol estiver entre 20 e 40 g/L. Sendo assim, a concentração inicial dos cultivos em glicerol, glicerina refinada e glicerina bruta foi de 20 g/L de glicerol. O cultivo em vinhaça iniciou com 3,1 g/L de glicerol e 2,5 g/L de ART, uma vez que, essas são as concentrações desses componentes na vinhaça (Tabela 5.1).

A Figura 5.1 mostra o acompanhamento da biomassa total (X_t) de *C. necator_glpFK* e as concentrações de glicerol e ART, para os cultivos realizados em agitador orbital, em função do tempo. A linha contínua (dados de X_t) refere-se ao ajuste polinomial aos dados experimentais realizados com o *software* Microsoft Excel e o macro Lissage.

Figura 5.1. Cultivos de *C. necator_glpFK* em (A) vinhaça, (B) glicerol, (C) glicerina refinada e (D) glicerina bruta em agitador orbital; glicerol (\square), ART (\times) e biomassa total (X_t) (\bullet)





A concentração máxima de biomassa no cultivo em vinhaça foi de 4,9 g/L, em 13 h, com velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X_{tmax}}$) de $0,40 \text{ h}^{-1}$. O glicerol presente na vinhaça foi totalmente consumido e o consumo de ART foi de, aproximadamente, 0,5 g/L. Esse comportamento pode ser explicado como uma preferência do microrganismo pelo glicerol.

Zanfonato (2016) reportou comportamento semelhante em cultivos realizados com *C. necator_glpFK* em vinhaça. Nos cultivos realizados por esse autor, o glicerol foi totalmente consumido após 10 h de cultivo, e o consumo de ART foi mais lento em comparação ao consumo de glicerol. O autor também reportou que, nas primeiras horas de cultivo, não houve redução nas concentrações de glicerol e ART, como constatado neste trabalho, sugerindo que o microrganismo faz uso de outros componentes da vinhaça durante esse período, muito provavelmente os ácidos orgânicos.

O crescimento de *C. necator_glpFK* foi semelhante nos cultivos com glicerol, glicerina refinada e glicerina bruta (Figura 5.1 (B), (C) e (D), respectivamente), com concentrações de biomassa próximas a 10 g/L. As velocidades máximas de crescimento obtidas nesses cultivos foram: de 0,11; 0,11 e $0,12 \text{ h}^{-1}$ para glicerol, glicerina refinada e glicerina bruta, respectivamente. Quanto ao consumo do glicerol, foi possível verificar que, nesses cultivos, ele foi totalmente consumido em aproximadamente 35 h de cultivo.

Os valores de $\mu_{X_{tmax}}$ reportados na literatura para *C. necator* em glicerol (20 g/L) e glicerina (20 g/L de glicerol) são variáveis: 0,28 e 0,26 h⁻¹ (GAHLAWAT; SONI, 2017), 0,30 e 0,22 h⁻¹ (CAVALHEIRO et al., 2009); 0,18 h⁻¹ e 0,12 h⁻¹ (TANADCHANGSAENG e YU, 2012). Esta variação pode ser justificada pela diferença de composição das glicerinas em estudo ou pela diferença de composição dos meios minerais avaliados. No presente trabalho, apesar de o crescimento de *C. necator* não ter sido afetado pelas diferentes composições das glicerinas em estudo, os valores de $\mu_{X_{tmax}}$ obtidos por esse microrganismo foram menores (0,11 h⁻¹) que em alguns dos estudos citados anteriormente. O que pode ser explicado pela utilização de meio contendo alguma fonte de carbono extra (glicose ou extrato de levedura, por exemplo) nos referentes estudos. No presente estudo o meio mineral tinha como única fonte de carbono a glicerina em análise. Além disso, o tempo de adaptação da cepa é de mais de 4 dias no estudo de Cavalheiro e colaboradores (2009).

O crescimento de *C. necator* em diferentes glicerinas e glicerol comercial também foi comparado nos estudos de Cavalheiro e colaboradores (2009) e Gahlawat e Soni (2017). Nos referidos trabalhos, os autores verificaram que a cinética de crescimento do microrganismo não é diferente em glicerol e glicerina, quando a concentração de glicerol é de 20 g/L, assim como verificado no presente estudo. Contudo, ainda segundo os autores, as impurezas presentes na glicerina podem afetar a velocidade específica máxima de crescimento de *C. necator* quando concentrações maiores de glicerol, e conseqüentemente, da glicerina e suas impurezas, são utilizadas.

No estudo de Mothes, Schnorpfeil e Ackermann (2007), o crescimento de *C. necator* foi avaliado em diferentes glicerinas residuais. Os autores verificaram efeito inibitório de NaCl e K₂SO₄, ambos presentes em algumas das glicerinas analisadas. Segundo esses autores, maiores concentrações desses sais na glicerina podem levar a menores velocidades máximas de crescimento de *C. necator*. Salakkam e Webb (2015) também reportam que a concentração de metanol presente na glicerina residual do biodiesel é fator inibitório para o crescimento de *C. necator*, reduzindo principalmente a velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo.

No presente estudo, apesar de não terem sido quantificadas as impurezas presentes nas glicerinas, não foi evidenciado efeito inibitório de componentes presentes nesses subprodutos, uma vez que o crescimento de *C. necator_glpFK* alcançou valores de biomassa e $\mu_{X_{tmax}}$

semelhantes em glicerol comercial e nas glicerinas (refinada e bruta), provavelmente devido a baixa disponibilidade de carbono desse substrato em comparação aos demais.

Os resultados obtidos nessa etapa evidenciaram que a vinhaça é um substrato capaz de proporcionar o crescimento de *C. necator_glpFK* com $\mu_{X_{tmax}}$ elevado. Contudo, o cultivo em vinhaça gerou baixa concentração de biomassa quando comparado às alcançadas em glicerina.

Nos cultivos realizados em glicerol, glicerina refinada e glicerina bruta *C. necator_glpFK* apresentou cinética de crescimento semelhante. Essa semelhança cinética evidencia que, nas condições estudadas, esses subprodutos não contêm concentração de inibidores capaz de reduzir o crescimento desse microrganismo. Esse fato possibilita o estudo da glicerina refinada e glicerina bruta como substratos na produção de PHB por *C. necator_glpFK*.

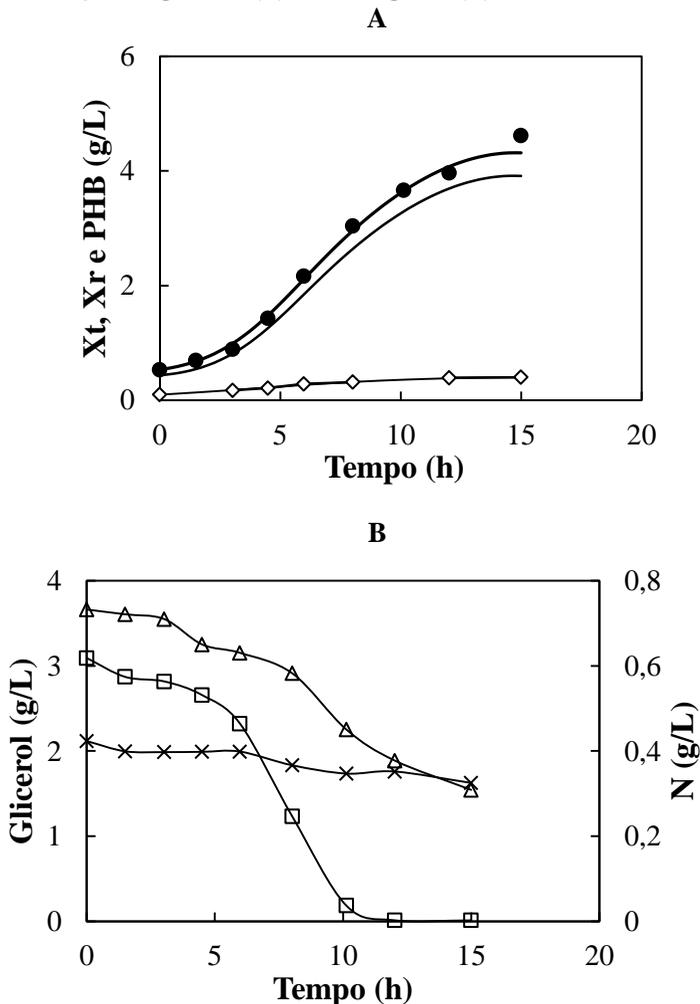
5.3 PRODUÇÃO DE PHB POR *C. necator_glpFK* EM BATELADA COM VINHAÇA, GLICERINA REFINADA E GLICERINA BRUTA EM BIORREATOR

Com o objetivo de avaliar a produção de PHB por *C. necator_glpFK*, foram realizados cultivos em biorreator nos subprodutos abordados. Três cultivos em modo batelada foram realizados tendo como substratos: vinhaça, glicerina refinada ou glicerina bruta. Assim como os cultivos em agitador orbital, os cultivos em glicerina refinada e glicerina bruta, a concentração inicial de glicerol foi de 20 g/L. Quando vinhaça foi utilizada como substrato, a concentração inicial de glicerol foi de 3,1 g/L (concentração original da vinhaça).

De acordo com Rivero e colabores (2016), cultivos de *C. necator* com concentração de nitrogênio entre 0,5 e 1,5 g/L levam a maiores concentrações de PHB, para qualquer concentração de glicerol. Sendo assim, para esses três cultivos, a concentração inicial de nitrogênio foi de 0,7 g/L.

A Figura 5.2 mostra o acompanhamento do cultivo realizado em biorreator em vinhaça, para produção de PHB por *C. necator_glpFK*. As linhas contínuas (X_t e PHB) representam os ajustes polinomiais obtidos com auxílio do *software* Microsoft Excel e o macro Lissage para esses dados. A biomassa residual (X_r) foi obtida pela diferença entre os polinômios de ajuste de biomassa total e de produção de PHB e está representada da Figura 5.2 pela linha contínua.

Figura 5.2. Cultivo de *C. necator_glpFK* em vinhaça, em batelada. (A) biomassa total (X_t) (●), biomassa residual (X_r) (-) e PHB (◇); (B) concentração de glicerol (□), de nitrogênio (Δ) e de ART (x)



A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X_{max}}$) nesse cultivo foi de $0,26 \text{ h}^{-1}$, com biomassa total máxima de $4,6 \text{ g/L}$ e máxima concentração de PHB de $0,4 \text{ g/L}$, em 15 h de cultivo. Como pode ser observado pela Figura 5.2 (B), assim como o cultivo em agitador orbital

realizado com vinhaça (Figura 5.1 B), o glicerol presente nesse substrato (3,1 g/L) foi totalmente consumido em 10 h de cultivo. O consumo de ART foi, aproximadamente, de 0,5 g/L durante todo o cultivo, não sendo evidenciado aumento do consumo dessas fontes de carbono mesmo após a exaustão da concentração de glicerol (após 10 h de cultivo).

A concentração de nitrogênio residual no tempo final do cultivo foi de 0,3 g/L (Figura 5.2 B). Segundo Ienczak e colaboradores (2011), concentrações abaixo de 0,4 g_N/L permitem acúmulo mais acentuado do biopolímero por *C. necator*. Contudo, nesse cultivo, concentrações menores de 0,4 g_N/L foram observadas somente após 10 h, quando não havia glicerol disponível. A produção de PHB por *C. necator* precisa de duas condições básicas para ocorrer. A primeira é a limitação de algum nutriente essencial, como o nitrogênio, que impede a síntese proteica e a atividade do TCA, o que eleva as concentrações de NADH e NADPH intracelulares; e a segunda condição é estar em excesso de fonte de carbono o que leva à constante produção de acetil-CoA. Elevados níveis de NADH e NADPH direcionam o acetil-CoA para a síntese de PHB (HAYWOOD, ANDERSON; DAWES, 1989). Assim, nesse cultivo não foi verificado o acúmulo expressivo de PHB por *C. necator* *glpFK*, pois as concentrações de PHB determinadas foram inferiores a 1 g/L, muito provavelmente porque a concentração de carbono não estava em excesso quando concentrações limitantes de nitrogênio foram alcançadas.

Os fatores de conversão de glicerol em biomassa ($Y_{Xr/Glicerol}$) e de glicerol em PHB ($Y_{PHB/Glicerol}$) não foram calculados. Como não existe somente glicerol nesse substrato, seria necessário a determinação do carbono orgânico total presente na vinhaça para poder calcular esses fatores de conversão (PRAMANIK et al, 2012). A produtividade em biomassa (Prod_X) do cultivo em vinhaça foi de 0,23 g_{Xr}/L.h.

Bhattacharyya e colaboradores (2012), em cultivo de *Haloferax mediterranei* (bactéria halofílica) em vinhaça e meio mineral, operando em batelada alimentada (adição de vinhaça) reportaram biomassa máxima de 17 g/L e acúmulo de 66% de PHA. Contudo, a velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo foi de 0,13 h⁻¹, menor que a encontrada nesse trabalho para *C. necator* em vinhaça (0,26 h⁻¹). É importante ressaltar que os referidos autores realizaram diluição da vinhaça em 50% para que o microrganismo não sofresse inibição, diferentemente de *C. necator* que é capaz de crescer em vinhaça pura sem inibição.

Martinhalgo e colaboradores (2013) estudaram a produção de PHB por *C. necator* DSM 545 em vinhaça e meio mineral. De acordo com esses autores, não foi verificado efeito inibitório da vinhaça no crescimento do microrganismo. Contudo, a produção de PHB em vinhaça apresentou como inconveniente a baixa concentração de carbono, apesar dos elevados valores de DQO. Como estratégia para possibilitar a produção de PHB em vinhaça, os autores realizaram adição de glicose (20 g/L) ao final da fase de crescimento. Como resultado, *C. necator* DSM 545 apresentou $\mu_{X_{rmax}}$ de $0,20 \text{ h}^{-1}$ e ao final do cultivo foi determinado 30% de acúmulo de PHB.

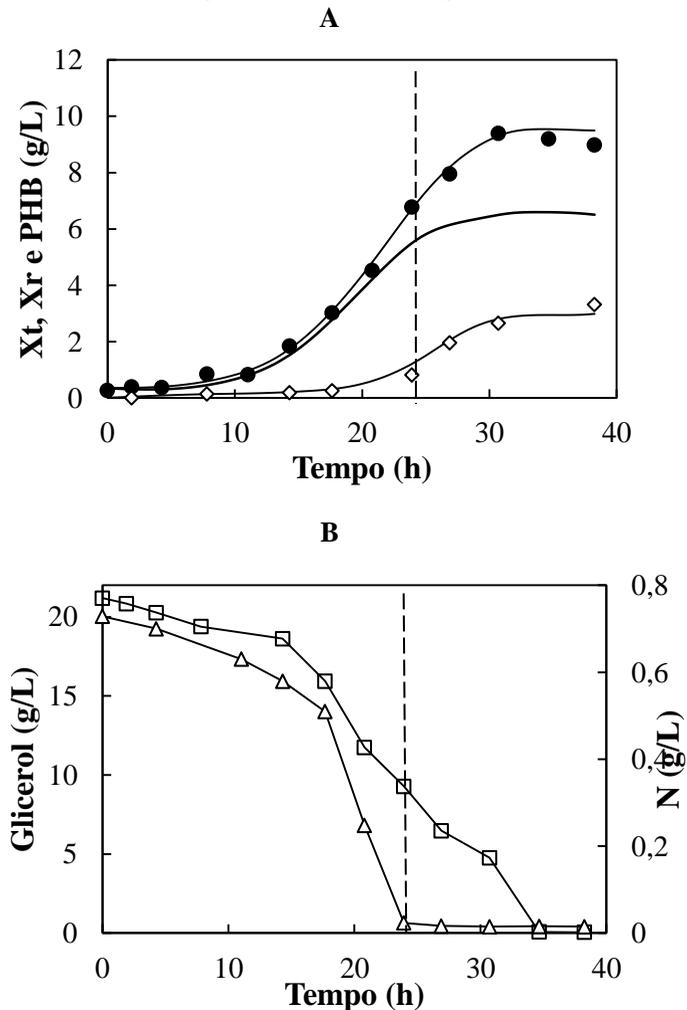
Visando a produção de PHB por *C. necator* DSM 545 com vinhaça como substrato em frascos agitados, Zanfonato e colaboradores (2014) propuseram iniciar os cultivos com vinhaça e meio mineral e adicionar volume de vinhaça na forma de pulso ao final da fase de crescimento. O pulso de vinhaça aumentou a concentração de carbono durante a fase de produção e possibilitou a produção do biopolímero. O $\mu_{X_{rmax}}$ de *C. necator* foi de $0,40 \text{ h}^{-1}$ com acúmulo de 33% de PHB. No entanto, deve-se considerar que, para realização desse cultivo em frascos, o volume inicial de vinhaça foi de 200 mL e no momento do pulso foram adicionados mais 200 mL de vinhaça ao cultivo. Essa variação de volume que é necessária para possibilitar a produção de PHB somente em vinhaça não é vantajosa do ponto de vista de estratégia de cultivo, pois é necessário um volume muito grande para um baixo acúmulo de biopolímero, quando comparado com cultivos em glicose, por exemplo.

Com a análise dos estudos reportados na literatura, pode-se dizer que a produção de PHB por *C. necator_glpFK* em vinhaça no presente estudo (Figura 5.2 A) provavelmente não foi alcançada pela falta de carbono desse substrato. Por outro lado, o $\mu_{X_{rmax}}$ obtido por *C. necator_glpFK* nesse substrato ($0,26 \text{ h}^{-1}$) é próximo ao obtido por esse microrganismo em glicose e frutose ($0,26 \text{ h}^{-1}$) (substratos preferenciais deste microrganismo) (IENCZAK et al., 2011). A combinação de vinhaça com outro substrato, que apresente maior concentração de carbono, pode ser uma alternativa para a produção de PHB utilizando vinhaça.

A Figura 5.3 mostra o acompanhamento do cultivo realizado em biorreator com glicerina refinada, para produção de PHB por *C. necator_glpFK*. As linhas contínuas (X_t e PHB) representam os ajustes polinomiais obtidos com auxílio do *software* Microsoft Excel e o macro Lissage para esses dados. A biomassa residual (X_r) foi obtida pela

diferença entre os polinômios de ajuste de biomassa total (X_t) e de produção de PHB e está representada da Figura 5.3 pela linha contínua. A linha pontilhada (vertical) indica o início da fase de produção (FP).

Figura 5.3. Cultivo de *C. necator_glpFK* em glicerina refinada, em batelada. (A) biomassa total (X_t) (●), biomassa residual (X_r) (-) e PHB (◇); (B) concentração de glicerol (□) e de nitrogênio (△)



C. necator_glpFK foi capaz de crescer e de produzir PHB em glicerina refinada. No cultivo mostrado na Figura 5.3, *C. necator_glpFK* cresceu com $\mu_{X_{rmax}}$ de $0,18 \text{ h}^{-1}$, a concentração de biomassa total foi de $9,4 \text{ g/L}$, com produção de PHB de $3,3 \text{ g/L}$ e tempo total de cultivo de 38 h. A fase de crescimento foi considerada até 24 h de cultivo, momento em que a concentração de nitrogênio era de $0,02 \text{ g/L}$ e foi determinado início do acúmulo do biopolímero. Assim, a fase de produção desse cultivo foi de 14 h ao final da qual, o percentual de acúmulo do biopolímero foi de 31%.

Quanto ao consumo de glicerol e nitrogênio (Figura 5.3 B), é possível notar que, nas primeiras horas de cultivo, o consumo desses dois substratos não foi pronunciado, provavelmente, devido à ocorrência de fase *lag* no início desse cultivo. É importante salientar que o inóculo de todos os cultivos em glicerina refinada foi realizado tendo como única fonte de carbono a glicerina refinada na mesma concentração do cultivo (20 g/L glicerol), com o intuito de diminuir ou evitar o aparecimento dessa fase. Nota-se também que o glicerol foi totalmente consumido após 35 h de cultivo.

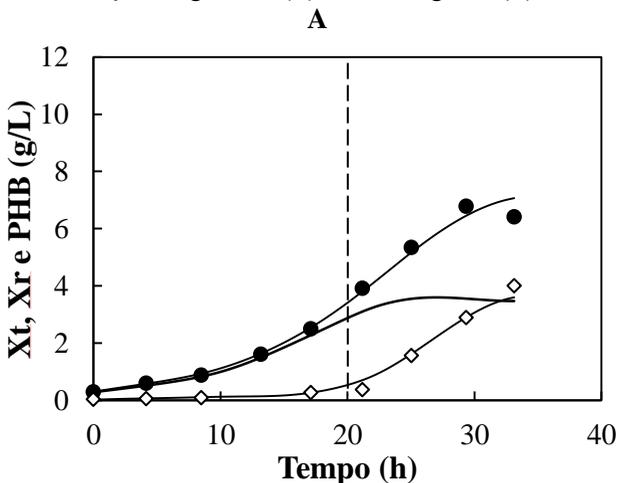
Os fatores de conversão de glicerol em biomassa residual ($Y_{Xr/Glicerol}$) e de glicerol em PHB ($Y_{PHB/Glicerol}$) foram de $0,42 \text{ g}_{Xr}/\text{g}_{\text{glicerol}}$ e $0,31 \text{ g}_{PHB}/\text{g}_{\text{glicerol}}$, respectivamente, para o cultivo com glicerina refinada como substrato. A produtividade (Q) deste cultivo foi de $0,08 \text{ g}_{PHB}/\text{L.h}$ e a produtividade em biomassa (Q_X) de $0,19 \text{ g}_{Xr}/\text{L.h}$. Em estudo utilizando *C. necator* em glicerina (99% de glicerol), Gahlawat e Soni (2017) reportaram produtividade igual à observada no presente estudo ($0,08 \text{ g}_{PHB}/\text{L.h}$). García e colaboradores (2013) reportaram $Y_{PHB/Glicerol}$ de $0,23 \text{ g/g}$ em cultivo com *C. necator* em glicerina (95% glicerol), fator de conversão menor do que o encontrado com glicerina refinada.

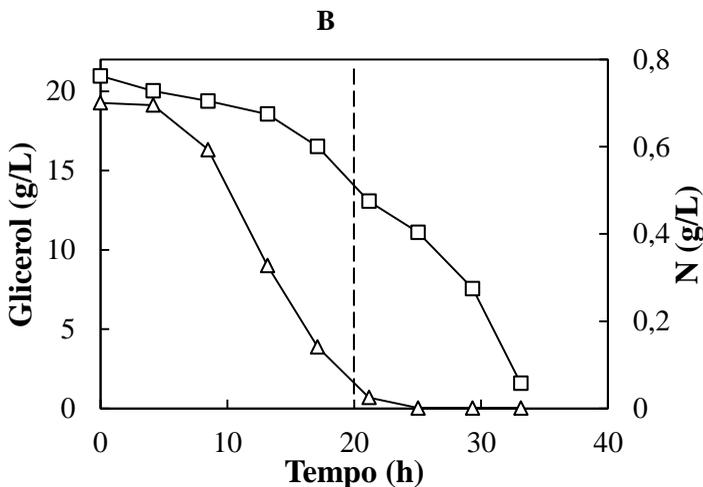
No estudo de De Paula (2017), foi proposta a utilização da bactéria *Pandora* sp., isolada de glicerina residual do biodiesel e potencial produtora de PHA, para produção de PHB em glicerina (90% glicerol). No referido estudo, essa bactéria acumulou 37% de PHB, com $Y_{PHB/Glicerol}$ de $0,16 \text{ g/g}$. Valor de fator de conversão menor ao encontrado nesse estudo ($0,31 \text{ g/g}$) por *C. necator_glpFK*, microrganismo utilizado industrialmente na produção de PHA. Isso indica que *C. necator*, mesmo não tendo como substrato preferencial o glicerol, ainda é capaz de acumular percentuais de PHB, em glicerol, maiores do que microrganismos já adaptados em crescer com glicerol, porém que apresentam menor capacidade de acúmulo do biopolímero.

A produção de PHB também foi estudada em cultivo de *C. necator_glpFK* tendo glicerina bruta como substrato. A Figura 5.4 mostra o acompanhamento do cultivo realizado em biorreator com glicerina bruta, para produção de PHB por *C. necator_glpFK*. As linhas contínuas (X_t e PHB) representam os ajustes polinomiais obtidos com auxílio do *software* Microsoft Excel e o macro Lissage para esses dados. A biomassa residual (X_r) foi obtida pela diferença entre os polinômios de ajuste de biomassa total (X_t) e de produção de PHB e está representada da Figura 5.4 pela linha contínua. A linha pontilhada (vertical) indica o início da FP.

No cultivo com glicerina bruta como substrato, X_t máximo foi de 6,8 g/L, com produção de 4 g/L de PHB e tempo total de 33 h de cultivo. A produção do biopolímero foi iniciada com 20 h de cultivo, momento em que a concentração residual de nitrogênio estava em 0,02 g/L. Sendo assim, para esse cultivo, foi determinada uma fase de crescimento até 21 h com fase de produção de 12 h.

Figura 5.4. Cultivo de *C. necator_glpFK* em glicerina bruta, em batelada. (A) biomassa total (X_t) (●), biomassa residual (X_r) (-) e PHB (◇); (B) concentração de glicerol (□) e de nitrogênio (Δ)





O $\mu_{X_{rmax}}$ foi de $0,12 \text{ h}^{-1}$ e não se observou fase *lag* durante o crescimento do microrganismo (dados não mostrados, observados em gráfico do logaritmo neperiano da biomassa residual em função do tempo). A Figura 5.4 mostra que o consumo da fonte de carbono e de nitrogênio ocorreu desde as horas iniciais do cultivo, assim como o aumento da biomassa total (X_t).

Na Figura 5.4 (B), observa-se que o consumo do glicerol da glicerina bruta foi mais acentuado desde o início do cultivo, diferente do consumo do glicerol da glicerina refinada (Figura 5.3 B).

Ao final do cultivo em glicerina bruta, foi determinada concentração residual de $1,5 \text{ g/L}$ de glicerol. Aliado a este residual de glicerol ao final do cultivo, observa-se também (Figura 5.4 A) que a concentração de biomassa total (X_t) de *C. necator_glpFK* diminuiu nas últimas horas de cultivo, comportamento que não foi verificado quando o microrganismo cresceu em glicerina refinada. De acordo com García e colaboradores (2013), uma concentração residual final de glicerina (cerca de 1 g/L) também foi observada quando se utilizou *C. necator* para produção de PHB, sendo considerado que o microrganismo possa ter alguma dificuldade para consumir concentrações baixas de glicerol.

Segundo o Certificado de Análise emitido pela empresa Biocapital (dados no apêndice 2), a concentração de sabão (sais de ácidos carboxílico que podem ser formados durante a reação de neutralização para tratamento da glicerina) presente na glicerina bruta é de 4 g/L ao passo que a glicerina refinada contém 150 ppm dessa

impureza. A presença dessa maior quantidade de sabão na glicerina bruta, em comparação à glicerina refinada, pode ter influenciado a manutenção celular nas horas finais de cultivo, fazendo com que a biomassa total do cultivo em glicerina bruta reduzisse (Figura 5.4 A).

Os fatores de conversão, $Y_{Xr/Glicerol}$ e $Y_{PHB/Glicerol}$, obtidos para o cultivo em glicerina bruta foram, respectivamente, $0,37 \text{ g}_{Xr}/\text{g}_{\text{glicerol}}$ e $0,24 \text{ g}_{PHB}/\text{g}_{\text{glicerol}}$, ambos menores que os fatores de conversão determinados no cultivo em glicerina refinada ($0,42 \text{ g}_{Xr}/\text{g}_{\text{glicerol}}$ e $0,31 \text{ g}_{PHB}/\text{g}_{\text{glicerol}}$). No entanto, a produtividade em PHB do cultivo realizado com glicerina bruta foi de $0,11 \text{ g}_{PHB}/\text{L.h}$, maior que a encontrado no cultivo realizado em glicerina refinada ($0,08 \text{ g}_{PHB}/\text{L.h}$). Essa disparidade com menores fatores de conversão e maior produtividade com glicerina bruta indica que a conversão do glicerol presente nesse substrato teve menor rendimento do que em glicerina refinada. Contudo, o tempo de cultivo com glicerina bruta foi menor (5 h, aproximadamente) do que em glicerina refinada, o que aumentou a produtividade do cultivo em glicerina bruta. A produtividade em biomassa do cultivo em glicerina bruta foi de $0,13 \text{ g}_{Xr}/\text{L.h}$, menor que a encontrado no cultivo em glicerina refinada ($0,19 \text{ g}_{Xr}/\text{L.h}$).

Gahlawat e Soni (2017) avaliaram o crescimento de *C. necator* em glicerina (40 a 60% de glicerol) subproduto do biodiesel de óleo de colza. A biomassa máxima desse cultivo foi de $5,7 \text{ g/L}$ e a produção máxima de PHB foi de $3,4 \text{ g/L}$, valores próximos aos encontrados no presente estudo. O $Y_{PHB/Glicerol}$, determinado por esses autores, foi de $0,34 \text{ g}_{PHB}/\text{g}_{\text{glicerol}}$, 30% maior que o encontrado para glicerina bruta nesse estudo, porém semelhante ao encontrado para glicerina refinada ($0,31 \text{ g}_{PHB}/\text{g}_{\text{glicerol}}$). A produtividade, no entanto, foi de $0,05 \text{ g}_{PHB}/\text{L.h}$, metade da encontrada por esse estudo em glicerina bruta ($0,11 \text{ g}_{PHB}/\text{L.h}$).

Uma compilação dos principais resultados obtidos a partir dos cultivos em batelada está apresentada em uma tabela que se encontra ao final do texto (Tabela 5.4).

A comparação de cultivos que visam a produção de PHB deve ser feita com cautela, uma vez que, vários são os fatores que podem influenciar a produção deste biopolímero. No presente trabalho, duas grandezas foram escolhidas para realizar a comparação entre cultivos, a produtividade na fase de produção (Q_p) e a velocidade específica máxima de formação de produto (qP_{max}). A Q_p foi avaliada para um mesmo tempo de fase de produção para os cultivos operados em batelada.

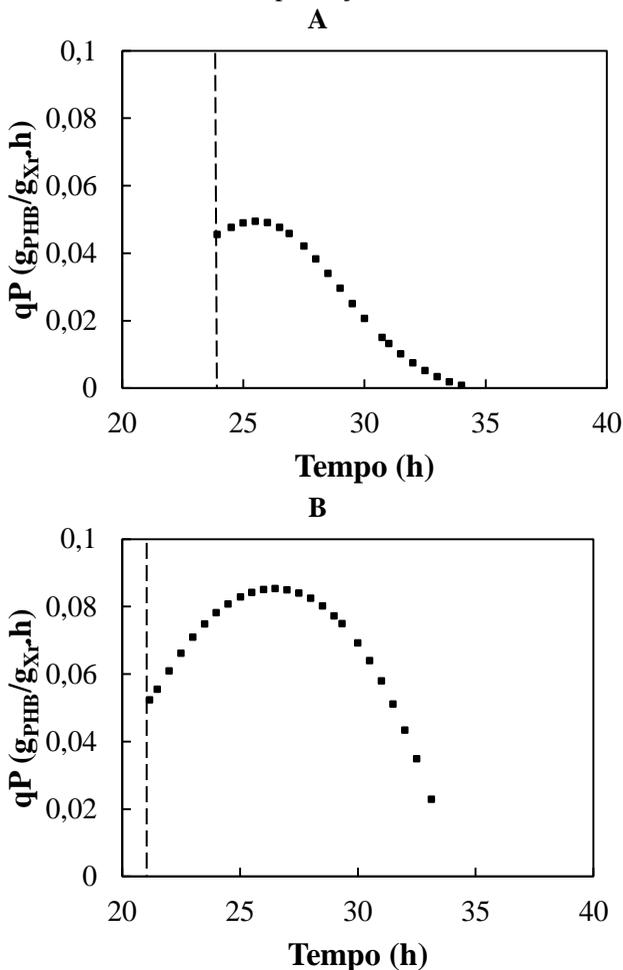
O cultivo realizado em vinhaça não teve fase de produção e por isso seus valores de Q_P e qP_{\max} não foram calculados. O cultivo em glicerina refinada apresentou 17 h de fase de produção e o cultivo em glicerina bruta, 12 h. Sendo assim, o tempo de fase de produção de 12 h foi utilizado para o cálculo de Q_P .

Os valores de Q_P dos cultivos em glicerina refinada e glicerina bruta foram de 0,19 e de 0,24 $g_{PHB}/L.h$, respectivamente. A porcentagem de acúmulo de PHB ao final de 12 h de fase de produção, que em glicerina bruta foi 50%, em glicerina refinada foi de 30%. Mostrando que, para uma mesma fase de produção, *C. necator_glpFK* foi capaz de acumular uma maior quantidade de PHB com a glicerina bruta do que com glicerina refinada. Uma hipótese para essa melhor produção em glicerina bruta é de que está pode conter algum resíduo de ácidos graxos, uma vez que glicerinias residuais da produção de biodiesel podem apresentar ácidos graxos em sua composição. Contudo, nesse estudo não foram determinados os ácidos graxos livres dos subprodutos em estudo.

O qP (velocidade específica de formação de produto) determina a velocidade de formação de PHB, levando em consideração a quantidade de células capazes de realizar esse acúmulo. A Figura 5.5 mostra os gráficos de qP em função do tempo de cultivo para os cultivos em batelada. A linha pontilhada (vertical) indica o início da fase de produção.

A determinação do qP_{\max} foi realizada pela observação do gráfico de qP em função do tempo durante a fase de produção. O qP_{\max} obtido por *C. necator_glpFK* em glicerina refinada foi de 0,05 $g_{PHB}/g_{Xr}.h$ com 25 h de cultivo, 2 h de fase de produção, como pode ser observado na Figura 5.5 (A). Em glicerina bruta (Figura 5.5 (B)), o qP_{\max} desse microrganismo foi de 0,08 $g_{PHB}/g_{Xr}.h$ com 26 h de cultivo, 5 h de fase de produção.

Figura 5.5. Velocidade específica de produção de PHB (q_P) em função do tempo para os cultivos em batelada com (A) glicerina refinada e (B) glicerina bruta durante a fase de produção



Spoljaric e colaboradores (2013) realizaram modelagem experimental da produção de PHB por *C. necator* DSM 545 em glicose e glicerol, e reportaram $q_{P_{max}}$ de $0,04 \text{ g}_{PHB}/\text{g}_{XR}.h$. Velocidade específica igual à encontrada com glicerina refinada e metade da velocidade determinada com glicerina bruta. Segundo os autores, pode ocorrer inibição do consumo de glicerol pela presença de glicose. No presente

estudo, a produção de PHB foi avaliada somente em glicerina, assim maiores valores de qP_{max} foram obtidos, provavelmente porque não houve inibição do consumo de glicerol. Além disso, a cepa *C. necator_glpFK* foi modificada para consumir glicerol de forma mais eficiente que a parental *C. necator* DSM 545, o que também pode ter auxiliado na obtenção de maiores velocidades de produção do biopolímero.

No estudo de Hermann-Krauss e colaboradores (2013), foi reportado qP_{max} de 0,04 e 0,02 $g_{PHA}/g_{Xr}.h$ para produção de PHA por *Haloferax mediterranei* em glicerol e glicerina, respectivamente. Verifica-se que os autores obtiveram esses valores de qP_{max} nas horas iniciais de fase de produção (5 h de fase de produção). No presente estudo, os valores de qP_{max} obtidos com *C. necator_glpFK* em glicerina residual do biodiesel foram maiores do que os reportados com *H. mediterranei*, mas também foram alcançados nas horas iniciais de fase de produção. Esses maiores valores de qP_{max} encontrados no presente estudo podem estar relacionados a que o microrganismo utilizado é potencial produtor de PHA, além disso foi aprimorada para melhor consumo e utilização de glicerol como fonte de carbono.

Observando a Figura 5.5 verifica-se que nos dois cultivos os valores de qP_{max} são determinados nas primeiras horas da fase de produção e, em seguida, ocorreu o decaimento do qP . Este comportamento pode ser explicado porque a célula atinge grande capacidade de produção devido à limitação de N, mas, como não ocorre a manutenção do crescimento celular (manutenção do X_r), a célula vai perdendo sua capacidade de produção do biopolímero (ARAGÃO et al., 1996). A manutenção dos valores de qP pode ser obtida com a alimentação de nitrogênio durante a fase de produção, pois o nitrogênio adicionado permite a manutenção da biomassa residual (SCHMIDT et al., 2016).

Em cultivos de *C. necator_glpFK* em batelada, com os substratos glicerina refinada ou glicerina bruta, a produção de PHB foi alcançada. Porém, os percentuais de acúmulo de biopolímero obtidos (30% em glicerina refinada e 50% em glicerina a bruta) foram inferiores quando comparados com os percentuais de acúmulo deste biopolímero reportados na literatura (até 72% em glicerina) (KACHRIMANIDOU et al., 2014). Isso torna a aplicação de diferentes estratégias de cultivo interessante na tentativa alcançar maiores percentuais de acúmulo e produtividades.

5.4 PRODUÇÃO DE PHB POR *C. necator_glpFK* EM BATELADA ALIMENTADA COM OS SUBPRODUTOS EM ESTUDO

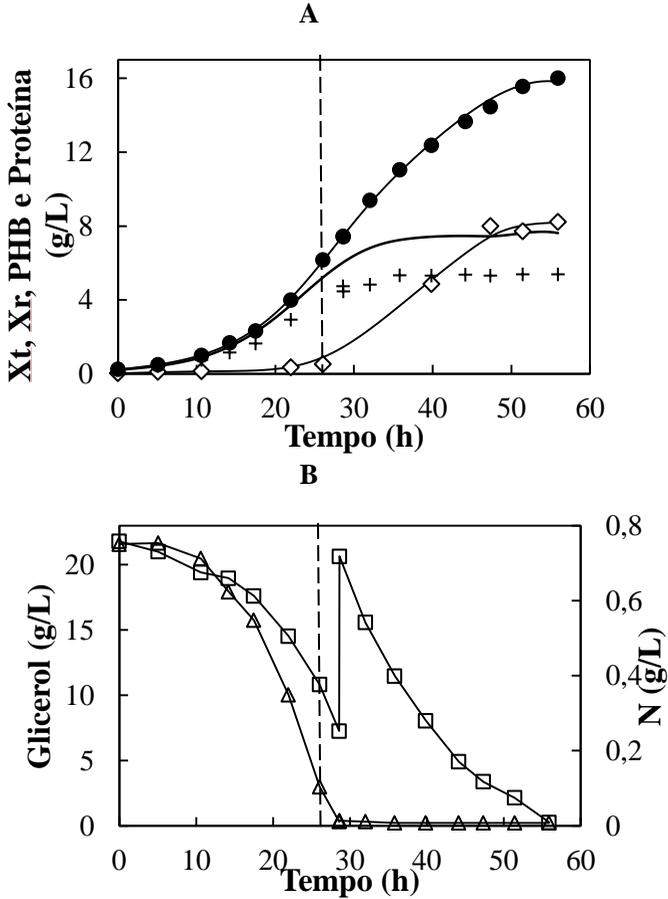
Na literatura consultada, os cultivos em batelada alimentada são amplamente reportados para produção de PHB e são caracterizados por gerarem maiores produtividades de biopolímero em comparação com cultivos em batelada (PEÑA et al., 2014). Sendo assim, a estratégia de cultivo em batelada alimentada foi proposta para aumentar a produção e produtividade de PHB em glicerina refinada e glicerina bruta.

Os cultivos foram iniciados com concentrações de 20 g/L de glicerol (da respectiva glicerina) e 0,7 g/L de nitrogênio. A alimentação da fonte de carbono (glicerina refinada ou glicerina bruta) foi realizada na forma de pulso. Como verificou-se certa dificuldade pelo microrganismo, em consumir baixas concentrações de glicerol, o pulso da fonte de carbono foi realizado quando a concentração de glicerol no biorreator era próxima a 5 g/L. Esse método foi adotado também para evitar decaimento da biomassa total por falta ou limitação da fonte de carbono.

O pulso de carbono foi realizado com adição de um volume de uma solução concentrada de glicerina refinada ou glicerina bruta aos cultivos. Também foi previamente determinado que o volume de solução adicionado fosse o necessário para que a concentração do biorreator voltasse para 20 g/L de glicerol, aproximadamente. O volume de solução adicionado, para os dois cultivos, foi cerca de 90 mL e durante todo o cultivo o volume total do biorreator, entre amostragem e adição do pulso, não foi alterado ($\pm 10\%$ do volume útil).

A Figura 5.6 mostra o acompanhamento do cultivo realizado em biorreator em glicerina refinada, para produção de PHB por *C. necator_glpFK*. As linhas contínuas (X_t e PHB) representam os ajustes polinomiais obtidos com auxílio do *software* Microsoft Excel e o macro Lissage para esses dados. A biomassa residual (X_r) foi obtida pela diferença entre os polinômios de ajuste de biomassa total (X_t) e de produção de PHB e está representada da Figura 5.6 pela linha contínua. A linha pontilhada (vertical) indica o início da fase de produção.

Figura 5.6. Cultivo de *C. necator_glpFK* em glicerina refinada, em batelada alimentada. (A) biomassa total (X_t) (●), biomassa residual (X_r) (-), PHB (◇) e proteína intracelular (+); (B) concentração de glicerol (□) e de nitrogênio (Δ)



O tempo de cultivo, em batelada alimentada de *C. necator_glpFK*, foi de 56 h. A biomassa total máxima foi de 16 g/L e produção de PHB de 8 g/L. A concentração de nitrogênio residual foi de 0,1 g/L quando o início da produção de PHB foi evidenciado. Assim, determinou-se fase de produção de 30 h e fase de crescimento celular de 26 h. Decorridas 29 h de cultivo, o pulso de carbono foi adicionado ao biorreator. Momento em que a concentração de glicerol estava em 7 g/L

e, imediatamente após o pulso, a concentração atingiu 20 g/L de glicerol.

O $\mu_{X_{rmax}}$ de *C. necator_glpFK* nesse cultivo foi de 0,14 h⁻¹ e não foi verificada fase *lag* (dados não mostrados, observados em gráfico do logaritmo neperiano da biomassa residual em função do tempo) e o início da fase estacionária foi verificado com 35 h de cultivo. Zanfonato (2016) reportou $\mu_{X_{rmax}}$ de 0,11 h⁻¹ para *C. necator_glpFK* em glicerol, segundo o autor também não foi verificada fase de adaptação (*lag*) e o microrganismo alcançou a fase estacionária em 50 h de cultivo, tempo maior que no presente estudo. Esse menor tempo para alcançar a fase estacionária, do presente estudo, pode ser uma vantagem, pois o microrganismo começa a acumular o biopolímero em menor tempo de cultivo.

Quanto ao consumo de substratos, pode-se verificar (Figura 5.6 B) que o glicerol foi totalmente consumido. Os fatores de conversão $Y_{Xr/Glicerol}$ e $Y_{PHB/Glicerol}$ para este cultivo foram de 0,43 g_{Xr}/g_{glicerol} e 0,41 g_{PHB}/g_{glicerol}, respectivamente. Em comparação ao cultivo em batelada, a batelada alimentada manteve o $Y_{Xr/Glicerol}$ (0,42 g_{Xr}/g_{glicerol} em batelada), porém o $Y_{PHB/Glicerol}$ aumentou (0,31 g_{PHB}/g_{glicerol} em batelada). Esse aumento no fator de conversão de glicerol em PHB evidencia que o aumento da quantidade de glicerol favoreceu a conversão deste em PHB.

A Q_X do cultivo foi de 0,19 g_{Xr}/L.h, mesma Q_X obtida no cultivo em batelada. A produtividade (Q) obtida para o cultivo em batelada alimentada que foi de 0,15 g_{PHB}/L.h, maior que a do cultivo em batelada (0,08 g_{PHB}/L.h). Na Figura 5.6 (B) pode-se verificar que o aumento da concentração de glicerol (pulso) foi realizado na fase de produção do biopolímero (29 h). O que justifica a proximidade de valores de Q_X e de $Y_{Xr/Glicerol}$ dos cultivos em batelada alimentada e batelada. No entanto, a produtividade (Q) e o $Y_{PHB/Glicerol}$ aumentaram, quando comparados com o cultivo em batelada, indicando que o aumento da concentração de glicerol favoreceu o acúmulo de biopolímero.

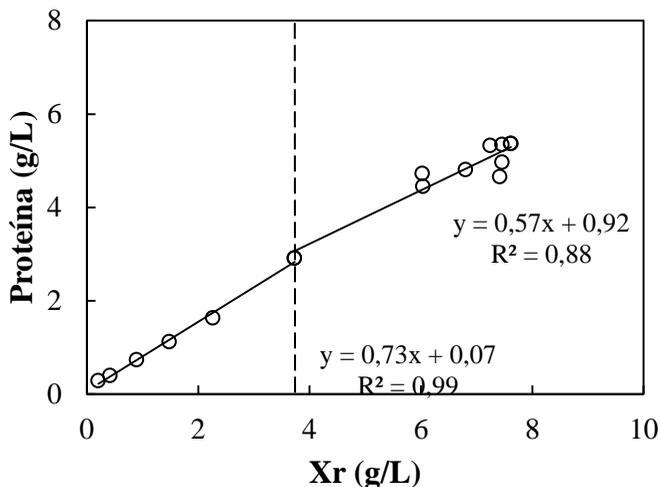
De forma geral, o aumento da quantidade de carbono na forma de pulso fez com que o acúmulo de PHB aumentasse de 31% para 52% em cultivo de *C. necator_glpFK* em glicerina refinada operando em batelada e batelada alimentada, respectivamente. Além disso, a produtividade de PHB foi aumentada no cultivo em batelada alimentada, pois o carbono adicionado foi direcionado para o acúmulo do biopolímero.

Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Kachrimanidou e colaboradores (2014). No estudo dos referidos autores, *C. necator* foi utilizada para produção de PHB operando em batelada alimentada na forma de pulsos de carbono, com glicerina (99% glicerol) como fonte de carbono. Os cultivos foram iniciados com 25 g/L de glicerol e essa concentração foi mantida até tempo final, cerca de 45 h. O $Y_{Xr/Glicerol}$ obtido foi de 0,30 $g_{PHB}/g_{glicerol}$, menor do que o observado no presente trabalho (0,41 $g_{PHB}/g_{glicerol}$). A produtividade reportada por esses autores, foi de 0,19 $g_{PHB}/L.h$ com acúmulo de 62% de PHB ao final do cultivo, ao passo que o presente estudo alcançou 52% de PHB. A diferença quanto à porcentagem de acúmulo, pode ser explicada pelo fato de os autores terem realizado diversos pulsos de carbono fornecendo ao microrganismo uma quantidade de carbono maior do que nesse estudo. Indicando que o aumento da quantidade de carbono favorece o acúmulo do PHB e a produtividade do cultivo.

Como pode ser observado na Figura 5.6, durante a fase de crescimento a quantidade de proteína intracelular é bem próxima da concentração de biomassa residual, porém na fase de produção existe um maior distanciamento dessas duas concentrações. Aragão (1996), em cultivos de *C. necator* em glicose, verificou que a composição proteica da biomassa celular se modifica ao longo da fase de produção, quando a produção de PHB ocorre em exaustão de nitrogênio. A Figura 5.7 mostra as correlações entre a proteína intracelular e a biomassa residual (X_r) durante a fase de crescimento e durante a fase de produção para cultivos de *C. necator* $glpFK$ em glicerina, a linha pontilhada (vertical) indica o início da fase de produção (FP).

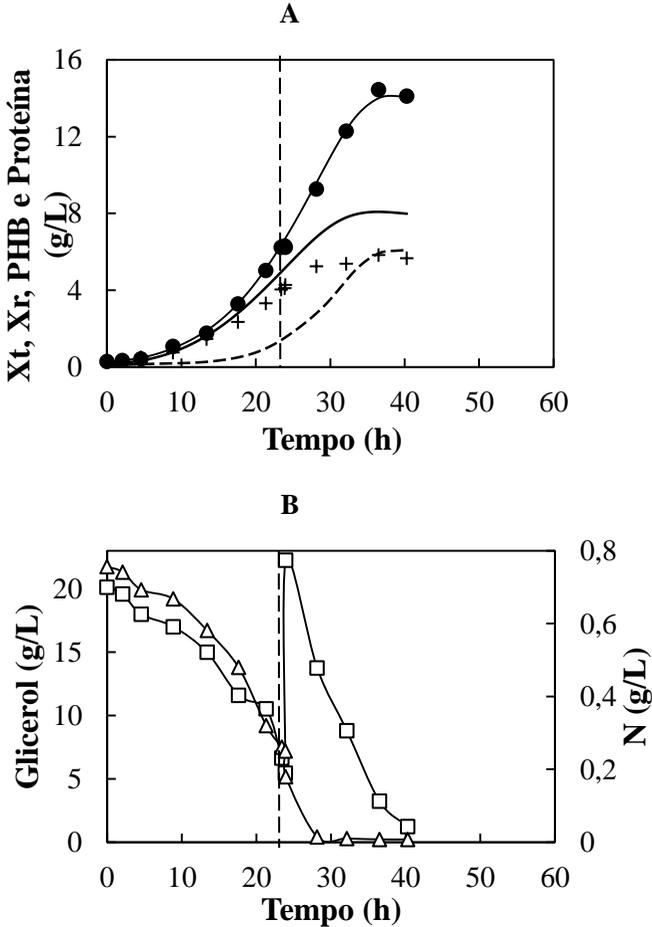
De acordo com as correlações mostradas na Figura 5.7, foi verificado que a fração de proteína na biomassa residual reduz de 73 para 57% entre a fase de crescimento e a fase de produção. Schmidt (2015), em cultivos de *C. necator* em glicose verificou redução da fração proteica da biomassa de 73 para 66% da fase de crescimento para a fase de produção, respectivamente, comportamento e valores bem próximos aos determinados no presente estudo.

Figura 5.7. Correlação entre a proteína intracelular e a biomassa residual (X_r) durante o cultivo de *C. necator_glpFK* em glicerina em batelada alimentada, a seta indica o início da fase de produção



A Figura 5.8 mostra o acompanhamento do cultivo realizado em biorreator em glicerina bruta, para produção de PHB por *C. necator_glpFK*. As linhas contínuas representam os ajustes polinomiais obtidos com auxílio do *software* Microsoft Excel e o macro Lissage para esses dados. A biomassa residual (X_r) foi estimada pelo conteúdo de proteína intracelular, utilizando as correlações de X_r e proteína obtidas na Figura 5.7. Assim, foi possível fazer a previsão do PHB intracelular, pois nesse cultivo, ocorreram problemas analíticos. A linha pontilhada (vertical) indica o início da FP.

Figura 5.8. Cultivo de *C. necator_glpFK* em glicerina bruta, em batelada alimentada. (A) biomassa total (X_t) (●), biomassa residual (X_r) (-), PHB (---) e proteína intracelular (+); (B) concentração de glicerol (□) e de nitrogênio (Δ)



Para o cultivo de *C. necator_glpFK* em glicerina bruta operado em batelada alimentada, a biomassa total máxima e produção de PHB, respectivamente, foram de 14,4 g_{X_t}/L e 5,6 g_{PHB}/L , com tempo total de cultivo de 40 h. O início da produção de PHB foi evidenciada a partir de 23 h de cultivo, momento que foi determinada concentração residual de nitrogênio de 0,2 g/L. A fase de produção deste cultivo foi de 17 h e a fase de crescimento de 23 h. A adição da fonte de carbono ocorreu em 90

24 h de cultivo, quando a concentração de glicerol do biorreator era de 5 g/L e, imediatamente após o pulso, passou para 22 g/L.

O $\mu_{X_{\text{rmax}}}$ desse cultivo foi de $0,16 \text{ h}^{-1}$, sem fase *lag* e com início da fase estacionário com aproximadamente 30 h de cultivo. Velocidade similar foi observada para cepa recombinante *C. necator* H16_glpFK crescendo em glicerol que apresentou velocidade específica máxima de crescimento de $0,15 \text{ h}^{-1}$, no estudo de Fukui e colaboradores (2014). Esta cepa recombinante foi construída com os mesmos genes (*glpF* e *glpK*) que a cepa *C. necator*_glpFK. Porém, os autores não avaliaram a produção de PHB por *C. necator* H16_glpFK em biorreator e utilizaram glicerol comercial para avaliação dessa cepa.

O consumo de glicerol não foi influenciado pela adição de carbono durante o cultivo e, assim como no cultivo em batelada com glicerina bruta, uma concentração residual de 1,3 g/L de glicerol foi quantificada ao final do cultivo. Neste cultivo, foram obtidos $Y_{X_r/\text{Glicerol}}$ e $Y_{\text{PHB}/\text{Glicerol}}$ de $0,38 \text{ g}_{X_r}/\text{g}_{\text{glicerol}}$ e $0,31 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{g}_{\text{glicerol}}$, respectivamente. A Q foi de $0,15 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{L.h}$ e a Q_X de $0,20 \text{ g}_{X_r}/\text{L.h}$. No tempo final de cultivo, a porcentagem de acúmulo de PHB foi de 43%.

Assim como nos cultivos em glicerina refinada, a batelada alimentada aumentou a produtividade de PHB dos cultivos em glicerina bruta. Pela análise das Figuras 5.8 A e 5.4 A, que mostram os cultivos com glicerina bruta em batelada alimentada e batelada, verifica-se que a produção de biomassa residual e acúmulo de PHB aumentaram dos cultivos em batelada para os cultivos em batelada alimentada. O que justifica a maior Q_X e Q do cultivo em batelada alimentada.

Quanto aos fatores de conversão, mesmo com a maior Q_X no cultivo em batelada alimentada, o $Y_{X_r/\text{Glicerol}}$ nos cultivos em batelada e batelada alimentada em glicerina bruta foram iguais; e o $Y_{\text{PHB}/\text{Glicerol}}$ aumentou de $0,24 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{g}_{\text{glicerol}}$ para $0,31 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{g}_{\text{glicerol}}$. Os aumentos de Q , Q_X e $Y_{\text{PHB}/\text{Glicerol}}$ indicam que maiores acúmulos de PHB podem ser alcançados pela realização de mais pulsos de carbono, por exemplo.

Ao final do texto está apresentada uma tabela que resume os principais resultados obtidos a partir dos cultivos em batelada alimentada tendo glicerina (refinada e bruta) como substrato (Tabela 5.4).

Em cultivo de *C. necator* DSM 545, em batelada alimentada, com açúcar invertido e glicerina (86-88% glicerol) como substrato, Sombrio e colaboradores (2017) reportaram fatores de conversão de $0,12 \text{ g}_{X_r}/\text{g}_S$ e $0,20 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{g}_S$, onde S representa o consumo de açúcar invertido e glicerol. Os fatores de conversão determinados pelos autores são

menores do que os reportados no presente estudo tendo somente glicerina como fonte de carbono. Esses resultados indicam que *C. necator_glpFK* se mostrou mais eficiente na conversão de glicerol em biomassa e PHB do que *C. necator* DSM 545, mesmo a segunda tendo dois substratos (açúcar invertido e glicerol) para consumo.

Cavalheiro e colaboradores (2009), em estudo da produção de PHB em glicerina residual do biodiesel por *C. necator*, reportaram $Y_{Xr/Glicerol}$ de 0,45 $g_{Xr}/g_{glicerol}$ e $Y_{PHB/Glicerol}$ de 0,34 $g_{PHB}/g_{glicerol}$. Fatores de conversão bem próximos aos encontrados neste trabalho, $Y_{Xr/Glicerol}$ de 0,38 $g_{Xr}/g_{glicerol}$ e $Y_{PHB/Glicerol}$ de 0,31 $g_{PHB}/g_{glicerol}$, o que indica semelhança no consumo desse substrato tanto para produção de biomassa quanto para o acúmulo de PHB.

Posto que a produção de PHB é intracelular, aumentos na produtividade do processo podem ser obtidos aumentando-se o percentual de acúmulo de PHB ou pelo aumento da biomassa capaz de acumular esse biopolímero. Assim, estratégias de cultivo com mais de um pulso de carbono ou que possibilitem que a concentração de glicerol seja mantida, podem levar a aumentos na produção de PHB em glicerina bruta.

A utilização de co-substratos, como glicose e glicerina, está sendo avaliada na literatura como estratégia de cultivo para aumentar a produtividade de PHB utilizando substratos de baixo custo (SCHROEDER, SCHNEIDER e SOMBRIO, 2003; GOULARTE et al, 2017). Nesse sentido, a utilização de vinhaça e glicerina bruta foi proposta nesse trabalho como forma de aumentar a produtividade de PHB, uma vez que o crescimento de *C. necator_glpFK* em vinhaça apresenta velocidade específica de crescimento superior ao crescimento desse microrganismo em glicerol. Essa diferença de velocidade de crescimento pode levar a menores tempos de cultivo e, como consequência, maiores produtividades. Além disso, a associação de dois substratos de baixo custo como vinhaça e glicerina pode reduzir dos custos de produção do PHB.

Como evidenciado anteriormente, cultivos de *C. necator_glpFK* em vinhaça apresentam alta velocidade específica de crescimento, porém a vinhaça não possui concentração de carbono suficiente para produção de PHB. Assim, foi realizado cultivo iniciando com vinhaça e dois pulsos de glicerina bruta foram efetuados para aumentar a concentração de carbono visando produção de PHB. A glicerina bruta foi escolhida, dentre os substratos avaliados neste estudo porque, além de possibilitar a produção de PHB por *C. necator_glpFK*, é um

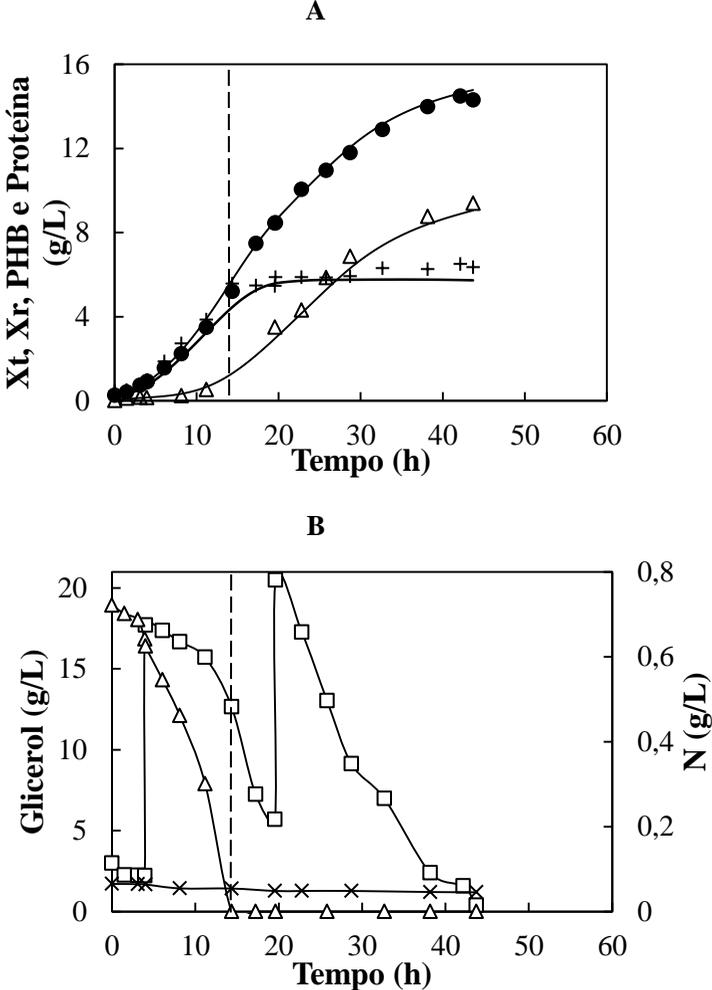
subproduto com menor grau de purificação e de menor custo, que apresentou tempos de cultivo menores em comparação com a glicerina refinada.

O tempo em que os pulsos de glicerina bruta foram realizados foi determinado da mesma forma que nos cultivos tendo glicerina refinada e glicerina bruta, quando a concentração de glicerol do cultivo estava próxima de 5 g/L. A concentração inicial de nitrogênio foi de 0,7 g/L.

A Figura 5.9 mostra o acompanhamento do cultivo realizado em biorreator em vinhaça e glicerina bruta, para produção de PHB por *C. necator_glpFK*. As linhas contínuas (X_t e PHB) representam os ajustes polinomiais obtidos com auxílio do *software* Microsoft Excel e o macro Lissage para esses dados. A biomassa residual (X_r) foi obtida pela diferença entre os polinômios de ajuste de biomassa total (X_t) e de produção de PHB e está representada da Figura 5.9 pela linha contínua. A linha pontilhada (vertical) indica o início da FP.

A biomassa total máxima foi de 14,5 g/L com produção de 9,4 g/L de PHB, em tempo de cultivo de 44 h. O acúmulo de PHB foi verificado após 14 h de cultivo, momento em que a concentração residual de nitrogênio estava em zero (Figura 5.9 B). Assim, a fase de crescimento foi determinada até 14 h de cultivo e a fase de produção foi de aproximadamente 30 h.

Figura 5.9. Cultivo de *C. necator_glpFK* em vinhaça e glicerina bruta, em batelada alimentada. (A) biomassa total (Xt) (●), biomassa residual (Xr) (-), PHB (◇) e proteína intracelular (+); (B) concentração de glicerol (□), de nitrogênio (Δ) e de ART (x)



O primeiro pulso de glicerina bruta foi realizado com 4 h de cultivo (Figura 5.9 B), momento em que a concentração de glicerol do cultivo era de 2 g/L e foi elevada a 18 g/L. O segundo pulso de glicerina bruta foi dado com, aproximadamente, 20 h de cultivo quando a

concentração de glicerol do biorreator foi elevada de 6 para 20 g/L. O consumo de ART presente na vinhaça não foi evidenciado até o tempo final de cultivo, mesmo comportamento observado nos demais cultivos realizados com esse substrato (Figura 5.9 B).

O $\mu_{X_{rmax}}$ determinado para o cultivo em vinhaça e glicerina bruta foi de $0,29 \text{ h}^{-1}$, igual ao $\mu_{X_{rmax}}$ de cultivo somente em vinhaça. Essa mesma velocidade específica máxima de crescimento era esperada, uma vez que foi determinada antes do primeiro pulso de glicerina bruta e, portanto, com crescimento somente em vinhaça. Zanfonato (2016) realizou cultivo de *C. necator_glpFK* em vinhaça e glicerol em batelada, obtendo $\mu_{X_{rmax}}$ de $0,33 \text{ h}^{-1}$, valor semelhante ao encontrado no presente estudo. O autor reportou que o glicerol não foi consumido nas seis primeiras horas de cultivo, indicando que mesmo que esse substrato estivesse disponível no início do cultivo o microrganismo não o consumiu.

O $Y_{Xr/Glicerol}$ e $Y_{PHB/Glicerol}$, do cultivo em vinhaça e glicerina bruta, foram de $0,51 \text{ g}_{Xr}/\text{g}_{glicerol}$ e de $0,31 \text{ g}_{PHB}/\text{g}_{glicerol}$, respectivamente. No cálculo para obtenção de $Y_{Xr/Glicerol}$, somente o consumo de glicerol a partir da adição da glicerina bruta foi considerado, uma vez que a vinhaça possui composição variada e não pode ser avaliada como um substrato único. O $Y_{PHB/Glicerol}$ do cultivo em vinhaça e glicerina bruta foi o mesmo obtido para o cultivo em batelada alimentada com glicerina bruta. Indicando que a adição da vinhaça não afetou a conversão de glicerol em PHB. Destaca-se que nesse cultivo com combinação de substratos foi obtido o maior $Y_{Xr/Glicerol}$, evidenciando que a adição da vinhaça, além de não afetar a conversão de glicerol em PHB, impulsionou maior formação de biomassa residual.

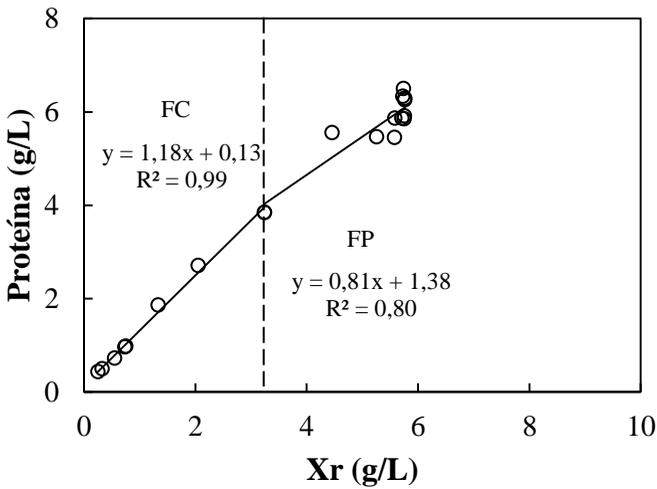
Quanto às produtividades, a Q do cultivo em vinhaça e glicerina bruta foi de $0,22 \text{ g}_{PHB}/\text{L.h}$ e a Q_X de $0,25 \text{ g}_{Xr}/\text{L.h}$, ambas foram as maiores obtidas nesse estudo. No tempo final de cultivo, a porcentagem de acúmulo de PHB foi de 64%.

Em estudo da produção de PHB por *C. necator* em açúcar invertido e glicerol, com glicerol adicionado somente na fase de produção do biopolímeros, Schroeder, Schneider e Sombrio (2003) reportaram Q de $0,26 \text{ g}_{PHB}/\text{L.h}$ com acúmulo de 60% de PHB, valores próximos aos alcançados em vinhaça e glicerina bruta. Os fatores de conversão, reportado pelos autores, foram de $0,20 \text{ g}_{Xr}/\text{g}_S$ e $0,22 \text{ g}_{PHB}/\text{g}_S$, sendo o segundo obtido pelo consumo total de substrato (glicerol e açúcar invertido). Verifica-se que, no cultivo com vinhaça e glicerina bruta, fatores de conversão maiores foram obtidos ($0,51 \text{ g}_{Xr}/\text{g}_{glicerol}$ e de

0,31 $\text{g}_{\text{PHB}}/\text{g}_{\text{glicerol}}$), indicando que, para alcançar mesma Q e acúmulo de PHB dos cultivos com açúcar invertido e glicerol, é necessária maior quantidade de substrato do que nos cultivos com vinhaça e glicerina bruta.

Na Figura 5.9 é possível observar o comportamento da proteína intracelular e da concentração de X_r , verificando que a quantidade de proteína em alguns momentos, principalmente na fase de crescimento, é maior do que a quantidade de biomassa total. A Figura 5.10 mostra a correlação entre a proteína intracelular e a biomassa residual (X_r) para o cultivos de *C. necator_glpFK* em vinhaça e glicerina. A linha pontilhada (vertical) indica o início da FP.

Figura 5 10. Correlação entra a proteína intracelular e a biomassa residual (X_r) durante o cultivos de *C. necator_glpFK* em vinhaça e glicerina em batelada alimentada, a linha pontilhada indica o início da fase de produção (FP) e final da fase de crescimento (FC)



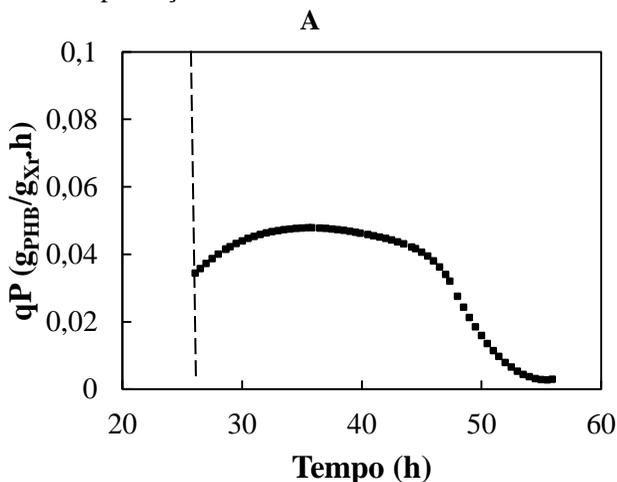
Para esse cultivo as correlações de proteína intracelular e X_r foram superior a 100% na fase de produção e de 81% na fase de crescimento. Assim como no cultivo somente em glicerina (Figura 5.7), o comportamento de redução da fração de proteína na biomassa residual durante a fase de produção do biopolímero também foi verificado. Aragão (1996), em cultivo de *C. necator* em glicose, também verificou

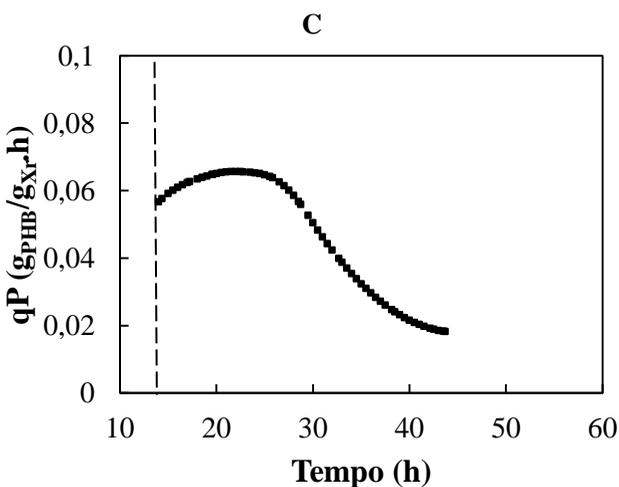
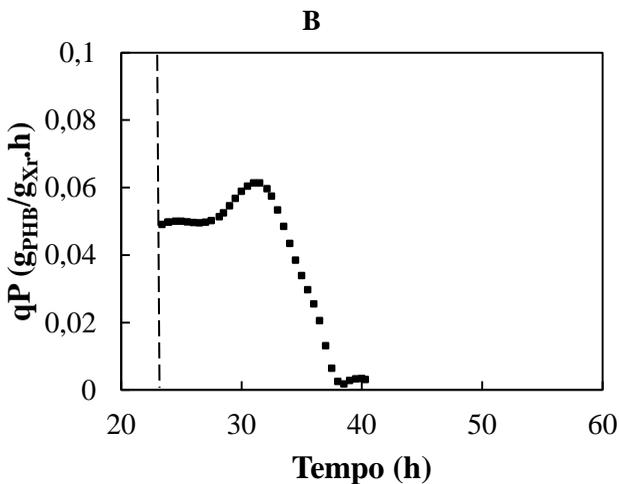
esse mesmo comportamento e redução, com fração de 80% ao final da fase de crescimento e 40% ao final da fase de produção.

A correlação encontrada entre proteína e biomassa residual, durante a fase de crescimento do cultivo em vinhaça e glicerina, não é coerente, pois a quantidade de proteína intracelular não pode ser maior do que a quantidade de biomassa. Acredita-se que isso pode ter ocorrido em função da utilização de um subproduto de composição variada como substrato, a vinhaça. Esse subproduto pode ter interferido nas metodologias utilizadas no presente estudo.

Como forma de comparar a produtividade dos cultivos realizados em batelada alimentada, a produtividade na fase de produção (Q_P) e o qP_{\max} foram levados em consideração. A determinação de qP_{\max} de cada cultivo foi realizada pela observação do gráfico de qP pelo tempo. A Figura 5.11 mostra os gráficos de qP pelo tempo para os cultivos em batelada alimentada com glicerina refinada, glicerina bruta e vinhaça e glicerina bruta. As linhas pontilhadas (vertical) indicam o início da fase de produção.

Figura 5 11. Velocidade específica de produção de PHB (qP) em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada com (A) glicerina refinada, (B) glicerina bruta e (C) vinhaça e glicerina bruta durante a fase de produção





Em batelada alimentada, os qP_{\max} foram de 0,05, 0,06 e 0,08 $g_{\text{PHB}}/g_{\text{Xr}} \cdot h$, respectivamente para os cultivos em glicerina refinada, glicerina bruta e vinhaça e glicerina bruta (Figura 5.11 (A), (B) e (C), respectivamente). Nos cultivos com glicerina refinada e glicerina bruta, os qP_{\max} foram obtidos após, aproximadamente, 7 h de fase de produção, com 33 h e 31 h de cultivo, respectivamente. Com vinhaça e glicerina bruta o qP_{\max} foi alcançado com 2 h de fase de produção, 16 h de cultivo. Destaca-se o qP_{\max} obtido em vinhaça e glicerina bruta, além de

ter sido o maior dentre os cultivos, foi alcançado com menor tempo de fase de produção e de cultivo e foi mantido durante metade da fase de produção (Figura 5.11 (C)).

Segundo Grousseau e colaboradores (2013) em estudo de modelagem experimental do processo de produção de PHB por *C. necator*, a manutenção da velocidade específica de crescimento (μ_{Xr}) não afeta a produção de PHB e aumenta a velocidade específica de formação de produto (q_P). É mais do que alcançar valores altos de $q_{P_{max}}$ é importante que essa velocidade de formação de PHB seja mantida durante a fase de produção, afim de se obter maior acúmulo do biopolímero. Essa manutenção do $q_{P_{max}}$ resultou em maior acúmulo para o cultivo com glicerina refinada em batelada alimentada (52%) (Figura 5.11 (A)), em comparação ao cultivo em batelada com esse mesmo substrato (30%) (Figura 5.5 (A)). Apesar da diferença dos $q_{P_{max}}$ dos cultivos em batelada e batelada alimentada com glicerina bruta, esse parâmetro não foi mantido (Figura 5.5 (B) e Figura 5.11 (B), respectivamente), ele alcançou valor máximo e decaiu em seguida. Estudos futuros podem ser realizados com a alimentação de nitrogênio limitante durante a fase de produção, pois já foi comprovado que essa estratégia de cultivo mantém os valores de q_P .

Schmidt e colaboradores (2016), em estudo da produção de PHB-co-HV por *C. necator* DSM 545 em glicose e frutose, reportaram valor máximo de q_P de 0,13 $g_{PHB}/g_{Xr}\cdot h$, valor próximo ao obtido em batelada alimenta com substratos combinados (vinhaça e glicerina bruta). Os autores realizaram cultivo em batelada sequencial e com reciclo de células, estratégias que podem ser consideradas tendo como substrato os subprodutos aqui estudados, visando o aumento da velocidade específica de formação de produto e a produtividade em PHB.

Como nos cultivos em batelada, foi determinado um tempo de fase de produção único e calculou-se Q_P de todos os cultivos em batelada alimentada. Como os cultivos em batelada alimentada em glicerina refinada, glicerina bruta e vinhaça e glicerina bruta apresentaram, 30, 17 e 30 h de fase de produção, respectivamente, os cálculos de Q_P foram realizados para uma fase de produção de 17 h. A Q_P dos cultivos em glicerina refinada, glicerina bruta e vinhaça e glicerina bruta foram de 0,31, 0,28 e 0,35 $g_{PHB}/L\cdot h$, respectivamente, para 17 h de fase de produção. A porcentagem de acúmulo de PHB ao final de 17 h de fase de produção foi de 42% para cultivo em glicerina refinada, 43% em glicerina bruta e 58% em vinhaça e glicerina bruta.

Dessa forma, o cultivo realizado em vinhaça adicionado de glicerina bruta, além de apresentar maior valor de $\mu_{X_{rmax}}$ ($0,29 \text{ h}^{-1}$), maior fator de conversão de glicerol em biomassa residual ($0,51 \text{ g}_{X_r}/\text{g}_{\text{glicerol}}$) e maior produtividade ($0,22 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{L.h}$), também apresentou maior Q_p destacando-se dentre as estratégias de cultivo para produção de PHB avaliadas nesse estudo.

A Tabela 5.4 apresenta em resumo os resultados obtidos pelos cultivos de *C. necator_glpFK* visando a produção de PHB realizados durante o presente estudo.

Tabela 5.4. Valores de velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), fatores de conversão de glicerol em biomassa residual ($Y_{Xr/Glicerol}$) e de glicerol em PHB ($Y_{PHB/Glicerol}$), produtividade (Q), produtividade em biomassa (Q_X), produtividade na fase de produção (Q_P) e velocidade específica máxima de formação de PHB (qP_{\max}), para os cultivos realizados com *C. necator_glpFK*

Substrato	Modo de Operação	$\mu_{Xr\max}$ (h^{-1})	$Y_{Xr/Glicerol}$ ($g_{Xr}/g_{glicerol}$)	$Y_{PHB/Glicerol}$ ($g_{PHB}/g_{glicerol}$)	Q ($g_{PHB}/L.h$)	Q_X ($g_{Xr}/L.h$)	Q_P ($g_{PHB}/L.h$)	qP_{\max} ($g_{glicerol}/g_{Xr.h}$)
Vinhaça	Batelada	0,26	-	-	-	0,23	-	-
G Refinada	Batelada	0,18	0,42	0,31	0,08	0,19	0,14*	0,05
G Bruta	Batelada	0,12	0,37	0,24	0,11	0,13	0,24*	0,08
G Refinada	Batelada Alimentada	0,14	0,43	0,41	0,15	0,19	0,31**	0,05
G Bruta	Batelada Alimentada	0,16	0,38	0,31	0,15	0,20	0,28**	0,06
Vinhaça e G Bruta	Batelada Alimentada	0,29	0,51	0,31	0,22	0,25	0,35**	0,08

Legenda: O símbolo (-) indica que os dados não foram calculados; (*) dados calculados para 12 h de fase de produção; (**) dados calculados para 17 h de fase de produção.

De forma geral, os valores de velocidade específica máxima de crescimento de *C. necator_glpFK* foram menores em glicerina do que em vinhaça. A associação dos substratos vinhaça e glicerina foi satisfatória para esse parâmetro, uma vez que, mesmo adicionando-se a glicerina durante o crescimento do microrganismo, esse manteve o μ_{Xrmax} elevado.

Fatores de conversão teóricos são obtidos fazendo-se a consideração de que todo o substrato fornecido a um determinado microrganismo é convertido ou em biomassa ou em bioproduto. O fator de conversão teórico de glicerol em biomassa é de $0,43 \text{ g}_{Xr}/\text{g}_{\text{glicerol}}$ (YAMANE, 1992). Valor semelhante aos $Y_{Xr/\text{Glicerol}}$ obtidos para todos os cultivos tendo glicerina residual do biodiesel como substrato, que variaram entre 0,37 e $0,43 \text{ g}_{Xr}/\text{g}_{\text{glicerol}}$ (Tabela 5.4). O $Y_{Xr/\text{Glicerol}}$ obtido para o cultivo com a associação de substratos (vinhaça e glicerina bruta) foi maior que o valor teórico para essa grandeza, mesmo esse valor tendo sido calculado somente quando o principal substrato era o glicerol. Isso evidencia que algum outro substrato presente na vinhaça pode ter sido consumido concomitantemente ao consumo de glicerol.

O fator teórico de conversão de glicerol em PHB é de $0,47 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{g}_{\text{glicerol}}$, porém obter esse valor experimentalmente é muito difícil, já que se sabe que os microrganismos, mesmo durante a fase de produção, utilizam uma quantidade de glicerol para manutenção celular (ACKERMANN e BABEL, 1998). Na literatura são reportados valores entre 0,25 e $0,35 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{g}_{\text{glicerol}}$ para essa grandeza. Observando a Tabela 5.4, é possível verificar que todos os $Y_{\text{PHB}/\text{Glicerol}}$ determinados foram menores que o fator de conversão teórico para esse substrato, porém encontram-se dentro da faixa de valores observados experimentalmente e reportados na literatura.

Segundo Schmidell e colaboradores (2001), a produtividade, em vez dos fatores de conversão, deve ser empregada como referência numérica para avaliação de um processo, principalmente nos processos nos quais o tempo de duração é de primordial importância por razões econômicas, como no caso da produção de PHB. Verificou-se que todos os cultivos apresentaram valores de Q_X próximos a $0,2 \text{ g}_{Xr}/\text{L.h}$. Essa uniformidade para essa grandeza era esperada, uma vez que todos os cultivos iniciaram com a mesma concentração de nitrogênio e de carbono (glicerol). Nos cultivos em que carbono foi adicionado, essa adição ocorreu na fase de produção. Avaliando a Q_P os cultivos realizados em batelada alimentada foram os que apresentaram melhores resultados.

A observação dos valores de Q demonstra que a realização de cultivos em batelada alimentada aumentou a produtividade em PHB. Contudo essa grandeza apresentou maior valor quando foi realizado o cultivo em batelada alimentada com substratos combinados (vinhaça e glicerina bruta), em que a Q foi de $0,11 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{L.h}$ (glicerina bruta-batelada) para $0,22 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{L.h}$. Dessa forma, a produtividade e acúmulo de PHB foram aumentados não somente com cultivos em batelada alimentada mas também pela combinação de substratos.

6. CONCLUSÃO

A produção de PHB por *C. necator* recombinante tendo como substratos glicerina refinada, glicerina bruta, ambas subprodutos da indústria do biodiesel; e vinhaça subproduto da indústria de etanol de primeira geração pode ser realizada satisfatoriamente. A presente estudo permite concluir que:

- Pela caracterização dos substratos é possível determinar que a vinhaça apresenta composição variada tendo como principais fontes de carbono o glicerol e os açúcares redutores, e que o glicerol é o componente majoritário dos glicerininas refinada (99,5%) e bruta (83,0%) em estudo.

- O crescimento de *C. necator_glpFK* em glicerol, glicerina refinada e glicerina bruta, apresenta velocidades específicas máximas de crescimento semelhantes. Não é evidenciada inibição no crescimento do microrganismo pelo uso das glicerininas residuais e vinhaça. No entanto, existe diferença entre a velocidade específica máxima de crescimento desse microrganismo em vinhaça (μ_{xtmax} de $0,40 \text{ h}^{-1}$) e nas glicerininas (μ_{xtmax} de $0,11 \text{ h}^{-1}$).

- A produção de PHB por *C. necator_glpFK*, em cultivos em batelada, é verificada tanto em glicerina refinada como em glicerina bruta, com acúmulo de PHB de 31 e 50% e produtividade de 0,08 e 0,11 $\text{g}_{\text{PHB}}/\text{L.h}$, respectivamente. O melhor desempenho da glicerina bruta na produção de PHB em comparação a glicerina refinada pode ser atribuído a presença de outros componentes nessa glicerina os quais não foram determinados no presente estudo. *C. necator_glpFK* é capaz de crescer em vinhaça, porém a produção de PHB nesse substrato é menor que 1 $\text{g}_{\text{PHB}}/\text{L}$.

- A estratégia de cultivo de batelada alimentada com o aumento da concentração de carbono aumenta a produtividade (Q) de cultivos em glicerina refinada e glicerina bruta em comparação aos cultivos em batelada. A combinação de substratos (vinhaça e glicerina bruta) em batelada alimentada é a melhor estratégia avaliada no presente estudo, com a melhor Q (0,22 $\text{g}_{\text{PHB}}/\text{L.h}$) e acúmulo de 64% de PHB. Provavelmente porque a utilização de vinhaça aumenta a velocidade específica de crescimento de *C. necator_glpFK* em comparação a glicerina. Aliado a isso, o aumento da concentração de carbono desse

cultivo com adição da glicerina bruta proporciona maior produção de PHB em comparação aos demais ensaios.

Esses resultados são importantes porque comprovam que *C. necator_glpFK* é capaz de crescer em gliceras provenientes da indústria do biodiesel sem alterações nos seu crescimento. A produção de PHB por esse microrganismo em glicerina é alcançada tanto em batelada como em batelada alimentada e a combinação de glicerina e vinhaça apresenta-se como alternativa promissora.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterizar a vinhaça quanto à composição de ácidos orgânicos, as glicerinas quanto à composição de ácidos graxos e carbono orgânico total em ambos os substratos.
- Caracterizar o biopolímero produzido por *C. necator_glpFK* em glicerina refinada, glicerina bruta e vinhaça e glicerina bruta, utilizando técnicas de caracterização como espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).
- Realizar cultivos de *C. necator_glpFK* em vinhaça e glicerina bruta visando alta concentração celular através do aumento da concentração inicial de nitrogênio, reciclo de células e manutenção da concentração de glicerol constante durante a fase de produção.

REFERÊNCIAS

AEKERMANN, J. U.; BABEL, W. Approaches to increase the economy of the PHB production. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 18-186, 1998.

ALBUQUERQUE, M. F. G. de A. **Tratamento do glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel visando a geração de metano**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Ouro Preto, 2014.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS *Procução Nacional de Biocombustíveis - Ano 2017* Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/dados-estatisticos>> Acesso em: 15 Jan 2017.

APHA, AWWA, WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater 19th. **American public health association**. Washington, DC. 1995.

ARAGÃO, G. M. F. **Production de polyhydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures**. Tese de Doutorado (Doctorat spécialité: Biologie et genetique Moleculaires et Cellulaires – Biotechnologie) – Instituto Nacional de Ciências aplicadas de Toulouse, Toulouse. 1996.

ARAGÃO, G. M. F.; LINDLEY, ND.; URIBELARREA, J. L.; PAREILLEUX, A. Maintaning a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v.18, n. 8, 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.

ARDI, M. S.; AROUA, M. K.; HASHIM, N. A. Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1164-1173, 2015.

BARKER, T. W.; QUINN, J. P.; MARCHANT, R. The Use of a mixed culture of *Geotrichum candidum*, *Candida krusei* and *Hansenula anomala* for Microbial Protein Production from Whiskey Distillery Spent Wash. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 247-253, 1982.

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.

BHATTACHARYYA, A.; PRAMANIK, A.; MAJI, S. K.; HALDAR, S.; MUKHOPADHYAY, U. K.; MUKHERJEE, J. Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. **AMB Express**, v. 2012, 2012.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of Poly(β -Hydroxyalkanoates) for potential application as biodegradable polyester. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977-1982, 1988.

BUDDE, C. F.; RIESEL, 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, n. 9, p. 2847-2854, 2011.

BUENEMANN, T.; OUDEJANS, J.; GAMBA, P.; RAMPI, A. Process for purification crude glycerol. **Patente n°4990695**, United States Patent, 1991.

CAMARGO, J. A.; PEREIRA, N.; CABELLO, P.R.; TERAN, F.J.C. Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para a análise da atividade microbiana de solos sob a aplicação de vinhaça. **Engenharia Ambiental**, v. 6, p. 264-271, 2009

CASTILHO, L. R.; MITCHELL, D. A.; FREIRE, D. M. G. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products

by submerged and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5996–6009, 2009.

CAVALHEIRO, J. M. B. T.; de ALMEIDA, M. C. M. D.; GRANDFILS, C.; da FONSECA, M. M. R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 509-515, 2009.

CHAKRABORTY, P.; GIBBONS, W.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Conversion of volatile fatty acids into polyhydroxyalkanoate by *Ralstonia eutropha*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1996-2005, 2009.

CHEN Y. H.; WALKER, T. H. Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoide* by using biodiesel-derived crude glycerol. **Biotechnology Letters**, v. 33; p. 1973-1983, 2011.

CHI, Z.; PYLE, D.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 1537-1545, 2007.

CHRISTOFOLETTI, C. Ap.; ESCHER, J. P.; CORREIA, J. E.; MARINHO, J. F. U.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, p. 2752-2761, 2013.

COCA, M.; BARROCAL, V. M.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 306–312, 2015.

COELHO, J. M.; Planejamento Energético Nacional: Perspectivas de demanda e oferta de Etanol, Gasolina, Biodiesel e Diesel. **10º Edição do Fórum Nordeste – Oportunidades nos Setores de Biocombustíveis, Etanol e Energias Limpas**. 25 de Setembro de 2017, Recife – PE, Brasil.

CORTEZ, L.A.B.; SILVA, A.; DE LUCAS JUNIOR, J.; JORDAN, R.A.; DE CASTRO, L.R. *Biodigestão de Efluentes*. **Biomassa para Energia**, Editora UNICAMP, Campinas, pp. 493–529, 2007.

CRIMINNA, R.; PINA, C. D.; ROSSI, M.; PAGLIARO, M. Understanding the glycerol Market. **Europe Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, p. 1432-1439, 2014.

DALCANTON, F.; IENCZAK, J. L.; FIORESE, M. L.; ARAGÃO, G. M. F. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in hydrolyzed rice starch medium with soybean oil supplementation at different temperatures. **Química Nova**, n. 3, v. 33, p. 552–556, 2010.

De PAULA, F. C.; KAKAZU, S.; De PAULA, C. B. C.; GOMEZ, J. G. C.; CONTIERO, J. Polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol by newly isolated *Pandorae* sp.. **Journal of King Saud University – Science**, v. 29, p. 166-173, 2017.

DIETRICH, K.; DUMONT, M. J.; DEL RIO, L. F.; ORSAT, V. Production PHAs in the bioeconomy – Towards a sustainable bioplastic. **Sustainable Production and Consumption**, v. 9, p. 58-70, 2017.

DOELSCH, E.; MASION, A.; CAZEVIEILLE, P.; CANDOM, N. Spectroscopic characterization of organic matter of a soil and vinasse mixture during aerobic or anaerobic incubation. **Waste Management**, v. 29, n. 6, p. 1929-1935, 2009.

ESPANA-GAMBOA, E; CORTES, J. M.; PEREZ, L. B.; MALDONADO, J. D.; ZARATE, G. H.; GAVIRIA, L. A. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management & Research**, v. 29, n. 12, p. 1235–1250, 2011.

FLIEGER, M.; KANTOROVÁ, M.; PRELL, A.; REZANKA, T.; VOTRUBA, J. Biodegradable plastics from renewable sources. **Folia microbiologica**, v. 48, n. 1, p. 27–44, 2003.

FOUNTOULAKIS, M.S.; PETOUSHI, I.; MANIOS, T. Co-digestion of sewage sludge with glycerol to boost biogas production. **Waste Management**, v. 20, n.10, 1849-1853. 2010.

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: setembro 2017.

FUESS, L. T.; ZAIAT, M. Economics of anaerobic digestion for processing sugarcane vinasse; Applying sensitivity analysis to increase process profitability in diversified biogas applications. **Process Safety and Environmental Protection**, article in press, 2017.

FUKUI, T.; MUKOYAMA, M.; ORITA, I.; NAKAMURA, S. Enhancement of glycerol utilization ability of *Ralstonia eutropha* H16 for production of polyhydroxyalkanoates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014.

GAHLAWAT, G.; SONI, S. K. Valorization of waste glycerol for the production of poli(3-hydroxybutyrate) and poly(3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Cupriavidus necator* and extraction in sustainable manner. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 492-501, 2017.

GARCIA, C. F. H.; SOUZA, R. B.; SOUZA, C. P.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; FONTANETTI, C. S. Toxicity of two effluents from agricultural activity: Comparing the genotoxicity of sugar cane and orange vinasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 216-221, 2017.

GARCÍA, I. L.; LÓPEZ, J. A.; DORADO, M. P.; KOPSAHELIS, N.; ALEXANDRI, M.; PAPANIKOLAOU, S.; VILLAR, M. A.; KOUTINAS, A. A. Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Cupriavidus necator*. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 16-22, 2013.

GOMES, J. R. Projeto do Renova BIO entregue à Câmara prevê salto no uso de biocombustíveis no país. **Jornal O Globo** 14 de Nov 2017. Disponível em: <<https://br.reuters.com/article/businessNews/idBRKBN1DE2N3-OBRS>> Acesso em: Jan de 2018.

GOMES, M. T. de M. S.; EÇA, K. S.; VIOTTO, L. A. Concentração da vinhaça por microfiltração seguida de nanofiltração com membranas.

Pesquisa Agropecuária do Brasil, EMPRABA, v. 46, n. 6, p. 633-638, 2011.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biureto reaction. **Journal of Biological Chemistry**, n. 177, p. 751-766, 1949.

GOULARTE, P. G.; ZANFONATO, K.; BOEIRA, C. Z.; ALVES, H.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F. Growth poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using glycerol and glucose. **XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)**, Aracajú – Brasil, Setembro, 2017.

GROUSSEAU, E.. **Potentialités de production de Poly-Hydroxy-Alcanoates chez *Cupriavidus necator* sur substrats de type acides gras volatils : études cinétiques et métaboliques**. Tese de doutorado (Engenharia Enzimática e Microbiana). Instituto Nacional de Ciências aplicadas de Toulouse, Toulouse- FR, 2012.

GROUSSEAU, E.; BLANCHET, E.; DELERIS, S.; ALBUQUERQUE, M. G. E.; PAUL, E.; URIBELARREA, J. L. Impact of sustaining a controlled residual growth on polyhydroxybutyrate yield and production kinetics in *Cupriavidus necator*. **Bioresource Technology**, v, 148, p. 30-38, 2013.

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**, n. 1, v. 57, p.1-6, 1989.

HERMANN-KRAUSS, C.; KOLLER, M.; MUHR, A.; FASL, H.; STELZER, F.; BRAUNEGG, G. Archaeal production of polyhydroxyalkanoate (PHA) co- and terpolyesters from biodiesel industry-derived by-product. **Aecheal**, v. 2013, 2013

HU, S. J.; LUO, X. L.; WAN, C. X.; LI, Y. B. Characterization of Crude Glycerol from Biodiesel Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5915–5921, 2012.

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.; de MELO, A. A.; BRANDELLERO, M.; MENDES, C. R.; SCHIMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F. High cell density strategy for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, n. 4, v. 28, p. 585-596, 2011.

ISAHAK, W.N.R.W.; RAMLI, Z.A.C.; ISMAIL, M.; JAHIM, J.M.; YARMO, M.A. Recovery and purification of crude glycerol from vegetable oil transesterification. **Separation and Purification Reviews**, n. 3, v. 44, p. 250-267, 2015.

KACHRIMANIDOU, V.; KOPSAHELIS, N.; PAPANIKOLAOU, S.; KOOKOS, I. K.; BRUYN, M.; CLARK, J. H.; KOUTINAS, A. A. Sunflower-based biorefinery: Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate) production from crude glycerol, sunflower meal and levulinic acid. **Bioresource Technology**, v. 172, p. 121-130, 2014.

KANJANACHUMPOL, P.; KULPREECHA, S.; TOLIENG, V.; THONGCHUL, N. Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36 p. 1463–1474, 2013.

KAPDAN, I. K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 569-582, 2006.

KNOTHE, G.; VAN GERPEN, J.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. Manual do Biodiesel. Ed. **Edgard Blücher**, cap. 11, São Paulo, 2006.

KOLLER, M.; BRAUNEGG, G. Potencial and Prospects of Continuous Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. **Bioengineering**, v. 2, p. 94-121, 2015.

KOLLER, M.; MARSALEK, L. Principles of glycerol-based polyhydroxyalkanoates production. **Applied Food Biotechnology**, n. 4; v. 2; p. 3-10, 2015.

KONG, P. S.; AROUA, M. K.; DAUD, W. M. A. W. Conversion of crude glycerol into derivatives: A feasibility evaluation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 63, p. 533-555, 2016.

KOURMENTZA, C.; PLÁCIDO, J.; VENETSANEAS, N.; BURNIOL-FIGOLS, A.; VARRONE, C.; GAVALA, H. N.; REIS, M. A. M. Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoates (PHA) Production. **Bioengineering**, n. 4, v. 55, p. 1-43, 2017.

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

LAIME, E. M. O. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 5, n. 3, p. 16-29, 2011.

LAN M, K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: a review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 500-18, 2010.

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

LEITE, R. C. DE C.; LEAL, M. R. L. V. O Biocombustível no Brasil. **Novos Estudos**, v. 78, p. 15-21, 2007.

LOPAR, M.; ŠPOLJARIĆ, I. V.; CEPANEC, N.; KOLLER, M.; BRAUNEGG, G.; HORVAT, P. Study of metabolic network of *Cupriavidus necator* DSM545growing on glycerol by applying elementary flux modes and yield space analysis. **J. Ind. Microbiol Biotechnol**, v. 41, p. 913-930, 2013.

LOPES, A. P.; CANESIN, E. A.; SUZUKI, R. M. TONIN, L. T. D.; PALIOTO, G. F. Purificação de glicerina residual obtida na produção de biodiesel a partir de óleos residuais. **Revista Virtual de Química**, n. 6, v. 6, p. 1562-1582, 2014.

LUENGO, J. M.; GARCIA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G.; OLIVEIRA, E. R. Bioplastic from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 251-260, 2003.

MACHADO, M. L. C., PEREIRA, N. C., MIRANDA, L. F., TERENCE, M. C., PRADELLA, J. G. C. Estudo das Propriedades Mecânicas e Térmicas do Polímero Poli-3-Hidroxi-butirato (PHB) e de Compósitos PHB/Pó de Madeira. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, p. 65-71. 2010.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 63, n. 1, p. 21-53, 1999.

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

MARTINHAGO, F. M.; STEFFEN, W. F.; SANTOS, E. C.; ZANFONATO, K.; QUINES, L. K. M.; SCHMIDT, M.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F. Utilização de vinhaça para a produção de poli(3-hidroxi-butirato) por *Cupriavidus necator*. **X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica (COBEQ IC)**, Vassouras – Rio de Janeiro, Dezembro, 2013.

MEJÍA, M.A.; SEGURA, D.; ESPÍN, G.; GALINDO, E.; PEÑA, C. Two stage fermentation process for alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutant altered in poly-3-hydroxybutyrate PHB synthesis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 55–61, 2010.

MENDES, D. B.; VALDÉS, J. C. Glicerina: uma abordagem sobre a produção e o tratamento. **Revista Liberato**, v. 13, n. 20, p. 1-9, 2012.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MME – **MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA** RenovaBio

Disponível em:

<[http://www.mme.gov.br/web/guest/secretarias/petroleo-gas-natural-e-](http://www.mme.gov.br/web/guest/secretarias/petroleo-gas-natural-e)

combustiveis-renovaveis/programas/renovabio/principal> Acesso em: 15 Jan 2017.

MOITA, R.; FRECHE, A.; LEMOS, P. C. Crude glycerol as feedstock for polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures, **Water Research**, v. 58; p. 9-20, 2014.

MOTA, C. J. A.; da SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, n. 3, v. 32, p. 639-648, 2009.

MOTHES, G.; SCHNORPFEIL, C.; ACKERMANN, J. U. Production of PHB from crude glycerol. **Engineering in Life Science**, v. 5, p. 475-479, 2007.

MOZUMDER, M. S. I.; GARCIA-GONZALEZ, L.; WEVER, H.; VOLCKE, E. I. P. Effect of sodium accumulation on heterotrophic growth and polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator*. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 213-218, 2015.

NARANJO J. M.; POSADA J. A.; HIGUITA J. C.; CARDONA C. A. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. **Biology and Technology** v. 133, p. 38-44, 2013.

NASPOLINI, B. F.; MACHADO, A. C. de O.; CRAVO JR, W. B.; FREIRA, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Bioconversion of Sugarcane Vinasse into High-Added value products and energy. **BioMed Research International**, 2017.

OBRUCA, S., PETRIK, S., BENESOVA, P., SVOBODA, Z., EREMKA, L.; MAROVA, I. Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of poly-hydroxyalkanoates. **Appl Microbiol Biotechnol** v. 98; p. 5883-5890, 2014.

OLIVEIRA, L. R.; BAISTA, R. D. Perspectivas e Situação atual da produção de Biocombustíveis. **Revista Energia**, v. 5, n. 1, p. 32-42, 2015.

PAN, P.; INOUE, Y. Polymorphism and isomorphism in biodegradable polyesters. **Prog. Polym. Sci.**, v. 34, p. 605-640, 2009.

- PAPANIKOLAOU S.; AGGELIS G. Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. **Lipid Technology**, v. 21; p. 83–87, 2009.
- PARNAUDEAU, V.; CONDON, N.; OLIVER, R.; CAZEVIEILLE, P.; RECOUS, S. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1553–1562, 2008.
- PEÑA, C.; CASTILLO, T.; GARCÍA, A.; MILLÁN, M.; SEGURA, D. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. **Microbial Biotechnology**, v. 7, p. 278-293, 2014.
- PRADELLA, J.G.C.; IENCZAK, J.; ROMERO, C.; TACIRO, M. (2012) Carbon source pulsed feeding to attain high yield and high productivity in poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production from soybean oil using *Cupriavidus necator*. **Biotechnol Letther**, v. 34, p. 1003–1007, 2012.
- PRAMANIK, A.; MITRA, A.; ARUMUGAM, M.; BHATTACHARYYA, A.; SADHUKHAN, S.; RAY, A.; HALDAR, S.; MUKHOPADHYAY, U. K.; MUKHERJEE, J. Utilization of vinasse for the production of polyhydroxybutyrate by *Haloarcula marismortui*. **Folia Microbiologica**, v. 57, n. 1, p. 71–79, 2012.
- QUISPE, C.A.G.; CORONADO, C.J. R. ; CARVALHO Jr, J. A. Glycerol: Production, consumption, price, characterization and new trends in combustion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 475-493, 2013.
- RAZA, Z. A.; ABID, S.; BANAT, I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 126, p. 45-56, 2018.
- REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: An overview. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 137–146, 2003.

RIVERO, C. P.; SUN, C.; THEODOROPOULOS, C.; WEBB, C. Building a predictive model for PHB production from glycerol. **Biochemical Engineering Journal**, v. 116, p. 113-121, 2016.

ROBLES-GONZÁLEZ, V.; GALÍNDEZ-MAYER, J.; RINDERKNECHT-SEIJAS, N.; POGGI-VARALDO, H. M. Treatment of mezcal vinasses: A review. **Journal of Biotechnology**, v. 157, n. 4, p. 524–546, 2012

RYZNAR-LUTY, A.; KRZYWONOS, M.; CIBIS, E.; MISKIEWICZ, T. Aerobic biodegradation of vinasse by a mixed culture of bacteria of the genus *Bacillus*: optimization of temperature, pH and oxygenation state. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 17, n. 1, p. 101-112, 2008.

SALAKKAM, A.; WEBB, C. The inhibition effect of metanol, as a component of crude glycerol, on the growth rate of *Cupriavidus necator* and other micro-organisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 98, p. 84-90, 2015.

SAMPAIO, Y.; VITAL, T.; SAMPAIO, G. R. Biocombustíveis: Quatro questões sobre seu futuro. **Economia e Desenvolvimento**, v. 10, n. 1, p. 61-100, 2011.

SANTANA, V.S.; MACHADO, N.R.C.F. Photocatalytic degradation of the vinasse under solar radiation. **Catal. Today**, v. 133, p. 606–610, 2008.

SCHMIDELL, W. ; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 1.ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001. Vol.2.

SCHMIDT, M. **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 de Doutorado (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

SCHMIDT, M.; IENCZAK, J. L.; QUINES, L. K.; ZANFONATO, K.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F. Poly(3-hidroxybutyrate-co-hidroxivalerate) production in a system with external cell recycle and

limited nitrogen feeding during the production phase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 112, p. 130-135, 2016.

SCHROEDER, T.; SCHNEIDER, A. L. S.; SOMBRIO, B. R. Produção de poli(3-hidroxi butirato) por *Cupriavidus necator* em batelada alimentada. **Polimeros-Ciencia e Tecnologia**, v. 27, p. 110-115, 2003.

SEDENHO, G. C. **Desenvolvimento de detector eletroquímico para cromatografia líquida de alta eficiência baseado em um eletrodo modificado com nanopartículas metálicas de ácido carboxílicos em vinhaça de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual Paulista, 2016.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. C. Produção biotecnológica de poli-hidroxi alcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, n, 7, v. 30, p. 1732-1743, 2007.

SIMÕES, C. L. do N.; de SENA, M. E. R.; de CAMPOS, R. Estudo da viabilidade econômica da concentração de vinhoto através de osmose inversa. **XXIV Encontro Nac. de Eng. de Produção**, Florianópolis, 03-05 Nov, 2004.

SOMBRIO, B. R.; SCHNEIDER, A. L. S.; PEZZIN, A. P. T.; APATI, G.; SCHROEDER, T. Poly(3-hydroxybutyrate) production synthesized by *Cupriavidus necator* on fed-bath culture using glycerol. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 27, p. 27-32, 2017.

SPOLJARIC, I. V.; LOPAR, M.; KOLLER, M.; NUHR, A.; SALERNO, A.; REITERER, A.; MALLI, K.; ANGERER, H.; STROHMEIER, K.; SCHOBER, S.; MITTELBACH, M.; HORVAT, P. Mathematical modeling of poli(3-hydroxybutyrate) synthesis by *Cupriavidus necator* DSM 545 on substrates stemming from biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 482-494, 2013.

STUBBE, J.; TIAN, J.; HE, A.; SINSKEY, A. J.; LAWRENCE, A. G.; LIU, P. Nontemplate-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. **Annual Review Biochemistry**, v. 74, p. 433-480, 2005.

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S. Biotechnological approaches for the productions of

polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants – A review. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 148-175, 2007.

SZYMANSKI, M.S.E.; BALBINOT, R.; SCHIRMER, W.N. Biodigestão anaeróbica da vinhaça: aproveitamento energético do biogás e obtenção de créditos de carbono – estudo de caso. **Seminário de Ciências. Agrárias**. v. 31, p. 901–912, 2010.

TAN, H. W.; AZIZ, A.; AROUA, M.K. Glycerol production and its applications as a raw material: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 118-127, 2013.

TANADCHANGSAENG, N.; YU, J. Microbial Synthesis of Polyhydroxybutyrate from Glycerol: Gluconeogenesis, Molecular Weight and Material Properties of Biopolyester. **Biotechnology and Bioengineering**, n. 11, v. 109, p. 2808-2818, 2012.

WANG, F.; LEE, S. Y. High cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli* for the production of poly(3-hydroxybutyrate) in a defined medium. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 2, p. 325-328, 1998.

XIAO, Y.; XIAO, G.; VARMA, A. A Universal Process for crude glycerol purification from diferentes feedstocks in biodiesel production: experimental and simulation study. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 14291-14296, 2013.

YAMANE, T. Yield of poly-d-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. **Biotechnology Bioenergy**. v. 41, p. 165–170, 1993.

YONG, K. C.; OOI, T. L.; DZULKEFLY, K.; WAN YUNUS, W. M. Z.; HAZIMAH, A. H. Refining of crude glycerin recovered from glycerol residue by simple vacuum distillation. **Journal of Oil Palm Reseach**, v. 13, p. 39–44, 2001.

ZANFONATO, K. **Aproveitamento de subprodutos da indústria de biocombustíveis para produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha***. Tese de Doutorado (Engenharia de Alimentos). Universidade de Santa Catarina, 2016

ZANFONATO, K.; GAI, C. S.; QUINES, L. K. M.; MARTINHAGO, F. M.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F. Produção de Poli(3-hidroxi-butirato) por *Cupriavidus necator* utilizando vinhaça como substrato. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ)**, Florianópolis – Brasil, Outubro, 2014.

APÊNDICE

1. Certificado de Análise das glicerinas refinada e bruta emitido pela empresa BIOCAPITAL *Biofuels & Oleochemicals*, em 07 de Fevereiro de 2017, discutidos na Seção 5.2.

GLICERINA REFINADA			
Característica	Resultado	Unidade	Metodologia
Aspecto (25 °C)	Viscosa	-	Visual
Índice da Acidez	0,08	mg _{KOH} /g	IT-LCQ_001
Umidade (KF)	0,27	%	IT-LCQ_069
Teor de Glicerol	99,5	%	IT-LCQ_010
Cor	20	APHA	IT-LCQ_046
Sabão	150	ppm	IT-LCQ_008

GLICERINA BRUTA			
Característica	Resultado	Unidade	Metodologia
Aspecto (25 °C)	Viscoso	-	Visual
Teor de Água	15,8	%	IT-LCQ_069
Índice de Saponificação	2,4	mg _{KOH} /g	IT-LCQ_005
Sabão	0,4	%	IT-LCQ_008
Teor de Glicerol	83,0	%	IT-LCQ_010