

Pâmela Guder Goularte

Comparação da Produção de Poli-hidroxibutirato por *Cupriavidus necator* parental e recombinante a partir de glicerol e glicose combinados

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

Orientadora: Prof^{ta} Dr^a Gláucia Maria Falcão de Aragão

Coorientador: Prof Dr Willibaldo Schmidell Netto

Coorientadora: Dr^a Kellen Zanfonato

Florianópolis

2018

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

Goularte, Pâmela

Comparação da produção de poli-hidroxibutirato por *Cupriavidus necator* parental e recombinante a partir de glicerol e glicose combinados / Pâmela Goularte ; orientador, Gláucia Maria Falcão de Aragão, coorientador, Willibaldo Schmidell, coorientador, Kellen Zanfonato, 2018.

138 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

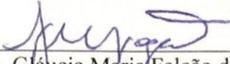
1. Engenharia de Alimentos. 2. Engenharia de Alimentos. 3. Produção de poli-hidroxibutirato. 4. Associação dos substratos glicerol e glicose. 5. *Cupriavidus necator* DSM 545 e *C. necator* glpFK . I. Aragão, Gláucia Maria Falcão de . II. Schmidell, Willibaldo. III. Zanfonato, Kellen IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. V. Título.

**“COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE POLI-
HIDROXIBUTIRATO POR CUPRIAVIDUS NECATOR
PARENTAL E RECOMBINANTE A PARTIR DE
GLICEROL E GLICOSE”
COMBINADOS**

Por

Pâmela Guder Goularte

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia 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. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão

Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro Tecnológico
Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos



Prof. Dr. Willibaldo Schmidt Netto

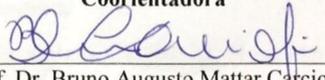
Coorientador

Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi
Coordenador



Dra. Kellen Zanfonato

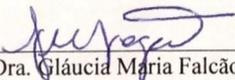
Coorientadora



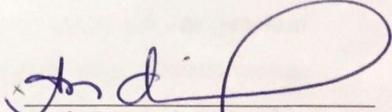
Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi

Coordenador

Banca Examinadora:



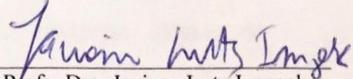
Prof. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão



Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos
Schneider



Prof. Dra. Débora de Oliveira



Prof. Dra. Jaciane Lutz Ienczak

Florianópolis, 14 de junho de 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meus anjos da guarda Vó Tereza e Vô Afonso pela sabedoria e pelas oportunidades concedidas em minha vida.

Aos meus pais, Juarez e Lúcia, por me ensinarem a valorizar o saber, por terem me encaminhado na educação e por tudo que fizeram e continuam fazendo para meus sonhos se realizarem, obrigada.

À minha irmã Samara, minha “pequena”, simplesmente pela alegria, por todo o incentivo, amizade e amor, e por ser esta menina cheia de sonhos o que nos faz acreditar que o amanhã vale a pena, à minha irmã Cíntia, pela amizade.

Ao meu noivo Júnior, meu companheiro, meu amigo, meu amor, pelo apoio incondicional pela dedicação constante, pelo incentivo a cada dia e por sempre acreditar em meu potencial até mesmo nos momentos que nem eu mesmo acreditava obrigada.

À minha segunda família Mara Lúcia, Darci, pelo carinho e por todos os momentos de incentivo.

As minhas grandes amigas Camilinha, Nati, Dani, Carol, Cíntia e Denise Perius, e ao meu grande amigo Will, por estarem presentes em tantas etapas dessa caminhada, pelo carinho, alegria que só elas transmitem, pelo incentivo, disponibilizando horas do seu precioso tempo para me auxiliarem, dividindo comigo seus conhecimentos, obrigada pela paciência!!!

Aos meus orientadores Gláucia e Willi pela orientação, compreensão, dedicação e paciência em doar diversas formas de aprendizado.

À Kellen minha coorientadora que se tornou muito mais do que colega de pesquisa, mas uma super amiga que sei que posso contar para

sempre (quem diria que um dia fôssemos ser amigas heim), te admiro muito e tenho um grande respeito por você, obrigada por tudo sem você esse trabalho não seria possível.

Ao grupo PHB: Kelin, Méloidi, Kellen, Carol e aos iniciantes científicos Fran, Thaís, Hélia, Natalia e Gabriel, por toda ajuda concedida na execução dos experimentos, pela amizade e dedicação.

A todos os colegas do Engebio, pela amizade, e alegria que transmitem, obrigada a todos, mas em especial à Denise, Déia, Ju, Rosana, Sid, Lindo, Gabi e Jeferson. Obrigada também aos professores e colegas do LTBR que nos receberam enquanto o nosso laboratório estava passando por reformas.

RESUMO

Uma crescente demanda por produtos de base biológica está impulsionando o mercado mundial para a produção de bioplásticos. O poli-hidroxibutirato (PHB) é um biopolímero biodegradável e biocompatível com propriedades físicas próximas às do polipropileno. Um dos principais obstáculos para sua produção é o elevado custo e isso tem estimulado a procura por substratos de baixo custo, como o glicerol, subproduto do biodiesel. O consumo de glicerol pela bactéria *Cupriavidus necator* DSM 545 é lento, quando comparado a outros substratos como a glicose e ácidos orgânicos, por exemplo. A inserção de genes para o consumo de glicerol e a utilização de uma fonte de carbono adicional, como a glicose, pode aumentar os percentuais de acúmulo e a produtividade em biopolímero. O objetivo deste trabalho foi comparar a produção de PHB por *C. necator* DSM 545 (parental) e por *C. necator_glpFK* (que ancora os genes *glpF* e *glpK* de *Escherichia coli* para o consumo de glicerol), inicialmente a partir de glicerol e depois associando glicerol e glicose. Diferentes estratégias de cultivo foram realizadas: cultivos em agitador orbital e biorreator foram conduzidos para comparar o desempenho das cepas parental e recombinante. Cultivos em biorreator foram conduzidos afim de comparar a influência da concentração dos substratos glicose e glicerol no crescimento e produção de PHB pela cepa recombinante, e cultivo em modo batelada alimentada foi conduzido com finalidade de avaliar a influência do tipo de alimentação de glicerol sobre a produtividade em polímero. O cultivo para a produção de PHB por *C. necator_glpFK* também foi avaliado quanto a transferência e consumo de oxigênio, nas condições estudadas. O polímero produzido foi extraído e caracterizado. Os resultados mostraram que, em agitador orbital, as cepas foram capazes de produzir PHB com percentual de acúmulo de 44 e 57% para *C. necator* DSM 545 e para a recombinante, respectivamente. Foram realizados quatro cultivos em biorreator, que mostraram que *C. necator_glpFK* apresentou melhor desempenho em relação ao crescimento e produção de PHB do que a cepa parental. Os dados cinéticos dos cultivos em agitador orbital e biorreator mostraram que a cepa recombinante consumiu a totalidade dos substratos glicerol e glicose, com uma velocidade maior do que a cepa parental, proporcionando maior produtividade de biopolímero. Nos cultivos em batelada, realizados com a cepa recombinante e com concentrações de 20 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol e no cultivo 20 g.L⁻¹ de glicose e 25 g.L⁻¹ de glicerol apresentaram produtividades de 0,41 g.L⁻¹.h⁻¹ e

0,30 g.L⁻¹.h⁻¹, com acúmulo de 73% e 74% de PHB, respectivamente. Os dados de transferência de oxigênio mostraram comportamento análogo, para os cultivos 20 g.L⁻¹ de glicose e 10 de glicerol e 20 g.L⁻¹ de glicose e 25 g.L⁻¹ de glicerol, entre a velocidade de respiração microbiana (QO₂X) e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La). Foi possível constatar que o uso do glicerol não afetou o polímero quanto às propriedades térmicas, e que o carbonato de propileno reutilizado pode ser empregado no processo de extração. Conclui-se que o cultivo em batelada 20 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol, em glicerol combinado à glicose, apresenta melhor desempenho quanto à produtividade, entretanto o cultivo 20 g.L⁻¹ de glicose e 25 g.L⁻¹ de glicerol apresentou melhor percentual de acúmulo final de PHB entre as concentrações testadas. Assim, é possível afirmar que a associação dos substratos glicose e glicerol pode ser utilizada na produção de PHB com maior produtividade do que se usando apenas glicerol. O uso dos substratos em conjunto pode ser uma boa alternativa para diminuição de custos de produção de PHB, com uma boa produtividade.

Palavras-chave: Cupriavidus necator; glicerol; glicose; PHB.

ABSTRACT

An increasing demand for bio-based products is boosting the global market for bioplastics production. Polyhydroxybutyrate (PHB) is a biodegradable and biocompatible biopolymer with physical properties close to those of polypropylene. One of the main obstacles to its production is the high cost and this has stimulated the search for substrates of low cost, like the glycerol, byproduct of the biodiesel. The consumption of glycerol by *Cupriavidus necator* DSM 545 is slow when compared to other substrates such as glucose and organic acids, for example. Insertion of genes for glycerol consumption and use of an additional carbon source, such as glucose, may increase percentages of accumulation and productivity in biopolymer. The objective of this work was to compare PHB production by *C. necator* DSM 545 (parental) and *C. necator_glpFK* (which anchors the *glpF* and *glpK* genes of *Escherichia coli* for the consumption of glycerol), initially from glycerol and then associating glycerol and glucose. Different cultivation strategies were performed: cultures in orbital shaker and bioreactor were conducted to compare the performance of the parental and recombinant strains. Bioreactor cultures were conducted in order to compare the influence of glucose and glycerol substrates concentration on growth and PHB production by the recombinant strain, and fed batch culture was conducted with the purpose of evaluating the influence of glycerol feed type on polymer productivity. The culture for the production of PHB by *C. necator_glpFK* was also evaluated as to oxygen transfer and consumption, under the studied conditions. The polymer produced was extracted and characterized. The results showed that, in an orbital shaker, the strains were able to produce PHB with a percentage of accumulation of 44 and 57% (w/w) for *C. necator* DSM 545 and for the recombinant, respectively. Four cultures were carried out in bioreactor, which showed that *C. necator_glpFK* presented better performance in relation to the growth and production of PHB than the parental strain. The kinetic data of the orbital and bioreactor cultures showed that the recombinant strain consumed all glycerol and glucose substrates at a faster rate than the parental strain, providing higher productivity of biopolymer. In the batch cultures, performed with the recombinant strain and with concentrations of 20 g.L⁻¹ of glucose and 10 g.L⁻¹ of glycerol and in the culture 20 g.L⁻¹ of glucose and 25 g.L⁻¹ of glycerol presented productivities of 0.41 g.L⁻¹.h⁻¹ and 0.30 g.L⁻¹.h⁻¹, with accumulation of 73% and 74% of PHB, respectively. The oxygen transfer data showed similar behavior for the cultures 20 g.L⁻¹ of

glucose and 10 g.L⁻¹ of glycerol and 20 g.L⁻¹ of glucose and 25 g.L⁻¹ of glycerol between the microbial respiration rate (Q_{O_2X}) and the coefficient volumetric oxygen transfer (K_La). It was possible to verify that the use of glycerol did not affect the polymer on the thermal properties, and that the reused propylene carbonate can be used in the extraction process. It is concluded that the batch cultivation of 20 g.L⁻¹ of glucose and 10 g.L⁻¹ of glycerol in glycerol combined with glucose presented a better yield performance, however, the culture 20 g.L⁻¹ glucose and 25 g.L⁻¹ glycerol showed a better percentage of final PHB accumulation between the concentrations tested. Thus, it is possible to affirm that the association of the substrates glucose and glycerol can be used in the production of PHB with greater productivity than if using only glycerol. The use of the substrates together can be a good alternative for lower production costs of PHB, with a good productivity.

Key-words: Cupriavidus necator; glycerol; glucose; PHB.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 Morfologia de uma estirpe produtora de PHA (*C. necator* H16), conforme observado pela Microscopia Eletrônica de Transmissão (esquerda), estrutura geral dos PHAs para diferentes monômeros (direita) (OBRUCA et al., 2017).....32
- Figura 4.2 Esquema simplificado da via metabólica de produção de PHB em *C. necator*, a partir de glicose (MADISON; HUISMAN, 199.....41
- Figura 4.3 Organização dos grânulos e moléculas envolvidas na biossíntese e no catabolismo de PHAs.....42
- Figura 4.4 Via metabólica simplificada para a utilização de glicerol para produção de PHB por *C. necator*, em que GlpF, GlpK e GlpD representam as enzimas aquaporina, glicerol quinase e glicerol 3-fosfato desidrogenase, respectivamente. Reação 1: entrada do glicerol na célula; Reação 2: a enzima glicerol quinase realiza a fosforilação do glicerol a glicerol 3-fosfato; Reação 3: glicerol 3-fosfato é convertido a DHAP pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (Adaptado de SOLAIMAN; ASHBY; CROCKER, 2016).....47
- Figura 5.1 Representação das condições de cultivo nas concentrações de glicerol (20 g.L⁻¹) e glicerol (10 g.L⁻¹) combinado a glicose (10 g.L⁻¹) em *C. necator* DSM 545 e *C. necator*.....54
- Figura 5.2 Representação das condições de cultivo em biorreator para cepa parental e recombinante em meio MM2 com concentração de nitrogênio de 0,8 g.L⁻¹.....54
- Figura 5.3 Ilustração para explicar o método dinâmico utilizado para determinar K_La e QO₂ (adaptado por SCHMIDELL, 2001).....61
- Figura 6.1 Evolução de biomassa total (X_t) expressa em (g.L⁻¹) ao longo dos cultivos em glicerol (20 g.L⁻¹) por *C. necator* DSM 545 (▲) e por *C. necator*_{glpFK} (Δ). A linha 1 (—) representa o instante da limitação de nitrogênio para o cultivo com *C. necator* DSM 545 e a linha 2 (----) representa o instante da limitação de nitrogênio para o cultivo com *C. necator*_{glpFK}.....71
- Figura 6.2 Evolução de X_t (●), X_r (-), PHB (▲), glicerol (○), glicose (□) e N (▲) ao longo do tempo, para os cultivos de (a) cepa parental e da cepa recombinante (b) em agitador orbital, utilizando-se 10 g.L⁻¹ de glicerol e 10 g.L⁻¹ de glicose. As linhas contínuas (X_t e PHB) representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais, através do

software Microsoft Excel e o macro Lissage. A linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio72

Figura 6.3 Evolução de Xt (●), Xr (-), PHB (▲), glicerol (○), glicose (□) e N (▲), ao longo do tempo, para os cultivos de (a) cepa parental e da cepa recombinante (b) em modo batelada, em meio com 10 g.L⁻¹ glicerol e 10 g.L⁻¹ glicose. As linhas contínuas (Xt e PHB) representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais através do *software* Microsoft Excel e o macro Lissage. A linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio.....75

Figura 6.4 Evolução de Xt (●), Xr (-), PHB (▲), glicerol (○), glicose (□) e N (▲), ao longo do tempo, para os cultivos de (a) cepa parental e da cepa recombinante (b) em modo batelada, em meio com 25 g.L⁻¹ glicerol e 20 g.L⁻¹ glicose. As linhas contínuas (Xt e PHB) representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais através do *software* Lissage. A linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio.....77

Figura 6.5 Evolução de Xt (●), Xr (-), PHB (▲), glicerol (○), glicose (□) e N (▲); (a) cultivo a partir de 10 g.L⁻¹ glicose e 20 g.L⁻¹ glicerol; (b) cultivo a partir de 10 g.L⁻¹ glicose e 40 g.L⁻¹ glicerol. As linhas contínuas (Xt e PHB) representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais através do *software* Microsoft Excel e o macro Lissage. A linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio.....81

Figura 6.6 Evolução da velocidade específica de produção de PHB (◆), em biorreator, ao longo do cultivo em modo batelada em meio com (a) 10 g.L⁻¹ glicose e 10 g.L⁻¹ glicerol; (b) 10 g.L⁻¹ glicose e 20 g.L⁻¹ glicerol; (c) 10 g.L⁻¹ glicose e 40 g.L⁻¹ glicerol. A linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio86

Figura 6.7 Evolução de Xt (●), Xr (-), PHB (▲), glicerol (○), glicose (□) e N (▲). (a) cultivo a partir de 20 g.L⁻¹ glicose e 10 g.L⁻¹ glicerol; (b) cultivo a partir de 20 g.L⁻¹ glicose e 40 g.L⁻¹ glicerol. As linhas contínuas (Xt e PHB) representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais através do *software* Microsoft Excel e o macro Lissage. A linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio.....88

Figura 6.8 Evolução da velocidade específica de produção de PHB (◆), em biorreator, ao longo do cultivo em modo batelada em meio com (a) 20 g.L⁻¹ glicose e 10 g.L⁻¹ glicerol; (b) 20 g.L⁻¹ glicose e 25 g.L⁻¹

glicerol; (c) 20 g.L⁻¹ glicose e 40 g.L⁻¹ glicerol. A linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio.....92

Figura 6.9 Evolução de X_t (●), X_r (-), PHB (▲), glicerol (○), glicose (□) e N (▲), em biorreator, ao longo do cultivo em modo batelada em meio com 10 g.L⁻¹ glicose e pulso de 10 g.L⁻¹ glicerol. As linhas contínuas (X_t e PHB) representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais através do *software* Microsoft Excel e o macro Lissage. A linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio.....94

Figuras 6.10 Evolução da velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ_{Xr} (—)) e de produção de PHB (q_P (---)) para os cultivos: (a) com adição de 10 g.L⁻¹ glicose e adição posterior 10 g.L⁻¹ glicerol (b) com adição de 10 g.L⁻¹ glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol. A seta indica o momento da exaustão da fonte de nitrogênio.....96

Figura 6.11 Dados de k_{La} (▲), QO₂X (□), QO₂ (○), X_t (●) e X_r (—) durante o cultivo a partir de 20 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol (a) e a partir de 20 g.L⁻¹ de glicose e 25 g.L⁻¹ de glicerol (b). A linha contínua representa a ligação entre dos pontos e a linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio.....99

Figura 6.12 Velocidade específica de crescimento (μ_{Xr}) (—) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO₂) (---), durante o cultivo a partir de 20 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol (a) e a partir de 20 g.L⁻¹ de glicose e 25 g.L⁻¹ de glicerol (b).....102

Figura 6.13 Espectro de FTIR para a amostra de PHB extraídas de *C. necator_glpFK*.....107

Figura 6.14 Curvas de TGA, termogravimetria e termogravimetria derivada, da amostra de PHB extraídas de *C. necator_glpFK* a partir de 20 g.L⁻¹ glicose e 10 g.L⁻¹ glicerol.....111

Figura 6.15 Curva de DSC para a amostra de PHB extraídas de *C. necator_glpFK* a partir de 20 g.L⁻¹ glicose e 10 g.L⁻¹ glicerol.....113

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 Preparo das soluções poliméricas para medidas de viscosidade relativa.....	66
Tabela 6.1 Resultados obtidos para os cultivos realizados em biorreator.....	79
Tabela 6.2 Resultados obtidos para os cultivos realizados em biorreator pela cepa recombinante com concentração de glicose de 10 e concentrações de 10 g.L ⁻¹ 20 g.L ⁻¹ e 40 g.L ⁻¹ de glicerol.....	83
Tabela 6.3 Fatores de conversão de glicose em Xr (Y _{Xr/Glicose}), nitrogênio em Xr (Y _{Xr/N}) e glicerol em PHB (Y _{PHB/Glicerol}) para os cultivos (10 g.L ⁻¹ de glicose e 10 g.L ⁻¹ de glicerol), (10 g.L ⁻¹ de glicose e 20 g.L ⁻¹ de glicerol) e (10 g.L ⁻¹ de glicose e 40 g.L ⁻¹ de glicerol).....	84
Tabela 6.4 Resultados obtidos para os cultivos realizados em biorreator com concentração de glicose de 20 e concentrações de 10 g.L ⁻¹ , 25 g.L ⁻¹ e 40 g.L ⁻¹ de glicerol.....	89
Tabela 6.5 Resultados obtidos para os fatores de conversão de glicose em Xr (Y _{Xr/Glicose}), nitrogênio em Xr (Y _{Xr/N}) e glicerol em PHB (Y _{PHB/Glicerol}).....	90
Tabela 6.6 Valores de fator de conversão global de glicose em biomassa residual, nitrogênio em biomassa residual e glicerol em PHB para os cultivos (10 g.L ⁻¹ de glicose e 10 g.L ⁻¹ de glicerol adicionado no início do cultivo) e (10 g.L ⁻¹ de glicose e adição posterior de 10 g.L ⁻¹ de glicerol).....	95
Tabela 6.7 Fator de conversão de oxigênio em célula (Y _{Xr/O}) e velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção celular (m _o) para os cultivos em 20 g.L ⁻¹ de glicose e 10 g.L ⁻¹ de glicerol e em 20 g.L ⁻¹ de glicose e 25 g.L ⁻¹ de glicerol.....	104
Tabela 6.8 Variáveis de cultivo avaliadas no momento da realização dos ensaios para determinação de Y _{Xr/O} e m _o para produção de PHB por <i>C. necator_glpFK</i>	105
Tabela 6.9 Bandas características no espectro de FTIR para o PHB extraído.....	108
Tabela 6.10 Resultados das viscosidades intrínsecas (η _i) e da massa molar média (MV) para os dois polímeros analisados: polímeros obtidos	

(a) *C. necator*_glpFK 20 g.L⁻¹ glicose e 10 g.L⁻¹ glicerol, e (b) polímero comercial da PHB Industrial.....110

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1 Empresas produtoras de PHAs em escala piloto e industrial atualmente ativas no mundo (Adaptado de KOURMENTZA et al., 2017).....	33
Quadro 4.2 Comparação entre as propriedades do PHB comercial e do PP.....	35
Quadro 5.1 Definições de viscosidades utilizadas.....	67

NOMENCLATURA E ABREVIACOES

a	Constante da equao de Mark-Howink-Sakurada
ATP	Adenosina trifosfato
c	Concentrao de PHB nas soluçoes para análise de viscosidade (g.mL ⁻¹)
CG	Cromatografia gasosa
CoA	Coenzima A
CoASH	Coenzima A não ligada a um grupo acil
CP	Carbonato de propileno
DHAP	Dihidroxiacetonafofato
DNS	Dinitrosalicílico
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTA	Análise térmica diferencial
ED	Entner-Doudoroff
FAD	Flavina adenina dinucleotdio (forma oxidada)
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotdio (forma reduzida)
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada Fourier
GlpF	Enzima aquoporina
<i>glpF</i>	Gene codificando a enzima aquoporina
GlpK	Enzima glicerol quinase
<i>glpK</i>	Gene codificando a enzima glicero quinase
K _L a	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
mcl-PHA	Polihidroxiacanoatos com monômeros de cadeia média

m_f	Massa de PHB obtida após a extração (g)
MM	Meio mineral
m_o	Velocidade específica de consumo de oxigênio para manutenção celular ($\text{mgO}_2 \cdot \text{gcel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
m_p	Massa de PHB puro(g)
m_{PHB}	Massa do biopolímero detectada por cromatografia (g)
m_i	Massa total de PHB nas células antes da extração (g), determinado por CG
m_T	Massa do material extraído utilizado para análise cromatográfica
M_v	Massa molar média do polímero ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
N	Nitrogênio
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NB	Meio de cultura <i>Nutrient broth</i>
OD	Oxigênio Dissolvido
PHA	Poli-hidroxiálcanoato
PHB	Poli-hidroxi-butilato
P(4HB)	Poli(4-hidroxi-butilato)
P(3HHx)	Poli(3-hidroxi-hexanoato)
P(3HO)	Poli-(3-hidroxi-octanoato)
PEP	Fosfoenolpiruvato
PHAs	Polihidroxiálcanoatos
PP	Polipropileno

PS	Poliestireno
qP	Velocidade específica de produção de PHB ($g_{PHB} \cdot g_{Xr}^{-1} \cdot h^{-1}$)
qP _{max}	Velocidade específica máxima de produção de PHB ($g_{PHB} \cdot g_{Xr}^{-1} \cdot h^{-1}$)
QO ₂	Velocidade específica de respiração ($gO_2 \cdot g_{cel}^{-1} \cdot h^{-1}$)
QO ₂ Xr	Velocidade de respiração celular ($mgO_2 \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)
rpm	Rotações por minuto
scl-PHA	Polihidroxiclcanoatos com monômeros de cadeia curta
TCA	Ciclo do ácido tricarbóxico
Tg	Temperatura de transição vítrea (°C)
TGA	Análise termografimétrica
THF	Tetraidrofurano
T _i	Temperatura de início de degradação (°C)
T _m	Temperatura de fusão (°C)
T _{pico}	Temperatura máxima de degradação (°C)
X _c	Grau de cristalinidade (%)
Xr	Concentração de biomassa residual ($g \cdot L^{-1}$)
Xt	Concentração de biomassa total ($g \cdot L^{-1}$)
Y _{PHB/Glicerol}	Fator de conversão de glicerol em PHB ($g_{PHB} \cdot g_{Glicerol}^{-1}$)
Y _{Xr/Glicose}	Fator de conversão de glicose em biomassa residual ($g_{Xr} \cdot g_{Glicose}^{-1}$)
Y _{Xr/N}	Fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual ($g_{Xr} \cdot g_N^{-1}$)
Y _{Xr/O}	Fator de conversão de oxigênio em célula ($g_{Xr} \cdot gO_2^{-1}$)

	1)
μ_{Xr}	Velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
$\mu_{Xr\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})
ΔH_m°	Entalpia de fusão considerando o polímero 100% cristalino (Jg^{-1})
ΔH_c	Entalpia de cristalização da amostra (Jg^{-1})
ΔH_m	Entalpia de fusão da amostra (Jg^{-1})
η	Viscosidade das soluções poliméricas ($mL.g^{-1}$)
η_i	Viscosidade intrínseca ($mL.g^{-1}$)
η_0	Viscosidade do solvente puro ($mL.g^{-1}$)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO	28
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
4.1 POLIHIDROXIALCANOATO (PHAs).....	31
4.2 POLI-HIDROXIBUTIRATO) (PHB).....	34
4.3 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE PHAs	36
4.4 BIOSSÍNTESE DE PHB.....	39
4.4.1 Outras enzimas envolvidas no metabolismo e estrutura dos grânulos de PHAs	41
4.5 GLICEROL COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO PARA PRODUÇÃO DE PHB.....	43
4.5.1 Glicerol.....	44
4.5.2 Metabolismo do glicerol em <i>C. necator</i>	46
4.6 EXTRAÇÃO DE PHB.....	48
4.7 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE POLÍMEROS.....	49
5.1 MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO...51	
5.1.1 Microrganismo	51
5.1.2 Meio de cultivo.....	51
5.1.2.1 Fontes de carbono.....	52

5.1.2.2	Preparo das fontes de carbono.....	52
5.1.3	Cultivos em agitador orbital.....	52
5.1.4	Cultivos em biorreator	54
5.2	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	55
5.2.1	Amostragem	55
5.2.2	Determinação da concentração da biomassa	56
5.2.3	Determinação das concentrações de glicose, glicerol e nitrogênio	56
5.2.4	Determinação da concentração de PHB.....	56
5.3	TRATAMENTO DOS DADOS.....	57
5.3.1	Velocidade específica de crescimento celular e produção de PHB.....	57
5.3.2	Percentual de PHB	58
5.3.3	Produtividade de PHB.....	58
5.3.4	Produtividade da fase de produção de PHB	58
5.3.5	Fatores de conversão	59
5.3.6	Determinação do oxigênio dissolvido.....	59
5.3.7	Transferência e consumo de oxigênio durante o cultivo: determinação do $K_{L,a}$ e QO_2	59
5.3.8	Velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção celular e fator de conversão de oxigênio em células	62
5.4	EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PHB.....	63
5.4.1	Biomassa e tratamento da biomassa	63
5.4.2	Extração de PHB com carbonato de propileno.....	63

5.4.3 Caracterização do PHB	65
5.4.3.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de fourier (FTIR) ...	65
5.4.3.2 Viscosidade	65
5.4.3.3 Análise termogravimétrica (TGA)	67
5.4.3.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) ..	67
5.4.4 Pureza do PHB	68
5.4.5 Viscosidade	68
5.4.6 Grau de Cristalinidade	69
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
6.1 COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DE <i>C. necator</i> DSM 545 e <i>C. necator_glpFK</i> EM GLICEROL E GLICEROL COMBINADO À GLICOSE.....	70
6.1.1 Cultivo em glicerol puro em agitador orbital	70
6.1.2 Cultivos em glicerol e glicose combinados em agitador orbital	71
6.1.3 Cultivos em biorreator em modo batelada utilizando <i>C. necator</i> DSM 545 e <i>C. necator_glpFK</i>	74
6.1.3.1 Cultivos em 10 g.L ⁻¹ de glicose e 10 g.L ⁻¹ de glicerol.....	74
6.1.3.2 Cultivos em 20 g.L ⁻¹ de glicose e 25 g.L ⁻¹ de glicerol.....	76
6.2 CULTIVOS EM BIORREATOR.....	80
6.2.1 Influência da concentração dos substratos glicerol e glicose no crescimento e produção de PHB por <i>C. necator_glpFK</i> , em modo batelada	80

6.2.1.1 Cultivos com concentração de 10 g.L ⁻¹ de glicose e concentrações variadas de glicerol	81
6.2.1.2 Cultivos com concentração de 20 g.L ⁻¹ de glicose e concentrações variadas de glicerol	87
6.2.2 Influência do tipo de alimentação de glicerol sobre a produtividade em polímero	93
6.2.3 Transferência de oxigênio para o cultivo <i>C. necator_glpFK</i>	98
6.2.4 Velocidade específica de consumo de O ₂ para a manutenção celular e fator de conversão de oxigênio em célula.....	103
6.2.5 Caracterização do PHB Produzido por <i>C. necator_glpFK</i>	105
6.2.5.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	106
6.2.5.2 Viscosidade	109
6.2.5.3 Análise Termogravimétrica (TGA)	110
6.2.5.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	112
7 CONCLUSÃO.....	115
8 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	117
9 REFERÊNCIAS	118
APÊNDICE.....	136

1 INTRODUÇÃO

A utilização em larga escala de polímeros derivados do petróleo gera impactos ambientais negativos. Desde as últimas décadas, o uso de materiais sintéticos se tornou ainda mais frequente: 4 x 10⁸ toneladas de plásticos foram geradas a cada ano e 93% deles foram descartados em aterros sanitários e oceanos. Neste cenário, uma alternativa é o desenvolvimento de vias para produção de polímeros biodegradáveis, que gerem menores níveis de poluição. A produção de biopolímeros microbianos pode desempenhar um papel importante como solução parcial para esse problema (KOLLER; BRAUNEGG, 2018; ALBUQUERQUE; MALAFAIA, 2017; PATHAK; SNEHA; MATHEW, 2014).

Os poli-hidroxicanoatos (PHAs) representam um dos principais biomateriais devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e suas propriedades materiais semelhantes às dos plásticos petroquímicos, sendo o mais conhecido o poli-hidroxi-butarato (PHB), (KHARDENAVIS et al., 2007; REDDY et al., 2003). Estes biopolímeros possuem potencial para substituir polímeros petroquímicos, podendo ser aplicados em embalagens para alimentos, na área farmacêutica, entre outras aplicações. Em função da sua biocompatibilidade, estes biopolímeros podem ser utilizados na área médica. Para que essa substituição ocorra de forma mais atrativa, há a necessidade da redução de custos na produção desses materiais e aumento em sua escala de produção (OBRUCA et al., 2017).

Os PHAs são sintetizados intracelularmente e armazenados na forma de grânulos e sua composição depende tanto do microrganismo, como da natureza da fonte de carbono empregada. Dentre os microrganismos capazes de sintetizar PHAs, destaca-se a bactéria *Cupriavidus necator* (CENTENO-LEIJA et al, 2014; LEE, 1996). Esta bactéria é um dos microrganismos mais estudados para a produção de PHB, por apresentar alta velocidade de conversão do substrato em células e ser capaz de utilizar fontes renováveis de carbono, além de poder acumular cerca de 90% de sua massa seca em polímero (PENA et al., 2011; SUDESH et al., 2000).

O custo total de produção dos PHAs depende do microrganismo (fator de conversão e produtividade), fontes de carbono e nitrogênio (substratos), condições de cultivo (temperatura, aeração, pH) e dos processos de recuperação e purificação. Outra possibilidade para se obter a redução dos custos de produção destes biopolímeros é a utilização de substratos de baixo custo, já que as fontes de carbono

podem ser responsáveis por 30-40% dos custos totais de produção (ARENAS et al., 2017).

Nesse sentido, uma potencial abordagem pode ser a utilização de subprodutos como fonte de carbono (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005), tais como melaço de beterraba e cana-de-açúcar, álcoois de óleos vegetais e glicerol (LEE, 1996; CHANPRATEEP, 2010; CAVALHEIRO et al., 2012). A melhoria na produção de PHA também pode ser alcançada pela inserção de genes de interesse em bactérias já produtoras de biopolímero. O uso de microrganismos geneticamente modificados, combinado com essas matérias-primas de baixo custo, pode ser uma estratégia viável para otimizar a produção de PHB (PENA et al., 2014).

O glicerol é uma fonte de carbono que pode ser metabolizada por algumas bactérias e seu consumo é amplamente estudado em *Escherichia coli* (DURNIN et al., 2009). Seu metabolismo aeróbio ocorre através das vias de degradação de açúcares, precisando para isso ser fosforilado e oxidado a di-hidroxiacetona fosfato (DHAP). *C. necator* é capaz de assimilar glicerol de forma lenta quando comparada a outros substratos como a glicose, por exemplo, levando a produtividades e fatores de conversão de glicerol em PHAs menores (SPOLJARIC et al., 2013).

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 *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 glicerol e glicose combinada com glicerol ainda não está reportada na literatura.

O glicerol foi avaliado como substrato para produção de PHB pela cepa recombinante, mas o desempenho da cepa ainda é inferior, quando comparado ao apresentado em glicose (ZANFONATO, 2016). Desta forma, no presente trabalho, optou-se por combinar estes dois substratos, para se verificar o efeito dessa mistura de substratos sobre a produtividade em células e, conseqüentemente, em biopolímero.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo comparar a produção de PHB por *C. necator* DSM 545 e *C. necator_glpFK* utilizando glicerol e combinação dos substratos glicerol e glicose.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi comparar a produção de PHB por *C. necator* DSM 545 e *C. necator_glpFK* utilizando glicerol e combinação dos substratos glicerol e glicose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o crescimento celular de *C. necator* DSM 545 e *C. necator_glpFK* em glicerol;
- Comparar o crescimento celular e o consumo de substratos por *C. necator* DSM 545 e *C. necator_glpFK* com combinação de glicerol e glicose, em agitador orbital;
- Comparar o crescimento celular e a produção de PHB por *C. necator* DSM 545 e *C. necator_glpFK* sob diferentes concentrações de glicerol e glicose, em biorreator;
- Avaliar a influência do tipo de alimentação de glicerol sobre a produtividade em polímero;
- Estudar a transferência de oxigênio durante o cultivo de *C. necator_glpFK*;
- Caracterizar o PHB produzido a partir do cultivo de *C. necator_glpFK*.

3 DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

Por quê?

- PHAs são biocompatíveis, biossintetizados e biodegradáveis. Eles possuem propriedades térmicas e mecânicas similares às do polipropileno (PP), sendo o mais conhecido o PHB, podendo ainda, serem produzidos a partir de fontes renováveis de carbono;
- A literatura reporta que até 50% do custo total de produção dos PHAs pode ser atribuído à fonte de carbono utilizada. Neste sentido, para se tornarem comercialmente competitivos com os plásticos petroquímicos, uma possibilidade é a utilização de fontes de carbono provenientes de baixo custo ou subprodutos;
- Um subproduto com potencial é o glicerol, subproduto da indústria de biodiesel em crescente produção, sendo considerado um substrato abundante e de baixo custo;

Quem já fez?

- Cavalheiro e colaboradores (2009) reportaram que o PHB pode ser produzido por *C. necator* DSM 545 a partir de glicerol como única fonte de carbono;
- Spoljaric e colaboradores (2013) realizaram modelagem matemática utilizando glicose e glicerol para a produção de PHB a partir de *C. necator* DSM 545; e constataram que a combinação de glicose e glicerol favoreceu o crescimento celular e produção de PHB;
- Contreras e colaboradores (2015) reportaram a utilização de glicose e glicerol para produção de PHB a partir de *C. necator* DSM 545, e relatam que a combinação dos substratos é uma estratégia de grande potencial para melhorar a produção do bioplástico;
- Zanfonato (2016) reportou a utilização de glicerol associado à vinhaça para produzir de PHB por *C. necator* DSM 545 e *C. necator_glpFK*;
- Não há trabalhos que abordem a produção de PHB por *C. necator_glpFK*, utilizando glicerol e glicose associados;

- Quines (2015) reportou a reutilização do carbonato de propileno no processo de extração de PHB de *C. necator* mostrando-se eficiente, após onze recuperações, confirmando a possibilidade de reciclo do carbonato de propileno na extração de PHB, sem redução na sua eficiência.

Hipóteses

- É possível que a cepa recombinante seja mais eficiente que a parental para a produção de biopolímero, utilizando a combinação dos substratos glicerol e glicose;
- A combinação de glicerol e glicose, utilizada por *C. necator_glpFK* para crescimento celular e produção de PHB, poderá resultar em maiores produtividades em biopolímero e biomassa;
- O processo de extração a partir do cultivo de *C. necator_glpFK*, com carbonato de propileno reutilizado, ocorrerá sem redução na sua eficiência.

Metodologia

- Avaliar o comportamento de *C. necator* DSM 545 e *C. necator_glpFK* sob diferentes condições de cultivo e obter os respectivos parâmetros cinéticos de crescimento e de produção de PHB;
- Comparar o desempenho da cepa parental e da recombinante, quanto ao crescimento e produção de PHB em meio de cultivo contendo combinação dos substratos glicerol e glicose;
- Estabelecer estratégia de cultivo visando aumentar a produtividade em polímero;
- Determinar os percentuais de recuperação e pureza do PHB;
- Caracterizar o polímero obtido através das seguintes análises: Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), viscosidade, Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

Respostas

- Obter os parâmetros cinéticos de crescimento, de consumo de substratos (glicerol e glicose), de produção de PHB de *C. necator* DSM 545 e da cepa recombinante;
- Verificar se a inserção dos genes *glpF* e *glpK* em *C. necator* DSM545 pode levar a maiores produtividades em PHB, a partir da combinação de glicerol e glicose;
- Obter o rendimento, porcentagem de recuperação, pureza, massa molar, concentração e estabilidade térmica dos biopolímeros produzidos com o biopolímero comercial;
- Verificar a influência dos substratos (glicerol e glicose) nas características do biopolímero produzido.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 POLIHIDROXIALCANOATO (PHAs)

Os PHAs são uma classe de polímeros renováveis, biodegradáveis que, juntamente com o ácido polilático (PLA) e polibutileno succinato (PBS), são considerados polímeros verdes do futuro. Espera-se que eles substituam gradualmente os plásticos convencionais devido às suas propriedades físico-químicas, térmicas e mecânicas que são semelhantes às do polipropileno (KOURMENTZA; KORNAROS, 2016).

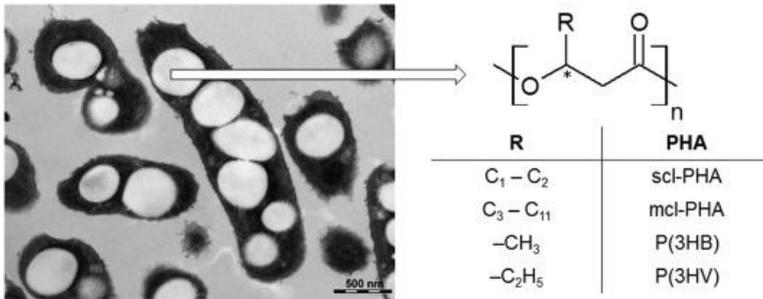
Os PHAs são sintetizados intracelularmente e armazenados na forma de grânulos, podendo representar até 90% da massa seca da célula. Sua composição depende tanto do microrganismo utilizado, quanto da natureza da fonte de carbono (BASSAS et al., 2006).

Os PHAs possuem massa molar elevada entre 1.10^4 - 3.10^6 Da, dependendo do microrganismo utilizado, da composição do substrato, condições de cultivo e das técnicas de *downstream* aplicadas (RAI et al., 2011). Esses materiais têm elevado potencial de aplicações na área médica, como por exemplo, ortopedia, dispositivos de sistema cardiovascular, suturas, nano e microesferas para liberação controlada de medicamentos, entre outros (CASTILHO; MITCHELL; FREIRE, 2009; KESHAVARZ; ROY, 2010). Além disso, eles podem ser produzidos a partir de matérias-primas renováveis, oferecendo a possibilidade de um ciclo fechado de produção, pois são completamente degradados a água e dióxido de carbono sob condições aeróbias, e a metano e água sob condições anaeróbias (REDDY et al., 2003; KAHAR et al., 2004).

Quando a estrutura do PHA consiste de monômeros compostos de 3 a 5 carbonos, estes são classificados como polímeros de cadeia curta (scl-PHA). Exemplos dessa classe incluem PHB e o poli(4-hidroxibutirato) (P(4HB)). Enquanto monômeros compostos de mais de 6 carbonos formam os PHAs de cadeia média (mcl-PHA). Exemplos incluem os homopolímeros poli(3-hidroxi-hexanoato) (P(3HHx)) e poli(3-hidroxi-octanoato) (P(3HO)) (AGNEW; PFLEGER, 2013). Os mcl-PHA são mais amorfos do que os scl-PHA e possuem propriedades elastoméricas que dependem da composição de sua cadeia polimérica (ASHBY; SOLAIMAN; FOGLIA, 2005). A capacidade do microrganismo produzir scl-PHA ou mcl-PHA está associada à especificidade com o substrato da enzima PHA sintase presente em sua estrutura celular (ANDERSON; DAWES, 1990).

Na Figura 4.1, é possível visualizar a estrutura geral dos PHAs, sendo que o alcano substituído na posição “R” determina as propriedades do polímero formado. Quando um metil é substituído da posição “R”, tem-se o PHB.

Figura 4.1 Morfologia de uma estirpe produtora de PHA (*C. necator* H16), conforme observado pela Microscopia Eletrônica de Transmissão (esquerda), estrutura geral dos PHAs para diferentes monômeros (direita) (OBRUCA et al., 2017)



O valor de “n” na estrutura geral dos PHAs pode variar de 100 a 30.000. Este valor influencia diretamente a massa molar do polímero e suas propriedades físicas (LEE, 1996; SUDESH, et al., 2000).

Com o aumento dos investimentos em produção e comercialização de bioplásticos, os custos dos PHAs estão sendo reduzidos. De acordo com um relatório da “Bioplastics”, o mercado global de bioplásticos cresceu a um ritmo acelerado nos últimos anos, de cerca de 1,6 milhões de toneladas em 2013 para aproximadamente 6,7 milhões de toneladas até 2018. Porém, o custo de biopolímeros ainda é de 2,5-7,5 vezes maior que os petroquímicos. Há alguns anos, entretanto, esta diferença era de ordem de grandeza ainda maior (VOLOVA et al., 2013).

Silva e colaboradores (2014) mostraram que é possível obter PHB a partir de xilose com preço variando de US\$ 1.30-7.10/Kg (R\$ 4,55-24,85/Kg considerando o valor cambial de R\$ 3,50) em um processo produtivo associado à produção de açúcar e etanol. Conforme Raicher (2011), o preço de venda do PHB não deve ultrapassar R\$ 4,50/Kg para que este polímero se encontre na mesma faixa de valores de comercialização dos polímeros derivados do petróleo.

O Quadro 4.1 apresenta empresas produtoras de PHAs em escala piloto e industrial atualmente ativas no mundo.

Quadro 4.1 Empresas produtoras de PHAs em escala piloto e industrial atualmente ativas no mundo (Adaptado de KOURMENTZA et al., 2017)

Empresa	Produto	Fonte de Carbono	Microrganismo	Capacidade de produção
Biomatera, Canadá	PHA (resinas)	Matérias primas renováveis	Bactérias não patogênicas não transgênicas isoladas do solo	
Biomer, Alemanha	PHB (pellets)	Sacarose da beterraba	Não informado	
Bio-On, Itália	PHB, P(HB-co-HV) (esferas)	Açúcar de beterraba	<i>C. necator</i>	10,000 t/a
Danimer Scientific, USA	mcl-PHA	Óleo de canola	Não informado	
Kaneka Corporation, Japão	PHB-PHHx	Óleos vegetais	Não informado	3500 t/a
PHB Industrial, Brasil	PHB, P(HB-co-HV)	Sacarose da cana-de-açúcar	<i>C. necator</i>	3000 t/a
PolyFerm, Canadá	mcl-PHA	Açúcares e óleos vegetais	Microrganismos selecionados naturalmente	
Shenzhen Ecomann, China	PHA	Açúcar ou glicose	Não informado	5000 t/a
SIRIM Bioplastics, Malásia	PHA	Efluente de moinho de óleo de palma	Não informado	2000 t/a
Tianan Biologic, China	PHB, P(HB-co-HV)	Glicose + Propionato	<i>C. necator</i>	10,000 – 50,000 t/a
Tianjin GreenBio, China	P(4HB)	Açúcar	Não informado	10,000 t/a

PHV: poli(hidroxivalerato);; PHP: poli(hidroxipropionato); P4HB: poli(4-hidroxibutirato); P4HB: poli(hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato).

A PHB Industrial S.A., responsável pela marca “*Biocycle*”, é pioneira no Brasil em estudos com o homopolímero PHB e também com o copolímero poli(hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) (PHB-*co*-HV) para aplicações na área de injeção e extrusão. Essa empresa produz PHB através da sacarose obtida da cana-de-açúcar. O preço do PHB brasileiro é, em média, US\$ 5.00, enquanto que o equivalente na Inglaterra custa US\$ 14.00. Isso ocorre pois, apesar de ambos utilizarem o mesmo substrato, o PHB produzido no exterior utiliza a sacarose obtida da beterraba, no Brasil ela é obtida a partir da cana-de-açúcar, diminuindo seu custo no mercado externo (Agência FAPESP 2012). No entanto, a comercialização de PHAs microbianos é ainda restrita ao uso de culturas puras e substratos sintéticos de alto custo tornando o seu preço, mais elevado do que os plásticos convencionais (CHANPRATEEP, 2010).

Estudos no desenvolvimento de processos de produção de PHAs estão centrados em: batelada alimentada, batelada sequencial, batelada sequencial com reciclo externo de células e alta densidade celular, incluindo a utilização de matérias-primas à base de resíduos agroindustriais que possuem baixa, ou moderada, concentração da fonte de carbono. Bons exemplos são o melão cítrico (ARAGÃO et al., 2009), vinhaça (ZANFONATO, 2016), hidrolisado de amido (DALCANTON et al., 2010), soro de leite (MARAGONI et al., 2002), sementes de jaca em pó, mandioca em pó, farelo de trigo, torta de óleo de gergelim, torta de óleo de amendoim e farinha e milho (RAMADAS et al., 2009), lodo ativado de indústria processadora de alimentos (KUMAR et al., 2004), resíduo da produção de suco de pêssgo (KIVANC et al. 2008), glicerol (CAVALHEIRO, 2009), entre outros. O substrato utilizado é decisivo para definir a velocidade específica de crescimento do microrganismo, a produtividade em polímero e os fatores de conversão de substrato em PHB (KADDOR; STEINBÜCHEL, 2011).

4.2 POLI-HIDROXIBUTIRATO) (PHB)

Cerca de 90 monômeros de hidroxialcanoatos estão reportados na literatura. Dentre estes, o poli-hidroxibutirato é o mais produzido naturalmente pelos microrganismos e, também, o mais estudado devido às suas características termoplásticas e mecânicas muito similares às do polipropileno (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995, BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998).

O Quadro 4.2 apresenta uma comparação das principais características dos polímeros PHB e polipropileno. Ambos se fundem a temperaturas muito próximas, 160-180 °C para o PHB e 174-178 °C para o PP.

Quadro 4.2 Comparação entre as propriedades do PHB comercial e do PP

Características	PHB	PP
Temperatura de fusão (c°)	160 a 180	174 a 178
Temperatura de transição vítrea (c°)	-5 a 5	-17 a -10
Grau de cristalinidade (%)	70 a 80	60 a 70
Módulo de elasticidade (GPa)	3,5 a 4	1,7 a 2,8
Resistência à tração (MPa)	30 a 40	34,5 a 38
Resistência à ruptura (%)	5 a 45	60 a 400
Massa molar (g.mol ⁻¹)	5 x 10 ⁴ a 1 x 10 ⁶	2 a 7 x 10 ⁵
Permeabilidade de oxigênio (cm ³ /m ² /atm/dia)	45	1700
Resistência à ultravioleta (UV)	Boa	Baixa
Resistência ao solvente	Baixa	Boa

Fonte: LEE, 1996; REDDY et al., 2003; BASTIOLI, 2005; QUINES, 2015.

Apesar de tanto o PHB quanto o PP apresentarem alto grau de cristalinidade e fundirem a temperaturas próximas, os valores de temperatura de transição vítrea (Tg) são diferentes, indicando que o PP é mais flexível que o PHB. Tg é a temperatura na qual os polímeros passam do estado vítreo para o estado borrachoso, adquirindo certo grau de flexibilidade devido à maior movimentação entre as cadeias macromoleculares, portanto quanto menor a Tg, mais flexível é o polímero. Essa diferença de flexibilidade é confirmada pelo módulo de elasticidade, que está diretamente relacionado com a sua rigidez ou flexibilidade de forma que, quanto mais alto o módulo, maior a rigidez do polímero, sendo os valores para o PP menores que para o PHB. Além disso, a resistência à ruptura de PHB (5 a 8%) é significativamente mais

baixa do que a de PP (400%) (FORMOLO et al., 2003; APATI, 2012; OJUMU et al., 2004).

Estudos sobre as propriedades térmicas e físicas dos polímeros bacterianos têm sido realizados, principalmente com o PHB e seu copolímero P(HB-*co*-HV) (XAVIER et al., 2015; CHEN et al., 2017). Como o PHB é um polímero semicristalino, as suas propriedades são fortemente dependentes do tipo de substrato e das condições de produção, sendo que alterações no processo afetam tanto as propriedades físico-químicas e mecânicas do polímero produzido, quanto seu rendimento e composição monomérica (WELLEN et al., 2013).

O PHB apresenta 100% de estereo especificidade, com todos os átomos de carbono assimétricos na configuração D (-), sendo, portanto, altamente cristalino. Sua cristalinidade varia de 55 a 80% e é relativamente rígido (LEE, 1996). Ele apresenta diversas propriedades úteis para uso em embalagens, tais como resistência à umidade, insolubilidade em água e pureza óptica, além de boa impermeabilidade ao oxigênio, isto o diferencia de outros plásticos biodegradáveis que são solúveis em água ou sensíveis à umidade (OJUMU et al., 2004).

Talvez uma das maiores vantagens que os PHAs apresentam sobre os demais polímeros biodegradáveis é a habilidade de serem degradados sob condições aeróbias e anaeróbias. Eles também podem ser degradados termicamente ou por hidrólise enzimática (GOGOLEWSKI et al., 1990).

Atualmente, o PHB é usado principalmente na indústria médica para suturas internas, pois não é tóxico, é biocompatível e naturalmente absorvido e, portanto, não precisa ser removido cirurgicamente. Outros usos potenciais são como cápsulas em farmacologia e como embalagens. As misturas de PHB são atualmente utilizadas para fazer espumas (para substituir cartões de poliestireno), filme soprado (para sacos de transporte), fibras (para rosca) e moldagem por injeção (RAZA; ABID; BANAT, 2018).

4.3 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE PHAs

O número de bactérias capazes de produzir e acumular PHAs é superior a 300 espécies, porém somente algumas destas foram estudadas e efetivamente empregadas na produção deste biopolímero. Incluem-se neste grupo *C. necator*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Burkholderia sacchari* e, versões

recombinantes de *C. necator*, *Escherichia coli* e *Klebsiella aerogenes* (GUMEL; ANNUAR; CHISTI, 2013). Estas bactérias foram selecionadas pela produção de alta densidade celular, acumulando alta concentração de PHAs em um período relativamente curto de tempo, resultando assim, em alta produtividade.

A escolha do microrganismo a ser utilizado na produção de PHAs depende de fatores que incluem a habilidade da célula em utilizar fontes de carbono de baixo custo (atenção vem sendo dada aos resíduos agrícolas e subprodutos industriais), o custo dos demais constituintes do meio, a velocidade de crescimento, a velocidade de produção de polímero, a qualidade e a quantidade de PHA sintetizado, assim como dos processos de recuperação do produto (LEE; CHOI; WONG, 1999).

C. necator (anteriormente conhecida como *Hydrogenomonas eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* e *Wautersia eutropha* (VANDAMME; COENYE, 2004)) tornou-se um microrganismo modelo para a biossíntese de PHB por apresentar grande quantidade de informações acerca de sua genética e por conseguir até 90% de sua massa celular seca em PHB (STEINBUCHEL; LUTKE-EVERSLÖH, 2003). A produção de PHAs por *C. necator* ocorre geralmente em duas etapas: na primeira etapa, caracterizada como fase de crescimento, todos os nutrientes essenciais ao crescimento celular devem estar disponíveis (RAMSAY et al., 1990). Na segunda etapa, caracterizada como fase de produção, um dos nutrientes essenciais é limitado (por exemplo, nitrogênio, fósforo, oxigênio, etc.) no meio de cultivo e a fonte de carbono mantida em excesso (ANDERSON; DAWES, 1990).

Por outro lado, essa bactéria apresenta algumas desvantagens quanto à dificuldade de controle do processo, ao utilizar fontes de carbono de baixo custo como glicerol, apresentando baixas velocidades de crescimento e síntese de polímero, além de baixo acúmulo de PHB em relação à massa celular seca (CAVALHEIRO et al., 2009 e REINECKE; STEINBUCHEL, 2009).

Avanços na compreensão da bioquímica e da biologia molecular envolvidas na biossíntese de PHAs e a clonagem dos genes responsáveis por essa biossíntese, em várias bactérias, conduziram ao desenvolvimento de bactérias recombinantes com uma capacidade superior de produção de biopolímero. A partir de técnicas de engenharia genética, é possível desenvolver organismos, viabilizando ampliar a gama de substratos utilizáveis, aumentar a capacidade de sintetizar PHAs e produzir novos tipos de PHAs (RAZA; ABID; BANAT, 2018). Assim, cada vez mais microrganismos recombinantes são utilizados pela

indústria para a produção de substâncias desejáveis (PAIS et al., 2014). Por exemplo, *Escherichia coli* bactéria não produtora de PHAs, mas com a utilização da engenharia genética foram desenvolvidas várias vias metabólicas que levaram a acúmulos de PHAs altamente produtivos a baixo custo (AHN et al., 2001).

A clonagem de genes associados à biossíntese de PHA, em particular de PHA sintases, cria a possibilidade de construção de linhagens recombinantes capazes de sintetizar PHA ainda não detectados em linhagens selvagens. As bactérias mais comumente usadas como hospedeiras para a produção de PHAs e no desenvolvimento de estratégias de cultivo são *C. necator*, *P. putida*, *P. oleovorans* e *E. coli* (ALDOR; KEASLING, 2003; REDDY et al., 2003).

Bactérias como *E. coli* não possuem a capacidade de sintetizar ou degradar PHAs, todavia *E. coli* cresce com velocidade específica mais elevada que *C. necator*, por exemplo, e são de fácil lise. A lise mais fácil das células pode proporcionar economia de custos durante a purificação de biopolímero. Alterações genéticas em bactérias como a *E. coli* podem levar, por exemplo, à síntese de poli(hidroxipropionato) (PHP), que não é sintetizado por nenhum microrganismo selvagem conhecido (ANDREESSE et al., 2010).

A síntese de PHB foi demonstrada por Andreesse e colaboradores (2010), em que se estabeleceu uma via metabólica não natural em *E. coli* para sintetizá-la a partir de glicerol. Entretanto, uma desvantagem da produção de PHB a partir de *E. coli* é a formação de flagelos, durante a síntese do polímero. A formação de filamentos faz com que as células fiquem alongadas, causa redução da velocidade de crescimento celular e menor atividade metabólica causando, conseqüentemente, menor acúmulo de polímero (LEE et al., 1994).

Matsumoto e colaboradores (2001) desenvolveram uma cepa de *C. necator* recombinante utilizando o gene da PHA sintase de *Pseudomonas* sp. Essa cepa recombinante foi capaz de sintetizar o copolímero poli(hidroxibutirato-co-3-hidroxialcanoato) (P(3HB-co-3HA)) de forma randômica com unidades de 3HBs e 3HAs de cadeia média.

Mukoyama (2007) reportou a introdução dos genes *glpF* e *glpK* em *Corynebacterium glutamicum*, *C. necator* ATCC 17697 e *Alcaligenes faecalis* e melhorou significativamente o crescimento em meio contendo glicerol.

Zanfonato (2016), com o objetivo de aprimorar a utilização de glicerol por *C. necator* DSM 545, realizou a inserção dos genes de

assimilação do glicerol de *E. coli*: *glpF* e *glpK*, codificando respectivamente uma enzima aquaporina e a glicerol quinase, e obteve a construção resultando um recombinante denominado *C. necator_glpFK*. Segundo esse autor, a cepa recombinante foi capaz de acumular 34% de biopolímero, em modo batelada em meio com vinhaça adicionada de glicerol, com produtividade de $0,18 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, ao passo que a cepa parental foi capaz de acumular 15% com produtividade de $0,05 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

4.4 BIOSSÍNTESE DE PHB

Dentre as vias de biossíntese de PHAs, a mais estudada e conhecida é a via de biossíntese de PHB por *C. necator* H16. Há muitos estudos com esta cepa, com foco na bioquímica e em biologia molecular para a síntese de PHAs, uma vez que, todo o genoma de *C. necator* H16 já foi sequenciado (POHLMANN et al., 2006).

Independentemente do substrato utilizado, a síntese de PHAs depende da formação de acetil-CoA, um intermediário entre as vias de degradação de carboidratos e o ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) (STEINBUCHER; LUTKE-EVERSLOH, 2003).

Para que a biossíntese de PHAs por *C. necator* ocorra, é necessária a limitação de um nutriente essencial, não fonte de carbono, como o N, P, Mg, O, entre outros. Durante a fase de crescimento, *C. necator* cataboliza os carboidratos pela via de Entner-Doudoroff (ED) a piruvato, que é desidrogenado a acetil-CoA. Durante o crescimento celular, o acetil-CoA entra no ciclo do TCA, liberando CoASH e é oxidado a CO_2 , gerando energia e precursores biossintéticos. Ao ocorrer a limitação de um nutriente essencial, a produção de proteínas é cessada, o que provoca a elevação da concentração de NADH e NADPH, resultando na inibição da citrato sintase e isocitrato desidrogenase e, conseqüentemente, uma redução do TCA e direcionamento do acetil-CoA à via de biossíntese de PHAs (IENCZAK; ARAGÃO, 2011).

Em *C. necator*, o processo de síntese de PHB, ocorre a partir de acetil-CoA, envolvendo uma sequência de três reações catalisadas respectivamente, pelas enzimas β -cetotiolase (PhbA), acetoacetil-CoA redutase NADPH-dependente (PhbB) e PHA sintase (PhbC). Nessa bactéria, os genes codificadores das três enzimas, *phbA*, *phbB*, *phbC*, encontram-se agrupados em um operon, ou seja, os três genes são contíguos e sob um único controle de expressão, de tal modo que, nos isolados nativos de *C. necator*, ocorre a expressão simultânea dos três genes ou de nenhum deles (REHM, 2003; STUBBE; TIAN, 2003; SURIYAMONGKOL et al., 2007).

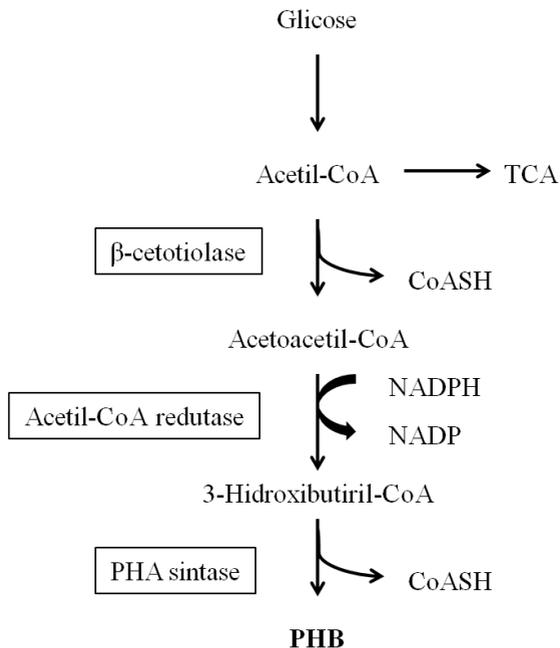
A primeira etapa da via de produção de PHB é catalisada pela β -cetotiolase que liga duas moléculas de acetil-CoA para formar respectivamente um acetoacetil-CoA. A β -cetotiolase é a enzima que controla a síntese de PHA por *C. necator*, com a coenzima A (CoASH) atuando como reguladora do seu efeito metabólico (ANDERSON; DAWES, 1990). Concentrações elevadas de coenzima A, liberadas quando acetil-Coa entra no TCA, inibem a β -cetotiolase.

A segunda etapa é realizada pela ação da enzima acetoacetil redutase NADPH dependente que reduz estereoespecificamente o acetoacetil-CoA em 3-hidroxiacetil-CoA (MADISON; HUISMAN, 1999). De acordo com Volova e colaboradores (2004), é a acetoacetil redutase que determina a velocidade específica de biossíntese do polímero.

A terceira etapa é catalisada pela enzima PHA sintase, que realiza a conversão estereoseletiva do (R)-3-hidroxiacetil-CoA em PHB (HAYWOOD et al., 1989; SUDESH et al., 2000). Esta enzima é apresentada de duas formas, uma solúvel no citoplasma (crescimento balanceado) e outra associada aos grânulos de PHAs (crescimento desbalanceado). Baseado nos tipos de monômeros incorporados na cadeia de PHAs, várias vias metabólicas são apresentadas para a geração destes monômeros (STEINBUCHEL; LUTKE-EVERSLOH, 2003). Ambas as formas atuam sobre polímeros de cadeia lateral curta (de 3 a 5 átomos de carbono) 3-hidroxiacetil-CoA (VOLOVA, 2004).

A Figura 4.2 mostra, esquematicamente, a biossíntese de PHB a partir de glicose em *C. necator*.

Figura 4.2 Esquema simplificado da via metabólica de produção de PHB em *C. necator*, a partir de glicose (MADISON; HUISMAN, 1999)



4.4.1 Outras enzimas envolvidas no metabolismo e estrutura dos grânulos de PHAs

A formação do polímero é um processo complexo determinado não somente pelas enzimas diretamente envolvidas na via sintética do PHA, mas também por outros importantes aspectos do metabolismo celular.

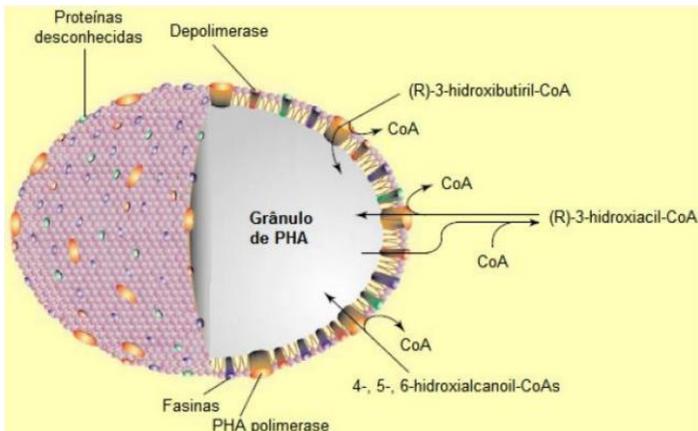
Os PHAs são acumulados por microrganismos, sob a forma de grânulos no citoplasma celular como reserva de carbono, energia e poder redutor. Estas inclusões são geralmente esféricas, com diâmetros médios de 0,2-0,5 μm , visíveis em microscópio óptico (KIM; LENZ, 2001).

Em *C. necator*, foram descritas quatro classes de proteínas, compondo os grânulos: a classe I compreende as PHA sintases, a classe II compreende as PHA despolimerases, que são as enzimas responsáveis pela mobilização intracelular dos PHAs, a classe III é composta pelas proteínas não catabólicas denominadas fasinas (PhaP) que podem

constituir cerca de 5% do total de proteínas presentes no grânulo (DENNIS et al., 2008). Estas proteínas agem como uma barreira entre o citoplasma celular e o polímero, evitando sua interação com outros componentes celulares (ALMEIDA et al., 2007). As fasinas parecem controlar o tamanho dos grânulos, podendo participar na regulação da síntese e degradação (POTTER et al., 2002; KUČHTA et al., 2007).

A classe IV engloba todas as outras proteínas associadas ao grânulo, como as proteínas regulatórias (PhaR) que funcionam como um regulador negativo na síntese das fasinas (POTTER; MÜLLER; STEINBÜCHEL, 2005). A Figura 4.3 mostra a organização das proteínas envolvidas na biossíntese dos PHAs.

Figura 4.3 Organização dos grânulos e moléculas envolvidas na biossíntese e no catabolismo de PHAs



Fonte: Luengo et al. (2003).

Já foi demonstrado que as fasinas são proteínas especificamente ligadas aos grânulos do polímero, que afetam a síntese de PHA e o tamanho dos grânulos (POTTER et al., 2002).

Foram sugeridas três diferentes funções das fasinas na síntese de PHAs. A primeira é relativo à função de que as fasinas podem melhorar a produção de PHA vinculadas aos grânulos, aumentando a superfície/volume dos mesmos. A segunda indica que as fasinas podem ativar a velocidade de síntese dos PHAs pela interação direta com a PHA sintase. E a terceira sugere que fasinas podem promover a síntese de PHA indiretamente, através da prevenção de defeitos de formação associados com outras proteínas celulares (WIECZOREK et al., 1995).

Na ausência das fasinhas, as células acumulam apenas um grande grânulo, ocupando todo espaço disponível na célula (KUCHTA et al., 2007).

4.5 GLICEROL COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO PARA PRODUÇÃO DE PHB

Um dos problemas que impedem a aplicação comercial de PHB é seu alto custo de produção (RAZA; ABID; BANAT, 2018). Do ponto de vista econômico, o custo do substrato (principalmente fonte de carbono) contribui significativamente com os custos de gastos de produção totais desses biopolímeros (LEE; CHOI, 1998).

Nas últimas décadas, tem crescido o interesse na produção de PHA por meio do uso de substratos de baixo custo como, por exemplo, subprodutos provenientes da indústria do etanol e do biodiesel e efluentes (KOLLER et al., 2008).

O resíduo industrial, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois não pode ser acumulado indefinidamente no local em que foi produzido. A disposição destes no meio ambiente, por meio de emissões de matéria e de energia lançados na atmosfera, nas águas ou no solo deve ocorrer após os resíduos e efluentes serem tratados e enquadrados nos padrões estabelecidos na legislação ambiental, para não causarem poluição (AQUARONE, 1990). De acordo com Laufenberg e colaboradores (2003), os resíduos e efluentes podem conter muitas substâncias de alto valor, os quais podem ser convertidos em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários a partir do emprego de tecnologias adequadas.

Nesse contexto, diversas matérias-primas de baixo custo, classificadas como recursos renováveis, podem ser utilizadas como fontes de carbono para produção de PHB. Por exemplo, cana-de-açúcar (KULPREECHA et al., 2009), amido de batata (HASS et al., 2014), hidrolisado de amido (DALCANTON et al., 2010), melão cítrico (ARAGÃO et al., 2009), glicerol (CAVALHEIRO et al., 2009), vinhaça (ZANFONATO, 2016), óleos vegetais (VASTANO et al., 2015), soro de leite (BHATTACHARYYA et al., 2012), sementes de jaca em pó, mandioca em pó, farelo de trigo, torta de óleo de gergelim, torta de óleo de amendoim e farinha e milho (RAMADAS et al., 2009), lodo ativado de indústria processadora de alimentos (KUMAR et al., 2004), resíduo da produção de suco de pêssego (KIVANC et al. 2008), resíduo da produção de etanol (vinhaça) (PRAMANIK et al., 2012), entre outros.

O glicerol é uma fonte de carbono que pode ser metabolizada pelos microrganismos através das vias de degradação de açúcares, mas precisa ser fosforilado e oxidado a di-hidroxiacetona fosfato (DHAP).

Contreras e colaboradores (2015) utilizaram glicose e glicerol para a produção de PHB a partir de *C. necator* DSM 545, e o acúmulo final de PHB em meio contendo concentrações inicial de 40 g.L⁻¹ de glicose e 48 g.L⁻¹ de glicerol foi de 44,25%. Para os referidos autores, o glicerol seria um substrato alternativo para a produção de PHB devido ao seu baixo custo. Cavalheiro e colaboradores (2009) estudaram a produção de PHB por *C. necator* DSM 545 a partir de glicerol bruto e obtiveram uma produtividade de PHA de 1,1 g.L⁻¹.h⁻¹. A produtividade encontrada por esses autores é inferior às obtidas quando se utiliza fontes de carbono sintéticas como glicose e sacarose. No entanto, o estudo mostrou que o processo de produção de PHB utilizando glicerol bruto pode ser projetado para produção em grande escala, se acoplada junto a indústria de biodiesel.

Povolo e colaboradores (2012) analisaram a produção de PHA por bactérias isoladas do solo, a partir de resíduos graxos, incluindo o glicerol. Os cultivos foram conduzidos em glicerol (20 g.L⁻¹) sem a adição da fonte de nitrogênio, e com utilização de glicose na pré-cultura, após 72 horas de cultura, obtendo biomassa final de 6,4 g.L⁻¹, com 73% de PHA.

Tanadchangsaeng e Yu (2012) estudaram as limitações de cultivos em glicerol relatando a utilização de glicerol na síntese bacteriana. Comparando-se à glicose, que é uma fonte de carbono para a produção de PHA amplamente estudada, o glicerol é uma fonte considerada moderada por produzir PHB com produtividades relativamente mais baixas. Entretanto, os autores indicaram que glicerol pode ser uma fonte de carbono em potencial, particularmente quando a velocidade de crescimento celular não é limitada pela fonte de carbono ou outros fatores, como o suprimento de oxigênio.

4.5.1 Glicerol

Devido às perspectivas de substituição de combustíveis fósseis, a produção de biodiesel cresceu continuamente na última década. A partir de 2008, o governo brasileiro estabeleceu a adição de 2% de biodiesel ao óleo diesel comercializado e a adição deve chegar a 10% até 2019, segundo a lei nº 13.263, de 23 de março de 2016. Como consequência, as indústrias de biodiesel estão de frente para um excedente do seu

subproduto principal, com aproximadamente 1 kg de glicerol sendo gerado a cada 10 kg de biodiesel produzido o que representa 10% (v.v⁻¹), do éster final (SHARMA et al., 2016).

No Brasil, a produção de biodiesel alcançou 3,9 bilhões de litros em 2015, um crescimento de 15% em relação a 2014, conforme levantamento da Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (Abiove) com base em dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) (http://www.abiove.org.br/site/_FILES/Portugues/05022016-175629_05_02_2016_estadao_conteudo.pdf).

O biodiesel é obtido a partir da reação de transesterificação de triglicerídeos com um álcool, geralmente metanol, na presença de um catalisador. Durante a produção desse biocombustível, duas fases normalmente são formadas, com o biodiesel localizado na fase superior e o glicerol bruto na fase inferior, em função da diferença de densidade e de polaridade. O glicerol bruto é uma mistura formada por glicerol e impurezas, como água, metanol, sabão e matéria orgânica (LUO et al., 2016).

A aplicação industrial de glicerol bruto nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética, requer um processo de refino dispendioso, a fim de alcançar o elevado grau de pureza necessário a essas aplicações. Projetos de pesquisa têm sido realizados com o objetivo de encontrar uma nova utilização para o glicerol bruto. Além de novas aplicações na indústria alimentícia e indústria de polímeros, o glicerol também é aplicado como uma matéria-prima para fermentações industriais, conversão microbiana de glicerol bruto em 1,3-propanodiol, H₂ e etanol e ácido cítrico (GARCÍA et al., 2013 YANG et al., 2012).

A conversão microbiana de glicerol por processos biotecnológicos em produtos de maior valor agregado, como biomassa e biomoléculas, é uma alternativa relevante para a maior valorização da produção de biodiesel (TANADCHANGSAENG; YU, 2012).

A utilização do glicerol como substrato envolve vários desafios, entre eles a sua assimilação mais lenta, quando comparado a outras fontes de carbono, como a glicose, por exemplo (KADDOR; STEINBÜCHEL, 2011; SPOLJARIC et al., 2013). O glicerol é considerado uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias sob condições aeróbias e anaeróbias para a obtenção de energia metabólica e é um dos poucos substratos que atravessa a membrana celular por difusão facilitada nas células procarióticas.

Naranjo e colaboradores (2013) demonstraram que a produção de PHB, a partir de glicerol, é 10-20% mais barata que a partir de glicose e

permite a valorização do glicerol em 166%. Cavalheiro e colaboradores (2009) indicaram que o glicerol bruto pode representar 40% do custo total de produção, enquanto no caso da glicose, este valor aumenta para 70-80%. Esses autores sugerem que a utilização deste subproduto para conversão em PHB pode se tornar economicamente viável, se integrado a uma biorefinaria de biodiesel.

Ashby e colaboradores (2004) descreveram o uso de subprodutos da produção de biodiesel contendo glicerol, ácidos graxos livres e resíduo de biodiesel para a produção de polímeros (poliésteres) por síntese bacteriana. Os autores concluíram que os subprodutos do biodiesel podem ser utilizados como fonte de carbono para produzir PHB, dependendo da cepa bacteriana empregada (ASHBY; SOLAIMAN; FOGLIA, 2004).

Fukui e colaboradores (2014) investigaram a expressão de genes responsáveis pelo consumo de glicerol em *C. necator* H16 e concluíram que a inserção dos genes *glpF* e *glpK* de *E. coli* foram suficientes para melhor assimilação de glicerol e para mais eficiente produção de PHB, a partir deste substrato.

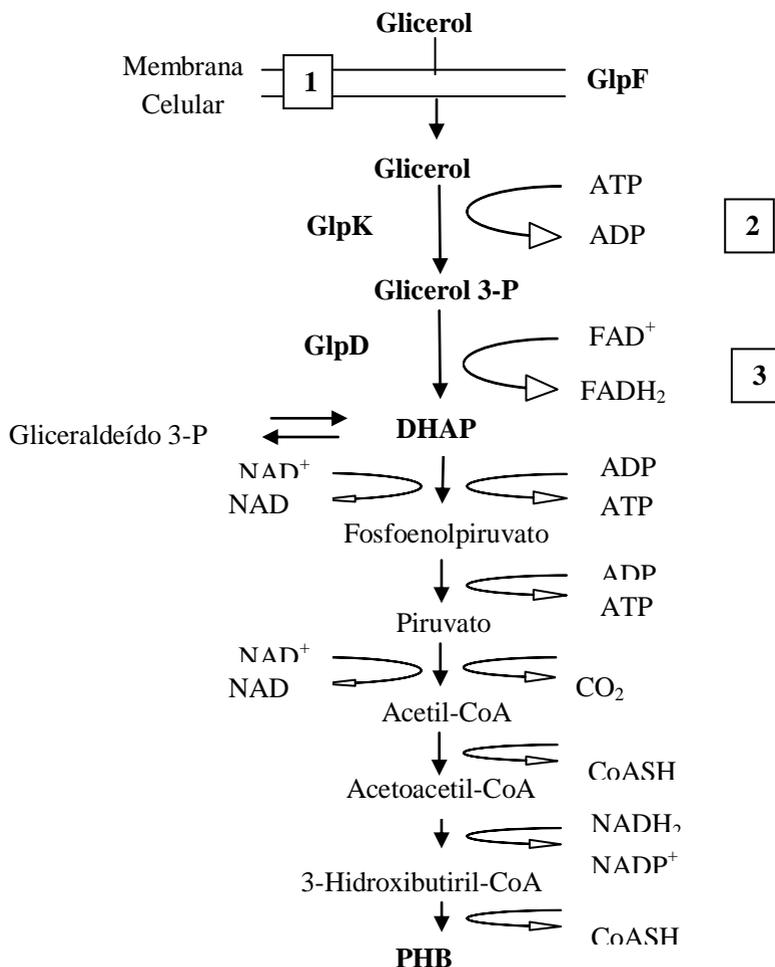
Assim, o aproveitamento do substrato glicerol, para produção de PHB, pode ser uma alternativa promissora. Além disso, a utilização de microrganismo geneticamente modificado associada com estratégia de cultivo adequada pode ser avaliada, a fim de aperfeiçoar a produção de PHB com este subproduto.

4.5.2 Metabolismo do glicerol em *C. necator*

C. necator pode metabolizar o glicerol através das vias de degradação de açúcares. O transporte de glicerol através da membrana celular constitui a primeira etapa para o seu metabolismo, já que o glicerol é transportado para o interior da célula através de difusão facilitada pela ação de uma aquaporina (GlpF). Após a passagem do glicerol através da membrana plasmática, ele é catabolizado pela rota metabólica, apresentada na Figura 4.4. Uma vez dentro da célula, precisa ser fosforilado pela enzima glicerol-quinase (GlpK) para formar glicerol-3-fosfato e, posteriormente, oxidado a di-hidroxiacetona fosfato (DHAP) importante molécula intermediária para a gliconeogênese (SPOLJARIC et al., 2013).

Um esquema da via metabólica para a utilização de glicerol por *C. necator* é apresentada na Figura 4.4.

Figura 4.4 Via metabólica simplificada para a utilização de glicerol para produção de PHB por *C. necator*. Reação 1: entrada do glicerol na célula; Reação 2: a enzima glicerol quinase realiza a fosforilação do glicerol a glicerol 3-fosfato; Reação 3: glicerol 3-fosfato é convertido a DHAP pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (Adaptado de SOLAIMAN; ASHBY; CROCKER, 2016)



Lopar e colaboradores (2014) realizaram estudos *in silico* para analisar o metabolismo de glicerol por *C. necator* e, de acordo com o modelo matemático aplicado por esses autores, resultados similares aos

obtidos experimentalmente com glicose podem ser alcançados em glicerol, desde que não haja limitações no transporte do glicerol (ação da GlpF: Reação 1 indicada na Figura 4.4), na fosforilação do glicerol (ação da GlpK: Reação 2 indicada na Figura 4.4) e oxidação do glicerol 3-fosfato (ação da GlpD: Reação 3). Esses autores concluíram que esforços em engenharia metabólica devem estar concentrados na melhora do sistema de transporte do glicerol para o interior da célula (GlpF), somado à atividade das enzimas glicerol quinase (GlpK) e glicerol 3-fosfato dehidrogenase (GlpD).

4.6 EXTRAÇÃO DE PHB

A última fase da produção de PHB envolve a sua extração das células, pois se trata de um produto acumulado intracelularmente. Esta etapa geralmente é de custo elevado, sendo um entrave para a utilização desses materiais (OJUMU et al., 2004; QUINES, 2015; CORRÊA, 2014). Antes da extração, no fim do cultivo, as células contendo PHB são separadas do meio de cultivo por métodos convencionais como centrifugação, filtração ou floculação (LEE, 1996).

O tratamento da biomassa após o cultivo é opcional e tem a finalidade de aumentar a recuperação polimérica por desestabilização e/ou rompimento da parede celular microbiana. É uma etapa de extrema importância, pois pode acarretar em alterações nas propriedades do produto final (QUINES et al., 2015). Os métodos de extração envolvem processos químicos, físicos ou biológicos, ou combinação desses processos. Dentre os métodos químicos, destaca-se a utilização isolada ou combinada de solventes orgânicos e digestores químicos para a extração do PHB da biomassa sendo clorofórmio, cloreto de metileno, carbonato de propileno e dicloroetano os solventes mais utilizados. Estes solventes rompem as células, solubilizando seus componentes, inclusive os PHAs. Compostos orgânicos polares, como acetonas e álcoois, também podem ser usados. Eles rompem o material celular não polimérico, deixando os grânulos de PHAs intactos (FIORESE, 2008; RAMSAY et al., 1994; HAHN et al., 1995; LEE, 1996).

A técnica de extração de PHB com solventes orgânicos é a mais utilizada devido à sua simplicidade, baixa degradação do polímero extraído e elevada pureza do produto (GUMEL; ANNUAR; CHISTI, 2013). Porém, vários desses solventes orgânicos são tóxicos e altamente voláteis (por exemplo, clorofórmio), o que torna a sua utilização contraditória, uma vez que estes polímeros vêm sendo amplamente

estudados para minimizar as agressões ambientais causadas pelos polímeros de origem petroquímica.

Assim, a utilização de carbonato de propileno, como um solvente pouco agressivo, foi proposta na literatura por Lafferty e Heinzle (1979). O carbonato de propileno apresenta baixa toxicidade e possui alto ponto de ebulição, próximo a 240 °C, permitindo que, durante o processo de extração, ocorra baixo risco de perda por evaporação, podendo ainda ser reutilizado diversas vezes, minimizando assim os custos de produção de PHB (MCCHALICHER; SRIENC; ROUSE, 2009).

Quines (2015) observou a possibilidade de recuperar 80% do carbonato de propileno no processo de extração de PHB. O solvente recuperado foi reutilizado 11 vezes sem perder a eficiência no rendimento e na pureza do polímero obtido, contribuindo para a redução dos custos de produção deste biopolímero, o que torna a extração de PHB com este solvente mais competitiva no que se refere à economicidade do processo.

4.7 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE POLÍMEROS

Dependendo de suas características, os biopolímeros podem ser empregados em diversas áreas como, por exemplo, na indústria farmacêutica e na de alimentos. Podem ser caracterizados pelas suas propriedades mecânicas, grau de cristalinidade, temperatura de transição vítrea, temperatura de degradação, distribuição da massa molar, entre outras. A determinação destas características é de grande importância, pois influenciam diretamente nas aplicações dos biopolímeros (DALCANTON, 2006).

As propriedades físicas, mecânicas e termodinâmicas dos polímeros são dependentes do grau de cristalinidade e da morfologia das regiões cristalinas. A análise térmica diferencial (DTA) e a calorimetria diferencial de varredura, ou calorimetria exploratória diferencial (DSC) são técnicas normalmente empregadas para a análise térmica de materiais. Para a caracterização de propriedades mecânicas como resistência à tração e elasticidade existem vários tipos de ensaios, porém grande parte dos ensaios mecânicos pode ser registrada por meio de curvas de tensão por deformação. No que se refere aos aspectos estruturais de composição química, estrutura configuracional e conformacional, a espectroscopia no infravermelho é uma das ferramentas de caracterização de materiais poliméricos mais utilizadas. Quanto às propriedades do polímero tais como resistência na ruptura,

deformação na ruptura e resistência ao impacto, serão diretamente afetadas pela massa molar, que pode ser determinada pela cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) ou pela medida da viscosidade de soluções poliméricas (CANEVAROLO, 2006).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

5.1.1 Microrganismo

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram as linhagens bacterianas *C. necator* DSM 545 (parental) e *C. necator_glpFK* (cepa recombinante capaz de assimilar de forma mais eficiente o glicerol, desenvolvida por Zanfonato (2016)). Estas cepas permaneceram congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (em microtubos de plástico) em caldo nutriente NB (Nutrient Broth – DifcoTM), contendo peptona de carne 5 g.L^{-1} e extrato de carne 3 g.L^{-1} , e glicerol (1:1 v/v), até a utilização.

5.1.2 Meio 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 meio mineral (MM1).

Em todos os experimentos, o meio de cultura utilizado para a reativação das cepas foi o *Nutrient Broth* (NB - Difco), com a seguinte composição: 5 g.L^{-1} de peptona de carne e 3 g.L^{-1} de extrato de carne.

No pré-inóculo do cultivo em glicerol puro, as células foram transferidas de microtubos de plásticos (estoque) para frasco *Erlenmeyer* aletado de 500 mL contendo 150 mL de caldo nutriente NB. Para os cultivos com adição de glicose combinada ao glicerol, as células foram transferidas de microtubos e inoculadas em 75 mL de meio NB (*Erlenmeyer* aletado de 250 mL), ambos foram incubados em agitador orbital (New Brunswick Sci. Company Inc., New Jersey, USA) a 150 rpm e $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. O tempo de incubação foi o requerido para obter-se absorbância (600 nm) de aproximadamente 2, 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 (MM1), descrito por Aragão e colaboradores (1996) com modificações e sem limitação de nitrogênio. A seguir será apresentada a composição do meio mineral.

Para os cultivos realizados em biorreator, o inóculo foi realizado em *Erlenmeyer* aletado de 1000 mL contendo 400 mL de MM1, 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.

Em ambos os casos, agitador orbital ou biorreator, a composição do meio mineral (MM1) (descrito por Aragão e colaboradores (1996) com modificações) utilizado foi (em g.L⁻¹): KH₂PO₄ 1, citrato de amônio e ferro III 0,06, CaCl₂.2H₂O 0,01, MgSO₄.7H₂O 0,5, ureia 2, ácido nitrilotriacético 0,19 e solução de elementos traço 1 mL.L⁻¹. A solução de elementos traço tem a seguinte composição (em g.L⁻¹) H₃BO₃ 0,3, CoCl₂.6H₂O 0,2, ZnSO₄.7H₂O 0,1, MnCl₂.4H₂O 0,03, Na₂MoO₄.2H₂O 0,03, NiCl₂.6H₂O 0,02 e CuSO₄.5H₂O 0,01.

5.1.2.1 Fontes de carbono

Neste trabalho os cultivos foram realizados utilizando-se: glicose PA (Dinâmica) e glicerol PA (Neon Comercial).

5.1.2.2 Preparo das fontes de carbono

Para utilização como fonte de carbono nos experimentos, o glicerol foi diluído em água destilada na proporção de 1:0,66. Essa diluição foi realizada para reduzir a viscosidade da fonte de carbono e atingir concentração de aproximadamente 500 g.L⁻¹. A glicose foi dissolvida em água destilada para atingir concentração de aproximadamente 500 g.L⁻¹.

As soluções foram submetidas à esterilização em autoclave (121 °C, 1,1 atm, 15 min) e posteriormente quantificadas quanto aos teores de glicose e glicerol, de acordo com determinações descritas posteriormente.

5.1.3 Cultivos em agitador orbital

Com o objetivo de comparar o desempenho das cepas *C. necator* DSM 545 (parental) e *C. necator_glpFK* (recombinante) em glicerol

puro e glicose combinada a glicerol foram realizados cultivos em agitador orbital.

Os experimentos foram realizados por meio de dois pré-cultivos. Para os cultivos em glicerol puro, as células das duas cepas foram inoculadas em 150 mL de meio NB (*Erlenmeyer* aletado de 500 mL) e mantidas a 30 °C/150 rpm por 24 horas. Este experimento foi realizado com objetivo de confirmar o melhor desempenho da cepa recombinante frente à cepa parental, como observado anteriormente em trabalhos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa.

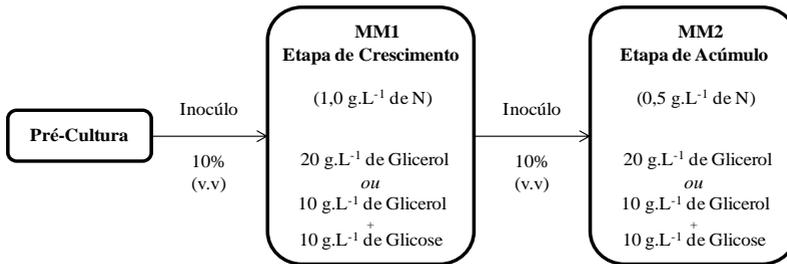
Para os cultivos com adição de glicose combinada a glicerol, as células foram inoculadas em 75 mL de meio NB (*Erlenmeyer* aletado de 250 mL) e mantidas a 30 °C/150 rpm por 24 horas para a cepa parental e por 18 horas para cepa recombinante. O tempo de incubação foi diferente para cada cepa, pois este é o tempo necessário para que a medida de absorvância (600 nm) atinja aproximadamente 2, que é a concentração máxima em que as células ainda se encontram na fase exponencial de crescimento (segundo estudos anteriormente realizados em nosso grupo de pesquisa).

No segundo pré-cultivo, foi utilizado o meio mineral (MM1), sem limitação em nitrogênio e com adição das fontes de carbono: glicerol puro (20 g.L⁻¹) ou glicerol (10 g.L⁻¹) combinada a glicose (10 g.L⁻¹). Estas culturas foram conduzidas em agitador orbital, em frascos *erlenmeyer* aletados de 1 L, com 300 mL de meio a 30 °C/150 rpm. A composição do meio mineral utilizado está descrita no item 5.1.2.

O cultivo (em meio MM2), partiu do inóculo obtido no segundo pré-cultivo (MM1), com a mesma composição de sais e com concentração inicial de nitrogênio de 0,5 g.L⁻¹. A concentração inicial de nitrogênio foi reduzida no meio MM2 para permitir o acúmulo de PHB durante o cultivo, após a produção de aproximadamente 7,0 g.L⁻¹ de biomassa, baseado no fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual ($Y_{Xr/SN} = 8,0 \text{ g.g}^{-1}$) obtido anteriormente no grupo de pesquisa. O pH foi corrigido para 7,0, com adição de soluções de NaOH 2,5 mol.L⁻¹ ou HCl 2,7 mol.L⁻¹ ao longo do cultivo, de forma asséptica.

Na Figura 5.1 pode-se visualizar uma representação das condições de cultivo.

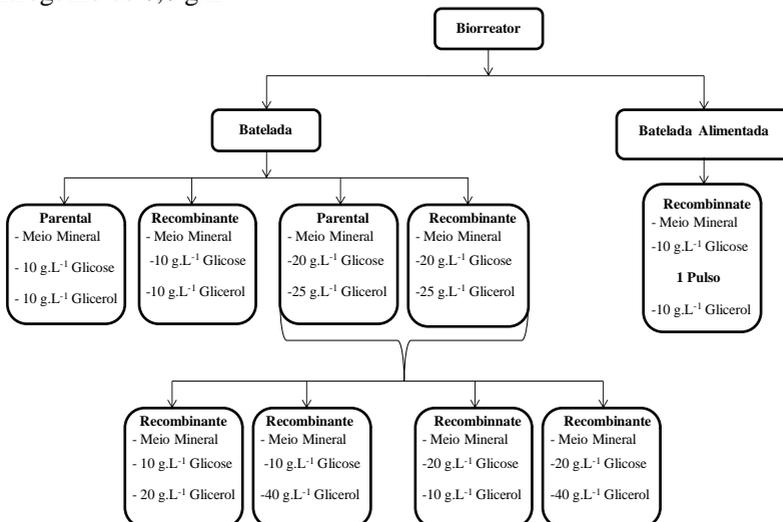
Figura 5.1 Representação das condições de cultivo nas concentrações de glicerol (20 g.L⁻¹) e glicerol (10 g.L⁻¹) combinado a glicose (10 g.L⁻¹) em *C. necator* DSM 545 e *C. necator_glpFK*



5.1.4 Cultivos em biorreator

Para facilitar o entendimento dos cultivos realizados em biorreator, a Figura 5.2 mostra uma visão geral desses experimentos. Os cultivos foram realizados em biorreator (BIOFLO III, New Brunswick Scientific) de 5 L, com volume útil de 4 L, contendo glicerol e glicose e demais nutrientes.

Figura 5.2 Representação das condições de cultivo em biorreator para cepa parental e recombinante em meio MM2 com concentração de nitrogênio de 0,8 g.L⁻¹



Primeiramente, quatro cultivos em modo batelada foram realizados a fim de se comparar o desempenho das cepas estudadas: dois cultivos com concentrações de 10 g.L⁻¹ de glicose combinada a 10 g.L⁻¹ de glicerol e mais dois cultivos de 20 g.L⁻¹ de glicose e 25 g.L⁻¹ de glicerol para ambas cepas estudadas. Todos os cultivos realizados tiveram a mesma concentração inicial de nitrogênio 0,8 g.L⁻¹, em meio mineral. A partir desses cultivos, verificou-se um melhor desempenho pela cepa recombinante e esta foi utilizada para dar prosseguimento ao trabalho.

Posteriormente, foram realizados quatro cultivos em modo batelada a fim de se comparar a influência da concentração dos substratos glicose e glicerol no crescimento e produção de PHB por *C. necator_glpFK*. As concentrações iniciais de glicose, glicerol e nitrogênio, dos cultivos podem ser visualizadas na Figura 5.2.

Por fim, foi realizado um cultivo com concentrações iniciais de 10 g.L⁻¹ glicose, e 0,8 g.L⁻¹ nitrogênio, operado em modo batelada alimentada. Nesse cultivo, a concentração de 10 g.L⁻¹ glicerol foi adicionada quando a concentração de glicose baixou para 3,54 g.L⁻¹ que, por coincidência, era no início da fase de produção, na forma de pulso.

O biorreator foi operado, em todos os cultivos, com temperatura a 30 °C e o pH em 7,0 com adição de NaOH 2,5 mol.L⁻¹ ou HCL 2,7 mol.L⁻¹, com condições iniciais de agitação e aeração de 450 rpm e 0,1 vvm, respectivamente, sendo aumentadas gradualmente de forma que a concentração de oxigênio dissolvido no meio não fosse inferior a 40%, em relação à saturação com ar atmosférico. Como antiespumante, foi utilizado o polipropilenoglicol, quando necessário.

5.2 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

5.2.1 Amostragem

A amostragem dos cultivos em agitador orbital e biorreator foram realizadas em intervalos de aproximadamente 2 h. A cada amostragem, 6 alíquotas de 2 mL foram coletadas em microtubos de plástico e centrifugadas a 10956 xg por 3 min. Os sobrenadantes foram congelados e posteriormente utilizados para as análises de consumo de glicose, glicerol e nitrogênio ao longo do cultivo. Os precipitados foram lavados com 1 mL de água destilada, sendo 3 amostras submetidas à secagem (análise gravimétrica) e 3 amostras congeladas para posterior quantificação do polímero produzido.

5.2.2 Determinação da concentração da biomassa

Ao longo de todos os cultivos, a biomassa foi determinada indiretamente por espectrometria através de leitura da absorbância em espectrofotômetro (modelo 1105, BEL) a 600 nm.

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

5.2.3 Determinação das concentrações de glicose, glicerol e nitrogênio

A determinação de glicose foi realizada pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). O nitrogênio foi determinado utilizando-se o *Kit* Uréia ES (Gold Analisa) que determina a concentração de ureia pelo método enzimático-colorimétrico, em que a ureia, pela ação enzimática, é decomposta em nitrogênio amoniacal e determinado por colorimetria. A determinação de glicerol foi determinada utilizando-se o *kit* Triglicérides Liquiform (Labtest Diagnóstica) que determina triglicérides pela metodologia colorimétrica enzimática, em que o glicerol é um intermediário das reações enzimáticas envolvidas. As absorbâncias das amostras foram lidas a 600, 540, 505 nm, respectivamente para glicose, nitrogênio e glicerol em espectrofotômetro (modelo 1105, BEL).

5.2.4 Determinação da concentração de PHB

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

Para a metanólise, após o descongelamento das amostras, o precipitado foi ressuspenso em 2 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol acidificado (H₂SO₄ 15%), contendo ácido benzóico 0,40 g.L⁻¹ como padrão interno. A suspensão foi homogeneizada em vórtex e então as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 140 min. Após resfriamento, adicionou-se 1 mL de água destilada. A fase orgânica (inferior) foi retirada com auxílio de pipeta de *Pasteur* e armazenada sob refrigeração para posterior análise por cromatografia gasosa. Para isso utilizou-se

coluna capilar com sílica fundida Rtx®-Wax (Crossbond® polyethylene glycol - 30m x 0,25mm x 0,25 µm). O cromatógrafo utilizado foi um SHIMADZU GC-14B equipado com detector de ionização de chama (FID ar-hidrogênio). O gás de arraste foi o nitrogênio com vazão constante de 40 mL.min⁻¹. As temperaturas de injeção, detecção e coluna foram 250, 250 e 120 °C, respectivamente.

5.3 TRATAMENTO DOS DADOS

Uma vez que o acúmulo de PHB é intracelular, as velocidades específicas de crescimento celular e de produção de PHB são calculadas em relação à biomassa residual (X_r), obtida pela diferença entre a quantidade de biomassa total (X_t) e a quantidade de PHB (Equação 1). O ajuste polinomial aos dados experimentais de concentração de X_t e PHB foi realizado com o auxílio do *software* Microsoft Excel 2007 suplementado do macro Lissage (desenvolvido por Simões, Arroyo e Uribebarrea, *Institut National des Sciences Appliquées* - Toulouse, França).

$$X_r = X_t - \text{PHB} \quad (1)$$

A partir dos perfis de concentração de biomassa residual, é possível determinar as velocidades específicas de crescimento celular (μ_{X_r}) e produção de PHB (q_p), as produtividades globais e da fase de produção.

5.3.1 Velocidade específica de crescimento celular e produção de PHB

A partir dos perfis de crescimento celular e formação de produto, foi possível determinar, em cada instante, as velocidades instantâneas de crescimento celular (dX_r/dt) e de formação de produto ($d\text{PHB}/dt$). Dividindo-se as velocidades instantâneas pela concentração celular residual (no instante t), as velocidades específicas de crescimento celular (μ_{X_r}) e formação de produto (q_p) foram obtidas e estão representadas pelas Equações 2 e 3.

$$\mu_{X_r} = \frac{1}{X_r} \cdot \frac{dX_r}{dt} \quad (2)$$

$$q_p = \frac{1}{X_r} \cdot \frac{dPHB}{dt} \quad (3)$$

Ao se integrar a Equação 2 de $t = 0$ a t , é possível obter uma equação de primeiro grau (Equação 4), onde X_{r0} é a concentração inicial de X_r . O valor de $\mu_{X_{rmax}}$ é obtido pelo ajuste da Equação 4 aos dados de X_r da fase exponencial de crescimento.

$$\ln X_r = \ln(X_{r0}) + \mu_{X_{rmax}} \cdot t \quad (4)$$

5.3.2 Percentual de PHB

O percentual de PHB acumulado foi calculado ao se dividir a concentração de PHB (g.L^{-1}) pela concentração de biomassa total (X_t (g.L^{-1})). Para esse cálculo, considerou-se o mesmo tempo de fase de produção (depois da exaustão em nitrogênio), para permitir a comparação entre os cultivos.

5.3.3 Produtividade de PHB

A produtividade global (Equação 5) foi calculada pela diferença entre a concentração de PHB (g.L^{-1}) em um instante de tempo t ao longo do cultivo e a concentração inicial de PHB, dividida pelo intervalo de tempo correspondente.

$$P_r = \frac{PHB_t - PHB_{t_0}}{t - t_0} \quad (5)$$

Onde: P_r é a produtividade média de PHB ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); PHB_t a concentração de PHB no instante de tempo t (g.L^{-1}) e PHB_{t_0} a concentração de PHB no tempo t_0 inicial (g.L^{-1}).

5.3.4 Produtividade da fase de produção de PHB

A produtividade da fase de produção (Equação 6) foi calculada pela diferença entre a concentração de PHB, em um instante de tempo t ao longo da fase de produção, e a concentração inicial de PHB, no início da fase de produção, dividida pelo intervalo de tempo correspondente.

$$P_{rPHB} = \frac{PHB_t - PHB_{t_0p}}{t - t_{0p}} \quad (6)$$

Onde: P_{rPHB} é a produtividade média de PHB ($g.L^{-1}.h^{-1}$); PHB_t a concentração de PHB no instante de tempo t ($g.L^{-1}$) e PHB_{t_0} a concentração de PHB no tempo t_0 inicial ($g.L^{-1}$).

5.3.5 Fatores de conversão

Os fatores de conversão de substrato em célula ($Y_{Xr/Glicose}$ e $Y_{Xr/Nitrogênio}$), e substrato em PHB ($Y_{PHB/Glicerol}$) foram calculados por meio do coeficiente angular da reta obtida relacionando-se a concentração celular ou a concentração de PHB ($g.L^{-1}$) em função da concentração de substrato ($g.L^{-1}$) observadas ao longo do tempo.

5.3.6 Determinação do oxigênio dissolvido

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

5.3.7 Transferência e consumo de oxigênio durante o cultivo: determinação do K_La e QO_2

Durante o cultivo, oxigênio é injetado no biorreator e parte dele dissolve-se no meio líquido. Determinada quantia deste oxigênio é consumido pelo microrganismo para manutenção e crescimento celular. O balanço de oxigênio apresentado na Equação 7 representa este fenômeno.

$$\frac{dC}{dt} = K_La(C_s - C) - QO_2X \quad (7)$$

Onde: QO_2 : velocidade específica de respiração ($gO_2.g_{cel}^{-1}.h^{-1}$); K_La : coeficiente volumétrico de transferência de O_2 (h^{-1}); C_s :

concentração de saturação de O_2 dissolvido no líquido ($gO_2.L^{-1}$); C : concentração de oxigênio no meio líquido ($gO_2.L^{-1}$); X : concentração de biomassa ($g_{cel}.L^{-1}$).

A variação da concentração de OD no líquido é o resultado da diferença entre a quantidade que se consegue dissolver ($K_{La}(C_s - C)$) e o oxigênio consumido pelo microrganismo (QO_2X). A cinética do cultivo esta considerada pela equação anterior, pois X varia com o tempo e QO_2 varia com μ_{Xr} , atingindo-se seu valor máximo quando $\mu_{Xr} = \mu_{max}$ (velocidade específica máxima de crescimento celular).

A determinação do K_{La} e da QO_2 foi realizada com emprego do método dinâmico (SCHMIDELL, 2001). Por este método, em determinado instante do cultivo, interrompe-se a aeração para anular a transferência de oxigênio. Conforme ilustra a Figura 5.3, a concentração de OD (C_0), no instante inicial começa a diminuir e o sinal do sensor e registrado continuamente. Ao se atingir certo valor (C_{01}), retoma-se a aeração nas condições anteriores e registra-se o aumento da concentração de OD ate atingir novamente o valor inicial (C_0). Este procedimento deve levar somente alguns minutos, dependendo do estágio do cultivo, sendo importante que a concentração não atinja valores críticos que prejudiquem o metabolismo. Nesse curto espaço de tempo, pode-se supor que não ocorre aumento de X e que QO_2 se mantém constante.

Para o trecho sem aeração, resulta a Equação 8.

$$\frac{dC}{dt} = -QO_2X \quad (8)$$

Com a consideração anterior de que QO_2X e constante, a Equação 8 pode ser integrada resultando na Equação 9.

$$C = C_0 - QO_2X(t - t_0) \quad (9)$$

A Equação 9 prevê uma variação linear com o tempo no trecho sem aeração. Assim, foi obtido o valor de QO_2 através do coeficiente angular QO_2X e do valor de X obtido da análise gravimétrica ao longo do tempo de cultivo.

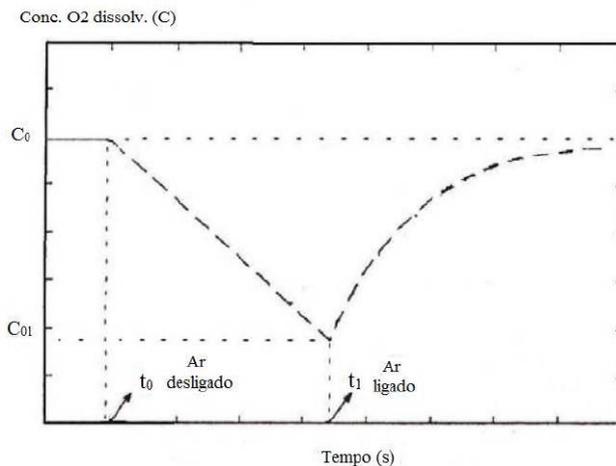
O valor de $K_L a$ foi determinado com a utilização dos dados obtidos durante o aumento da concentração do OD, ilustrado pelo segundo trecho da Figura 5.3, onde a Equação 7 foi aplicada integralmente. Assim, rearranjando-se a Equação 7, obtém-se a Equação 10.

$$\frac{dC}{dt} = K_L a \left(C_s - \frac{QO_2 X}{K_L a} \right) - K_L a C \quad (10)$$

Considerando estado estacionário no momento que antecede a interrupção da aeração ($C = C_0$), chega-se a Equação 11.

$$C_0 = C_s - \frac{QO_2 X}{K_L a} \quad (11)$$

Figura 5.3 Ilustração para explicar o método dinâmico utilizado para determinar $K_L a$ e QO_2 (adaptado por SCHMIDELL, 2001)



Introduzindo a Equação 11 na Equação 10, obtém-se a Equação 12.

$$\frac{dC}{dt} = K_L a(C_0 - C) \quad (12)$$

Essa equação pode ser integrada, lembrando que para o instante inicial de retomada da agitação e aeração, ou seja, para $t = t_1$, tem-se $C = C_{01}$, e chega-se a Equação 13.

$$\ln\left(\frac{C_0 - C}{C_0 - C_{01}}\right) = -K_L a(t - t_1) \quad (13)$$

Assim, isolando-se C , e realizando um ajuste não linear aos dados experimentais representados pela segunda parte da Figura 5.3, encontra-se o valor de $K_L a$.

O Microsoft Office Excel 2007 foi utilizado para obter os dados QO_2X e $K_L a$ ao longo do cultivo.

5.3.8 Velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção celular e fator de conversão de oxigênio em células

Microrganismos com alta velocidade específica de crescimento (μ_{Xr}) devem apresentar alta velocidade específica de respiração (QO_2) (SCHMIDELL, 2001). Pirt (1975) sugeriu uma relação linear para relacionar as velocidades, representada pela Equação 14.

$$QO_2 = m_0 + \frac{1}{Y_{X/O}} \mu_{Xr} \quad (14)$$

Onde: m_0 : velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção celular ($g_{O_2} \cdot g_{cel}^{-1} \cdot h^{-1}$); $Y_{X/O}$: fator de conversão de oxigênio para células ($g_{cel} \cdot g_{O_2}^{-1}$).

A velocidade específica de respiração para manutenção celular (m_0) significa o consumo de oxigênio para $\mu_{Xr} = 0$, ou seja, a velocidade específica de consumo de O_2 para manter as células viáveis. Plotando-se

os dados de QO_2 em função de μ_{Xr} , obtém-se os valores de m e $Y_{X/O}$ por meio do coeficiente linear e coeficiente angular da reta de ajuste obtida, respectivamente.

5.4 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PHB

5.4.1 Biomassa e tratamento da biomassa

A biomassa de *C. necator_glpFK* contendo PHB utilizada para a extração foi obtida a partir do cultivo utilizando-se: glicose e glicerol como substratos.

O cultivo com a cepa recombinante a partir de glicose e de glicerol combinados foi em batelada na qual se iniciou com 20 g.L^{-1} de glicose e 10 g.L^{-1} de glicerol. Após o término do cultivo, foram realizados os processos de tratamento térmico, centrifugação, secagem e trituração, antes da extração com solvente baseado em Quines (2015). Esses processos estão descritos abaixo.

A suspensão de biomassa, obtida no cultivo que se utilizou a cepa recombinante, foi submetida à temperatura de $95 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 45 min com agitação, para inativar a enzima PHA depolimerase, responsável pela degradação do biopolímero, e desnaturar as proteínas da membrana e, conseqüentemente, desestabilizar a parede celular e facilitar a ação do solvente na solubilização do PHB intracelular (KAPRITCHKOFF et al., 2000).

Após o tratamento térmico, a suspensão foi centrifugada a 2000 xg por 15 min a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, na centrífuga de modelo 5804 R (Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com água destilada, misturado em vórtex e centrifugado novamente, sob as mesmas condições.

O segundo sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado contendo PHB foi disposto em placas de Petri e em estufa a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h, para secagem. As células contendo PHB foram raspadas das placas de Petri e trituradas utilizando um mixer de mão (NKS, modelo TSK 560), e armazenadas à temperatura ambiente para posterior extração.

5.4.2 Extração de PHB com carbonato de propileno

Para a extração do biopolímero, o carbonato de propileno foi aplicado com a finalidade de permear na membrana celular da bactéria

com biopolímero acumulado, solubilizar e recuperar o PHB, de acordo com a metodologia proposta por Quines (2015).

A extração do biopolímero, pelo método seguido por Quines (2015), utilizou 0,15 g células secas para cada 1 mL de carbonato de propileno aquecido a 150 °C. Segundo o referido autor, o carbonato de propileno pode ser recuperado e reutilizado até 11 vezes sem perder sua efetividade. O solvente empregado no presente trabalho foi o carbonato de propileno já utilizado uma vez em extração anterior e recuperado em rotaevaporador (IKA, modelo RV 10 basic).

A extração foi realizada em rotaevaporador (IKA, modelo RV 10 basic), sob agitação constante de 120 rpm no qual 4,5 g de células secas contendo PHB, previamente trituradas, foram suspensas em 30 mL de solvente e aquecido a 150 °C, por 45 min. Após o tempo de extração, a suspensão continha carbonato de propileno recuperado, debris celulares e PHB, e foi filtrada à quente (100 °C) sob vácuo para separar os debris celulares, sólidos, da solução de solvente com PHB. Os equipamentos utilizados foram compostos por kitassato, funil de porcelana, filtro de papel qualitativo com poro de 14 µm e diâmetro de 12,5 cm (Qualy®) e bomba a vácuo J. B. Industries – DV 200N 250.

Os debris celulares, retidos no filtro, foram lavados com 60 mL de carbonato de propileno recuperado aquecido a 150 °C, e depois descartados junto com o filtro. O permeado, solução de solvente com o biopolímero, permaneceu em repouso por 30 min à temperatura ambiente. Após o repouso, foi feita adição de água na proporção 4:1 (água:solvente), considerando o volume de solvente empregado na extração e para lavagem após a primeira filtração, com a finalidade de precipitar o PHB.

A suspensão de água, carbonato de propileno e PHB foi submetida à agitação constante por 30 min, e submetida à outra filtração, no mesmo aparato que a filtração anterior, porém à temperatura ambiente. O biopolímero, retido no filtro, foi lavado com 200 mL de água destilada e este filtro foi disposto em estufa a 65 °C por 24 h, para secagem do PHB extraído. O filtrado, que é uma solução de solvente e água, pode ser submetida à temperatura de 80 °C no rotaevaporador (IKA, modelo RV 10 basic), sob agitação constante de 120 rpm e utilizando bomba de vácuo para evaporação da água e recuperação do carbonato de propileno.

5.4.3 Caracterização do PHB

O polímero produzido a partir da combinação de glicose e glicerol pela cepa recombinante foi caracterizado por meio das técnicas: espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), viscosidade, análise termogravimétrica (TGA), calorimetria diferencial de varredura ou calorimetria exploratória diferencial (DSC).

5.4.3.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi um importante método para a identificação do biopolímero produzido, realizada pela caracterização dos grupamentos funcionais do biopolímero extraído. O equipamento utilizado foi Cary 600 *Series FTIR Spectrometer* – AGILENT TECHNOLOGIES no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , pela técnica de refletância difusa.

5.4.3.2 Viscosidade

A análise de viscosidade da solução do PHB extraído neste trabalho foi realizada para determinar indiretamente a massa molar média dos polímeros, os quais foram solubilizados utilizando clorofórmio como solvente. Os ensaios foram realizados tanto no biopolímero extraído neste trabalho quanto no polímero comercial da PHB Industrial SA, para haver a comparação dos valores.

O preparo das amostras ocorreu da seguinte forma: cerca de 0,5 g de cada polímero foi dissolvido em 100 mL de clorofórmio, utilizando balão volumétrico. A partir desta solução concentrada, 5 diluições foram preparadas seguindo o Tabela 5.4, sendo $V_{\text{sol.conc.}}$ o volume de solução concentrada do balão volumétrico utilizada; V_{solvente} o volume de clorofórmio adicionado em cada diluição; V_{final} o volume final de cada diluição.

Tabela 5.1 Preparo das soluções poliméricas para medidas de viscosidade relativa

Solução	V_{sol.conc.} (mL)	V_{solvente} (mL)	V_{final} (mL)	Concentração de PHB (c) (g.mL ⁻¹)
1	1	9	10	0,5x10 ⁻³
2	2	8	10	1,0x10 ⁻³
3	4	6	10	2,0x10 ⁻³
4	6	4	10	3,0x10 ⁻³
5	8	2	10	4,0x10 ⁻³
6	9	1	10	4,5x10 ⁻³

Após o preparo das diluições, um viscosímetro capilar CANNON-FENSKE n° 150, foi acoplado em um sistema de viscosímetro modular Viscosystem® AVS 470 equipado com termostato SCHOTT CT 52. Esse equipamento foi utilizado para determinar o tempo requerido para o escoamento do solvente puro (t_0) e o tempo requerido para que cada solução polimérica passe através do tubo capilar (t). Cada medida foi repetida 5 vezes, de modo a se obter um valor médio do tempo de 5 medidas bem próximas.

É possível relacionar, para um determinado viscosímetro, a viscosidade como função apenas da densidade da solução e do tempo de escoamento da mesma no capilar, sendo que os demais fatores são constantes (REOLON, 2011). Como a viscosidade relativa é a relação entre a viscosidade das soluções poliméricas (η) e a viscosidade do solvente puro (η_0), para soluções muito diluídas, a densidade específica da solução (ρ) é aproximadamente o valor da densidade específica do solvente puro (ρ_0). Assim, é possível determinar as viscosidades listadas no Quadro 5.1 (adaptado de CANEVAROLO, 2006), as quais serão utilizadas no cálculo da massa molar média dos polímeros (\overline{M}_v).

Quadro 5.1 Definições de viscosidades utilizadas

Nome e Símbolo	Definição matemática
Viscosidade relativa (η_{real})	$\eta_{\text{real}} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t \times \rho}{t_0 \times \rho_0} \cong \frac{t}{t_0}$
Viscosidade específica (η_{sp})	$\eta_{\text{sp}} = \eta_{\text{real}}^{-1}$
Viscosidade reduzida (η_{red})	$\eta_{\text{red}} = \frac{\eta_{\text{sp}}}{C}$
Viscosidade intrínseca (η_i)	$\eta_i = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{\text{red}}$

Fonte: Adaptado de Canevarolo (2006)

5.4.3.3 Análise termogravimétrica (TGA)

Análise termogravimétrica foi utilizada para avaliar a degradação térmica do biopolímero extraído, sendo possível obter a temperatura de início de degradação (T_i), a temperatura máxima de degradação (T_{pico}) e a porcentagem de perda de massa do PHB extraído, ou pureza. A análise foi realizada em equipamento STA 449 F3 Jupiter – Netzsch. As condições de processo para a amostra foram: razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ em uma faixa de temperatura de 23 a $790 \text{ }^\circ\text{C}$, em atmosfera de nitrogênio.

5.4.3.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A medida de DSC foi realizada para caracterizar o biopolímero quanto à temperatura de fusão (T_m), temperatura de transição vítrea (T_g) e grau de cristalinidade (X_c). Amostras entre 1 e $3 \pm 1 \text{ mg}$ foram fechadas em cápsulas de alumínio e analisadas em equipamento Jade-DSC – Perkin Elmer. Foram realizadas duas corridas de aquecimento e uma de resfriamento. O primeiro aquecimento foi de -30 a $200 \text{ }^\circ\text{C}$, com velocidade de aquecimento de $40 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$. Em seguida resfriou-se o sistema a $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ e foi novamente aquecido com velocidade de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$, de -30 a $200 \text{ }^\circ\text{C}$. As análises foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio de 50 mL.min^{-1} .

5.4.4 Pureza do PHB

Para a determinação da pureza do PHB extraído (%), utilizou-se a Equação 15 (QUINES, 2015):

$$\text{pureza} = \frac{m_{\text{PHB}}}{m_{\text{T}}} \times 100 \quad (15)$$

Onde: m_{PHB} = massa de biopolímero detectada por cromatografia (g); m_{T} = massa do material extraído utilizado para a análise cromatográfica (g).

A partir da pureza do PHB extraído, foi possível determinar a recuperação de polímero extraído em % por meio das equações 16 e 17 (QUINES, 2015):

$$\text{recuperação} = \frac{m_{\text{p}}}{m_{\text{i}}} \times 100 \quad (16)$$

$$m_{\text{p}} = m_{\text{T}} \times \text{pureza} \quad (17)$$

Onde: m_{p} = massa de PHB puro (g); m_{f} = massa de PHB obtida após a extração (g); m_{i} = massa total de PHB nas células antes da extração (g), determinado por CG.

5.4.5 Viscosidade

A viscosidade intrínseca (η_{i}) está relacionada com a massa molar média (\overline{M}_{v}) pela Equação 18 (equação de Mark-Howink-Sakurada) (CANEVAROLO, 2006):

$$\eta_{\text{i}} = K(\overline{M}_{\text{v}})^a \quad (18)$$

Onde: (K e a) são constantes que dependem do polímero, solvente e temperatura.

Para PHB em clorofórmio a 20 °C: $K = 1,51 \times 10^{-2} \text{ mL.g}^{-1}$ e $a = 0,756$ (AKHTAR et al., 1991).

5.4.6 Grau de Cristalinidade

O grau de cristalinidade (X_c) do polímero foi determinada a partir da relação entre a entalpia de fusão da amostra (ΔH_m) e a entalpia de fusão de PHB 100% cristalino, 142 J.g^{-1} (TSUJI, IKADA, 1996), sendo calculado a partir da Equação 19.

$$X_c = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_m^0} \times 100 \quad (19)$$

Onde: ΔH_m = entalpia de fusão da amostra (J.g^{-1}); ΔH_c = entalpia de cristalização da amostra (J.g^{-1}); ΔH_m^0 = entalpia de fusão considerando o polímero 100% cristalino (J.g^{-1}).

Para PHB $\Delta H_m^0 = 142 \text{ J.g}^{-1}$ (TSUJI; IKADA, 1996).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar o entendimento dessa seção, os resultados estão apresentados da seguinte maneira: primeiramente, os resultados dos cultivos realizados com o objetivo de comparar o desempenho das cepas *C. necator* DSM 545 (parental) e *C. necator_glpFK* (recombinante) em glicerol e glicose combinada a glicerol. Posteriormente, são apresentados os resultados dos experimentos com o objetivo de comparar a influência das concentrações de glicose e glicerol no crescimento e produção de PHB, pela cepa recombinante. Em seguida, o resultado da avaliação da influência do tipo de alimentação de glicerol sobre a produtividade em polímero. Por fim, a avaliação da transferência e consumo de oxigênio, sob as condições estudadas e caracterização do PHB produzido por *C. necator_glpFK*.

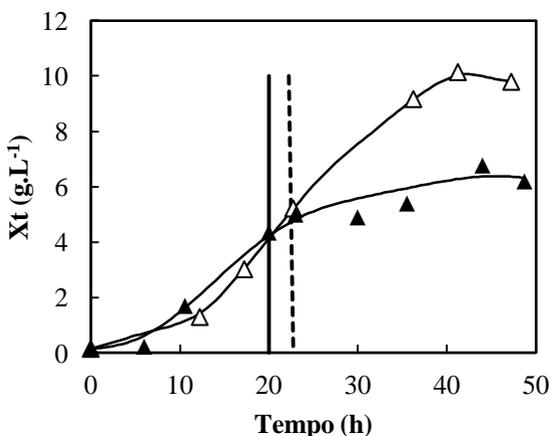
6.1 COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DE *C. necator* DSM 545 e *C. necator_glpFK* EM GLICEROL E GLICEROL COMBINADO À GLICOSE

6.1.1 Cultivo em glicerol puro em agitador orbital

A fim de comparar o crescimento de *C. necator* DSM 545 e *C. necator_glpFK* em glicerol, foi realizado cultivo em agitador orbital, sem adição de outra fonte de carbono. A produção de PHB não foi avaliada nesta etapa.

Os resultados obtidos para concentração de biomassa total (X_t), para as duas cepas, estão mostrados na Figura 6.1. As linhas contínuas representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais, realizados com o *software* Microsoft Excel e o macro Lissage. As linhas 1 e 2 representam o momento em que ocorreu a exaustão de nitrogênio no cultivo com *C. necator* DSM 545 e *C. necator_glpFK*, respectivamente. Este experimento foi realizado com objetivo de confirmar o melhor desempenho da cepa recombinante frente à cepa parental, como observado anteriormente em trabalhos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa.

Figura 6.1 Evolução de biomassa total (X_t) expressa em (g.L^{-1}) ao longo dos cultivos em glicerol (20 g.L^{-1}) por *C. necator* DSM 545 (\blacktriangle) e por *C. necator_glpFK* (\triangle). A linha 1 (—) representa o instante da limitação de nitrogênio para o cultivo com *C. necator* DSM 545 e a linha 2 (----) representa o instante da limitação de nitrogênio para o cultivo com *C. necator_glpFK*



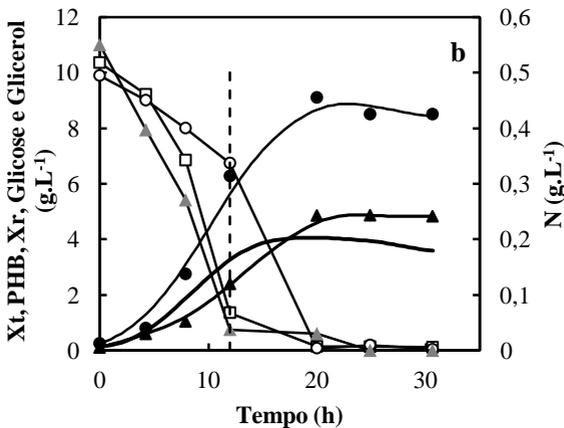
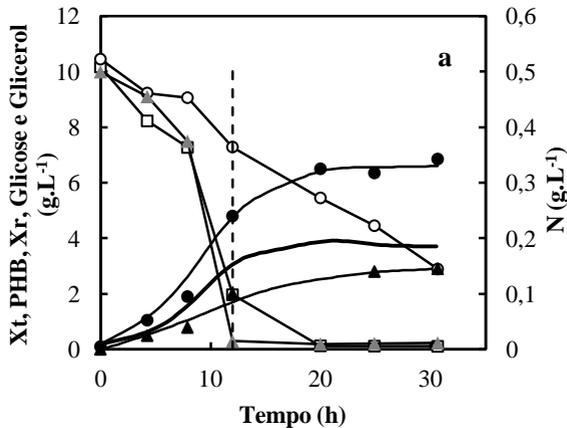
O cultivo com a cepa recombinante atingiu uma concentração máxima de X_t maior ($9,9 \text{ g.L}^{-1}$) que a obtida no cultivo com *C. necator* DSM 545 ($6,0 \text{ g.L}^{-1}$), resultando em uma produtividade em células de $0,20 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Esta produtividade foi semelhante à obtida por Zanfonato (2016) com *C. necator_glpFK*, de $0,22 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. O referido autor também realizou cultivo em meio contendo apenas glicose como substrato, com a mesma cepa, e a produtividade em células foi de $0,55 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, indicando que, apesar do bom desempenho em glicerol, este ainda é inferior quando comparado à glicose. Desta forma, no presente trabalho, optou-se por combinar estes dois substratos, para aumentar a produtividade em células e consequentemente em biopolímero.

6.1.2 Cultivos em glicerol e glicose combinados em agitador orbital

Para avaliar a produção de PHB pela cepa parental e recombinante, foram realizados cultivos em agitador orbital, a partir de glicerol e glicose. As concentrações utilizadas nesses cultivos foram de 10 g.L^{-1} de glicerol e 10 g.L^{-1} de glicose.

Os resultados de biomassa total (X_t), biomassa residual (X_r) e PHB; concentração dos substratos glicerol, glicose e nitrogênio (N) estão mostrados na Figura 6.2, para os cultivos com a cepa parental e recombinante, respectivamente.

Figura 6.2 Evolução de X_t (●), X_r (-), PHB (▲), glicerol (○), glicose (□) e N (▲) ao longo do tempo, para os cultivos de (a) cepa parental e da cepa recombinante (b) em agitador orbital, utilizando-se 10 g.L^{-1} de glicerol e 10 g.L^{-1} de glicose. As linhas contínuas (X_t e PHB) representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais, através do *software* Microsoft Excel e o macro Lissage. A linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio



Ao se observar a concentração de X_t na Figura 6.2, percebe-se que ao final do cultivo, a cepa recombinante produziu mais biomassa ($8,5 \text{ g.L}^{-1}$) que, a parental ($6,9 \text{ g.L}^{-1}$). A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X_{\text{rmax}}}$) para os cultivos foram de $0,23 \text{ h}^{-1}$ no cultivo parental e de $0,30 \text{ h}^{-1}$ para a recombinante. O mesmo comportamento pode ser observado em relação à produção de PHB, a cepa recombinante produziu $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de PHB em 30 h de cultivo, enquanto que a cepa parental, no mesmo tempo, produziu $3,0 \text{ g.L}^{-1}$. Esses resultados podem ser justificados pela melhor eficiência em consumir os substratos disponíveis no meio por *C. necator_glpFK*.

Após 19 horas de fase de produção (período após a exaustão da fonte de nitrogênio) para ambos os cultivos, a porcentagem de polímero acumulado foi de 44% no cultivo parental e de 57% para a recombinante. Como pode ser observado na Figura 6.2, é possível verificar o início da produção de polímero durante a fase de crescimento, sendo esta, mais acentuada a partir do momento da exaustão da fonte de nitrogênio, indicada pela linha tracejada no gráfico. Mesmo comportamento também foi verificado por outros autores (SCHMIDT, 2015; IENCZAK et al., 2016) que também utilizaram a cepa *C. necator* para produzir PHB.

Spoljaric e colaboradores (2013) utilizaram glicose (40 g.L^{-1}) e glicerol (50 g.L^{-1}) para a produção de PHB por *C. necator* DSM 545 e o acúmulo final de PHB foi de 64,5%, com μ_{X_r} de $0,171 \text{ h}^{-1}$, em 32 horas de fase de produção. É importante ressaltar que, apesar do acúmulo de PHB ter sido maior no cultivo reportado pelos referidos autores, este foi realizado com estratégia de pulso e concentrações superiores de substratos, proporcionando ao microrganismo maior carga orgânica que pode ter justificado maior acúmulo de PHB.

O nitrogênio foi exaurido em aproximadamente 12 horas, como apresentado na Figura 6.2. A partir dessa exaustão, observa-se que em ambos os cultivos, a concentração de glicose diminuiu gradativamente até sua utilização completa, após 20 horas. No cultivo em que se utilizou a cepa parental (Figura 6.2 (a)), o glicerol não chegou à exaustão, durante o período analisado, demonstrando que o consumo de glicerol foi mais lento quando comparado ao consumo de glicose. O consumo de açúcar iniciou um pouco antes do consumo de glicerol e, em seguida, os dois substratos foram consumidos durante o mesmo período. Na Figura 6.2 (b), cultivo em que se utilizou a recombinante, ocorreu a exaustão de glicerol após 20 horas.

Apati (2012), estudando a produção de PHB por *C. necator* DSM 545 em 15 g.L^{-1} de açúcar invertido e 15 g.L^{-1} de glicerol, reportou

comportamento semelhante ao consumo de glicerol. De acordo com esses autores, não foi verificada a exaustão das fontes de carbono utilizadas em seu meio de cultivo restando em torno de 4 g.L⁻¹ de açúcar invertido e 8 g.L⁻¹ de glicerol.

A disponibilidade de glicerol ao fim do cultivo da cepa parental pode ser justificada pela dificuldade de transporte deste substrato ao interior das células (KADDOR; STEINBÜCHEL, 2011; SPOLJARIC et al., 2013). Enquanto a glicose é ativamente transportada para dentro das células, através do sistema fosfoenol piruvato fosfotransferase (PEP/PTS); sendo então fosforilada durante o transporte e catabolizada através da via Entner-Doudoroff (RABERG et al., 2011), o glicerol é transportado através da membrana citoplasmática por difusão facilitada (SWEET et al., 1990). A fosforilação de glicerol pela enzima glicerol quinase, antes de ser metabolizado, demora mais tempo do que a fosforilação direta da glicose durante a importação para dentro das células. O melhoramento genético de *C. necator* DSM 545, visando a produção de PHB, através da inserção dos genes de assimilação do glicerol de *E. coli* (*glpFK*), possibilitou o consumo de glicerol de forma mais eficiente durante o cultivo.

6.1.3 Cultivos em biorreator em modo batelada utilizando *C. necator* DSM 545 e *C. necator_glpFK*

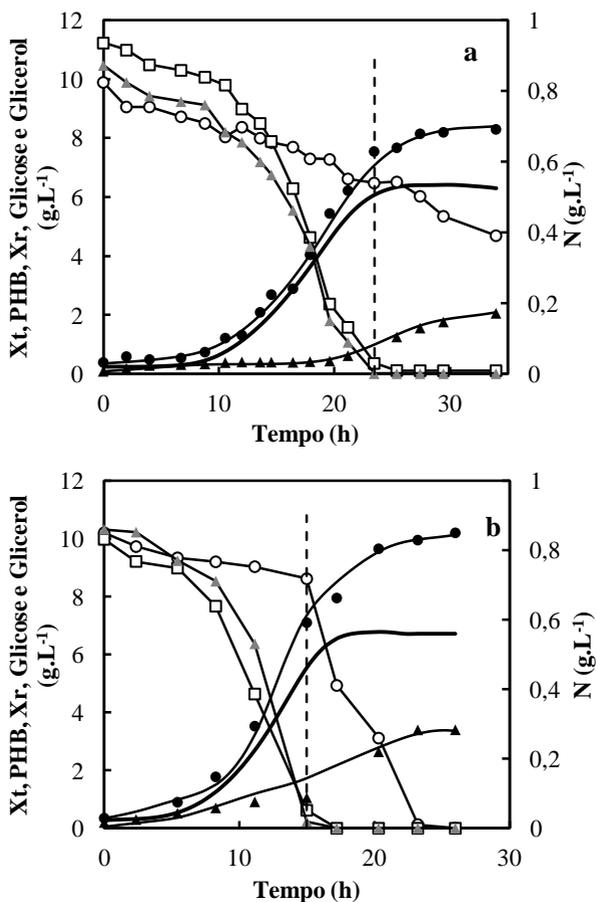
Com o objetivo de comparar e avaliar o desempenho das cepas *C. necator* DSM 545 (parental) e *C. necator_glpFK* (recombinante) foram realizados cultivos em biorreator, utilizando a combinação dos substratos glicerol e glicose. Quatro cultivos em modo batelada foram realizados. Foram utilizadas as mesmas concentrações dos cultivos em agitador orbital, 10 g.L⁻¹ de glicerol e 10 g.L⁻¹ de glicose, e concentrações de 25 g.L⁻¹ de glicerol e 20 g.L⁻¹ de glicose.

6.1.3.1 Cultivos em 10 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol

Na Figura 6.3, são mostrados os dados relativos à produção de Xt, Xr e PHB; concentração dos substratos glicerol, glicose e N, para os cultivos realizados em biorreator em modo batelada, com 10 g.L⁻¹ glicerol e 10 g.L⁻¹ glicose como fontes de carbono, para cepa parental e cepa recombinante, em função do tempo. As linhas contínuas (Xt e PHB) representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais

realizados com o auxílio do *software* Microsoft Excel e o macro Lissage.

Figura 6.3 Evolução de X_t (●), X_r (-), PHB (▲), glicerol (○), glicose (□) e N (▲), ao longo do tempo, para os cultivos de (a) cepa parental e da cepa recombinante (b) em modo batelada, em meio com 10 g.L^{-1} glicerol e 10 g.L^{-1} glicose. As linhas contínuas (X_t e PHB) representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais através do *software* Microsoft Excel e o macro Lissage. A linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio



A produção de Xt para cepa parental foi de 7,8 g.L⁻¹ em 26 horas de cultivo, com $\mu_{X_{\text{rmax}}}$ de 0,21 h⁻¹ (Figura 6.3 (a)). Ao se comparar esses dados com o experimento da cepa recombinante (Figura 6.3 (b)), foram obtidas 10,2 g.L⁻¹ de Xt em 26 horas de cultivo, com $\mu_{X_{\text{rmax}}}$ de 0,26 h⁻¹, podendo-se considerar que a cepa recombinante possui capacidade de assimilar de forma mais eficiente os substratos, gerando maior produção de biomassa.

Após 10 horas de fase de produção para ambos os cultivos, a porcentagem de polímero acumulado foi de 25% no cultivo com a cepa parental e de 33% para a recombinante. As produtividades globais foram 0,06 g.L⁻¹.h⁻¹ e 0,13 g.L⁻¹.h⁻¹, para cepa parental e recombinante, respectivamente.

Fukui e colaboradores (2014) estudaram a produção de PHB em meio contendo glicerol (5 g.L⁻¹) como fonte de carbono por *C. necator* H16_glpFK e reportaram Xt de 2,25 g.L⁻¹, após 72 horas de cultivo, enquanto que a cepa selvagem *C. necator* H16 produziu 1,81 g.L⁻¹ de Xt, somente após 270 horas de cultivo. Esses resultados mostraram que, como observado no presente trabalho, a cepa parental foi capaz de produzir biomassa a partir de glicerol, embora isso tenha requerido muito tempo de cultivo, em função de sua baixa habilidade de crescer em glicerol.

Como é possível verificar na Figura 6.3 (b), a cepa recombinante foi capaz de consumir o glicerol presente no meio mais rapidamente que a cepa parental, sendo este consumido totalmente em aproximadamente 23 horas de cultivo. Comportamento diferente ocorreu com a cepa parental (Figura 6.3 (a)), pois além do consumo de glicerol ter sido mais lento, ainda havia glicerol residual disponível para ser consumido.

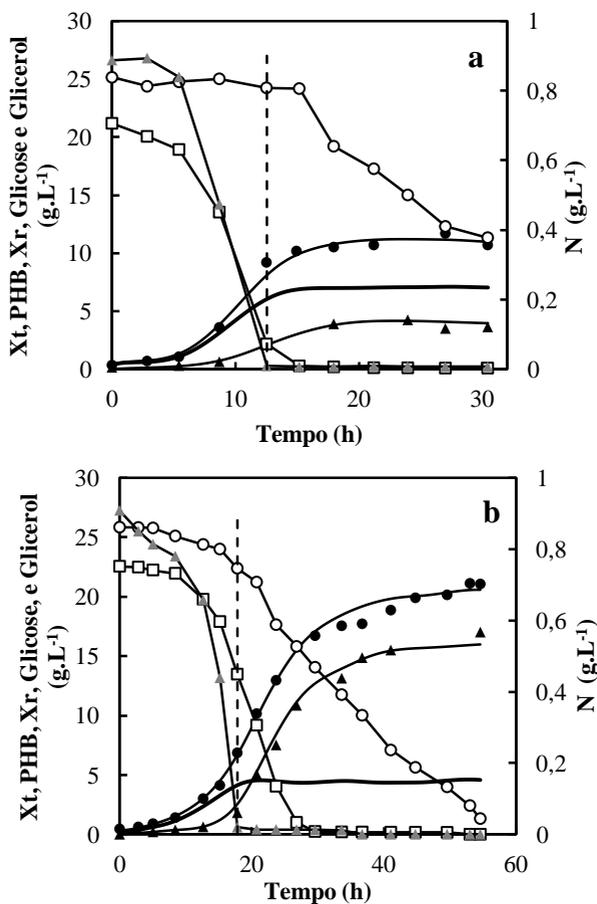
Diferentemente do glicerol, o consumo de glicose em ambas as cepas estudadas foi total. Porém, o consumo de glicose não foi similar, pois foi consumido mais rapidamente pela cepa recombinante, como pode ser verificado na Figura 6.3. O nitrogênio foi utilizado como limitante e sua exaustão ocorreu em aproximadamente 23 horas no cultivo com a cepa parental (Figura 6.3 (a)) e aproximadamente em 15 horas com a cepa recombinante (Figura 6.3 (b)).

6.1.3.2 Cultivos em 20 g.L⁻¹ de glicose e 25 g.L⁻¹ de glicerol

Para atingir maior concentração celular, dois experimentos com 25 g.L⁻¹ de glicerol e 20 g.L⁻¹ de glicose foram realizados e os resultados estão mostrados na Figura 6.4.

Na Figura 6.4, são mostrados os dados relativos de Xt, Xr e PHB; concentração dos substratos: glicerol, glicose e N, para os cultivos realizados em biorreator, para cepa parental e recombinante.

Figura 6.4 Evolução de Xt (●), Xr (-), PHB (▲), glicerol (○), glicose (□) e N (▲), ao longo do tempo, para os cultivos de (a) cepa parental e da cepa recombinante (b) em modo batelada, em meio com 25 g.L⁻¹ glicerol e 20 g.L⁻¹ glicose. As linhas contínuas (Xt e PHB) representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais através do *software* Lissage. A linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio



Em função da maior concentração de substrato (20 g.L⁻¹ glicose e 25 g.L⁻¹ glicerol) nesses cultivos, a concentração de biomassa total foi maior que nos cultivos anteriores de 10 g.L⁻¹ glicose e 10 g.L⁻¹ glicerol, com destaque para o cultivo em que se utilizou a cepa recombinante. Como observado na Figura 6.4, a biomassa total máxima foi de 21 g.L⁻¹ para a cepa recombinante e 11 g.L⁻¹ para cepa parental. Comparando-se os valores de X_t da cepa parental, com os dados dos cultivos anteriores, 10 g.L⁻¹ glicose e 10 g.L⁻¹ glicerol (agitador ou biorreator), houve um aumento de biomassa total.

No estudo de Fukui e colaboradores (2014), foi reportado que a baixa expressão da enzima glicerol quinase tem sido relacionada como a responsável pelo baixo crescimento de *C. necator* em glicerol, diferentemente do que ocorre quando cepas recombinantes que expressam o gene *glpK* de *E. coli* foi utilizada.

Assim como nos cultivos anteriores em biorreator, a cepa recombinante consumiu de forma mais acentuada o substrato glicerol. O glicerol foi mais rapidamente consumido pela cepa recombinante, assim como observado no cultivo com 10 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol. A cepa parental, diferentemente da cepa recombinante, teve o consumo de glicerol quase inexistente na fase de crescimento, sendo que, dos 25 g.L⁻¹ adicionados, somente 15 g.L⁻¹ foram consumidos, o que pode ser visualizado na Figura 6.4 (a), esse cultivo foi interrompido em 30 horas de cultivo pela queda da concentração de biomassa total. A glicose foi totalmente consumida ao longo dos cultivos.

Spoljaric e colaboradores (2013) investigaram as possibilidades de produção de PHAs com *C. necator* DSM 545, em meio mineral contendo glicose adicionado na forma de pulsos (40 g.L⁻¹) e glicerol (50 g.L⁻¹). De acordo com esses autores, a glicose foi totalmente consumida, já o glicerol, dos 50 g.L⁻¹ adicionados, somente 20 g.L⁻¹ foram consumidos. Esses autores afirmam que a glicose inibe a expressão dos genes que codificam as proteínas necessárias para a utilização das fontes de carbono alternativas, como o glicerol, isso por que a glicose é uma fonte de carbono rapidamente metabolizável.

O nitrogênio fornecido foi assimilado pela bactéria para o crescimento e manutenção das células, sendo exaurido antes no cultivo com a cepa parental, como observado na Figura 6.4.

A porcentagem de PHB acumulado, em 12 horas de fase de produção, para o cultivo da cepa parental foi de 37%, para o cultivo com a cepa recombinante, essa porcentagem foi de 74%. Isso indica que *C. necator*, mesmo não tendo como substrato preferencial o glicerol, ainda

é capaz de acumular percentuais de acúmulo de PHB, porém apresenta menor capacidade de acúmulo do biopolímero em relação a cepa recombinante.

Os valores encontrados neste trabalho para a cepa recombinante, como reportado no cultivo 20 g.L⁻¹ glicose e 25 g.L⁻¹ glicerol, foram superiores aos encontrados por Zanfonato (2016) em que o acúmulo final de PHB foi em torno de 60% utilizando *C. necator_glpFK*, em cultivo em biorreator com 25 g.L⁻¹ glicerol. Fukui e colaboradores (2014) reportaram que, após 72 horas de cultivo em meio mineral contendo frutose como substrato, foi capaz de acumular 63% de PHB por *C. necator* H16. Apati (2012), que cultivou *C. necator* DSM 545 em biorreator para produção de PHB, utilizando 30 g.L⁻¹ de açúcar invertido e 15 g.L⁻¹ de glicerol como substrato, obteve acúmulo de 56% de PHB. Nickel e colaboradores (2008) sintetizaram PHB a partir de *E.coli* recombinante, utilizando glicerol como substrato em batelada, obteve acúmulo de 42%.

A Tabela 6.1 apresenta os resultados de concentração de Xt, concentração de PHB, porcentagem de PHB acumulado e produtividade de PHB para os cultivos realizados em biorreator.

Tabela 6.1 Resultados obtidos para os cultivos realizados em biorreator

Glicose/ Glicerol (g.L⁻¹)	Cepa	Xt (g.L⁻¹)	PHB (g.L⁻¹)	PHB_{Final} (%)	PHB (%)	Pr_{Global} (g.L⁻¹.h⁻¹)
10/10	Parental	8,3	2,0	25	25*	0,06
10/10	Recomb.	10	3,4	33	33*	0,13
20/25	Parental	11	4	36	37**	0,13
20/25	Recomb.	21	17	78	74**	0,30

* Igual t (h) fase produção de 10 horas

** Igual t (h) fase produção de 12 horas

A cepa recombinante apresentou maior produtividade, sendo que, no cultivo utilizando 25 g.L⁻¹ glicerol e 20 g.L⁻¹ glicose, esta apresentou maior produtividade global (0,30 g.L⁻¹.h⁻¹) que a cepa parental (0,13 g.L⁻¹.h⁻¹). Cavalheiro e colaboradores (2009) obtiveram produtividades entre 0,6 e 1,5 g.L⁻¹.h⁻¹ em cultivos conduzidos com alta concentração celular

de *C. necator* DSM 545, a partir de glicerol. A diferença quanto à produtividade pode ser explicada pelo fato dos autores terem realizado os cultivos com alta concentração celular fornecendo ao microrganismo uma quantidade de carbono maior do que nos cultivos do presente estudo. Indicando que o aumento da quantidade de carbono favorece a produtividade do cultivo.

A cepa recombinante foi capaz de armazenar maior quantidade de polímero 17 g.L^{-1} com $\mu_{X_{\text{rmax}}}$ de $0,24 \text{ h}^{-1}$, assim como maior concentração celular, quando as concentrações de substratos foram de 25 g.L^{-1} glicerol e 20 g.L^{-1} glicose. Enquanto a cepa parental apresentou baixa produção celular, baixo acúmulo de PHB, assim como baixos valores de $\mu_{X_{\text{rmax}}}$ em ambas concentrações de substratos testadas em relação à cepa recombinante. Como esperado, a performance da recombinante que foi modificada para consumir glicerol de forma mais eficiente que a parental, pode ter auxiliado na obtenção de maiores velocidades de produção do biopolímero.

6.2 CULTIVOS EM BIORREATOR

6.2.1 Influência da concentração dos substratos glicerol e glicose no crescimento e produção de PHB por *C. necator_glpFK*, em modo batelada

A partir dos resultados obtidos anteriormente, optou-se por trabalhar somente com a cepa recombinante, devido ao seu melhor consumo de glicerol, em comparação com a cepa parental, e as suas maiores produtividades em PHB.

Cavalheiro e colaboradores (2009) estudaram o efeito das concentrações de glicerol na faixa entre 10 a 70 g.L^{-1} sobre a velocidade específica de crescimento de *C. necator*. Estes autores concluíram que as concentrações entre 20 e 30 g.L^{-1} de glicerol apresentaram as maiores velocidades específicas de crescimento, sendo esta reduzida quando a concentração de glicerol foi superior a 40 g.L^{-1} , por esse motivo, neste trabalho foram utilizadas concentrações baseadas nesses valores.

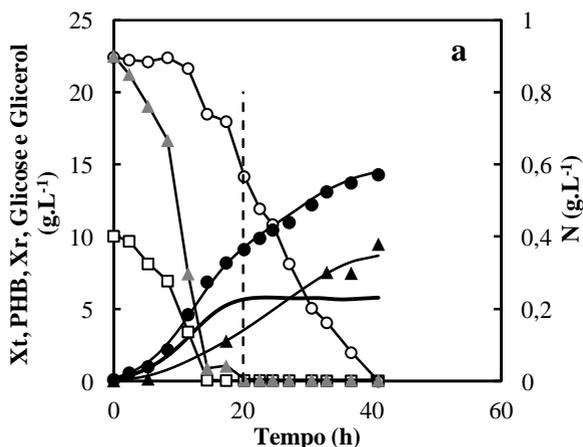
As concentrações de glicose foram escolhidas em razão de trabalhos desenvolvidos no Grupo de Pesquisa em PHB, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Grupo de pesquisa que esse trabalho está inserido.

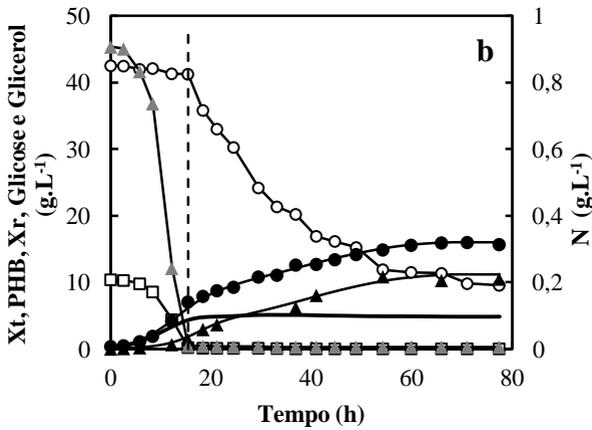
Nos primeiros cultivos, apresentados na Figura 6.5, a concentração de glicose foi fixada em 10 g.L^{-1} e as concentrações de glicerol utilizadas foram de 20 g.L^{-1} e 40 g.L^{-1} . Nos cultivos apresentados na Figura 6.6, a concentração de glicose foi fixada em 20 g.L^{-1} e as concentrações de glicerol foram 10 g.L^{-1} e 40 g.L^{-1} .

6.2.1.1 Cultivos com concentração de 10 g.L^{-1} de glicose e concentrações variadas de glicerol

Na Figura 6.5 são mostrados os dados relativos a X_t , X_r e PHB; concentração dos substratos glicerol, glicose e N, para os cultivos realizados em biorreator conduzidos em modo batelada, por *C. necator_glpFK*.

Figura 6.5 Evolução de X_t (●), X_r (-), PHB (▲), glicerol (○), glicose (□) e N (▲); (a) cultivo a partir de 10 g.L^{-1} glicose e 20 g.L^{-1} glicerol; (b) cultivo a partir de 10 g.L^{-1} glicose e 40 g.L^{-1} glicerol. As linhas contínuas (X_t e PHB) representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais através do *software* Microsoft Excel e o macro Lissage. A linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio.





O glicerol não foi totalmente consumido no cultivo em que se utilizaram concentrações de 10 g.L⁻¹ de glicose e 40 g.L⁻¹ de glicerol (Figura 6.5 (b)), restando um residual de aproximadamente 10 g.L⁻¹ deste substrato ao final do cultivo. Na Figura 6.5 (a), assim como no cultivo 10 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol (Figura 6.3 (b)), o glicerol foi totalmente consumido.

A partir dos dados apresentados na Figura 6.5, foi verificado que o glicerol começou a ter um consumo mais pronunciado a partir do momento da exaustão da glicose, que ocorreu próximo à exaustão de nitrogênio. A glicose, em ambos os cultivos, foi totalmente consumida antes da exaustão da fonte de nitrogênio, o que também ocorreu no cultivo 10 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol, apresentado anteriormente.

A Tabela 6.2 apresenta os resultados obtidos pelos cultivos 10 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol; 10 g.L⁻¹ de glicose e 20 g.L⁻¹ de glicerol; 10 g.L⁻¹ de glicose e 40 g.L⁻¹ de glicerol.

Tabela 6.2 Resultados obtidos para os cultivos realizados em biorreator pela cepa recombinante com concentração de glicose de 10 e concentrações de 10 g.L⁻¹ 20 g.L⁻¹ e 40 g.L⁻¹ de glicerol

Glicose/ Glicerol (g.L⁻¹)	X_t (g.L⁻¹)	PHB (g.L⁻¹)	PHB_{Final} (%)	PHB (%)	Pr_{Global} (g.L⁻¹.h⁻¹)	μ_{Xr} (h⁻¹)
10/10	10,2	3,4	33	33*	0,13	0,26
10/20	14,3	9,5	60	53*	0,21	0,24
10/40	15,2	10,3	70	50*	0,16	0,21

* Igual t (h) fase produção de 10 horas

De forma geral, os valores de velocidade específica máxima de crescimento apresentou uma tendência à diminuição com o aumento da concentração de glicerol (de 10 g.L⁻¹ para 40 g.L⁻¹). A concentração de biomassa total, diferentemente, foi maior na concentração de 40 g.L⁻¹ de glicerol, com produção de PHB de 10,3 g.L⁻¹ e tempo total de cultivo de aproximadamente 80 h, resultando em uma produtividade global de 0,16 g. L⁻¹.h⁻¹.

O cultivo em que se utilizou concentração de 20 g.L⁻¹ de glicerol, foi o que apresentou maior percentual de PHB, de 53% e maior produtividade global, de 0,21 g. L⁻¹.h⁻¹. Zanfonato (2016) reportou μ_{Xmax} de 0,11 h⁻¹ para *C. necator_glpFK* em glicerol, segundo o autor, o microrganismo alcançou a fase estacionária, em 50 h de cultivo, tempo maior que nos cultivos realizados neste estudo. Esse menor tempo de cultivo, do presente estudo, pode ser uma vantagem, pois leva a uma maior produtividade biopolímero. A combinação de glicerol com glicose (substrato que apresenta maior concentração de carbono), possibilita uma maior produção de PHB, como a encontrada no estudo neste trabalho.

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% de glicerol). No referido estudo, essa bactéria acumulou 37% de PHB. Isso indica que o uso da cepa recombinante estudada neste trabalho com a combinação dos substratos glicose e glicerol apresenta uma maior capacidade de acúmulo de biopolímero.

Os fatores de conversão de substrato em biomassa residual foram calculados plotando-se a concentração residual de glicose e nitrogênio,

em função da concentração da biomassa residual (durante a fase de crescimento) Figuras A1e A2 do Apêndice. Os fatores de conversão de substrato em PHB foram calculados plotando-se a concentração residual de glicerol, em função da concentração de PHB (durante a fase de produção) Figura A3 do Apêndice. Em todos os cultivos, durante a fase de crescimento o fator de conversão de substrato em biomassa residual foi calculado em relação ao substrato glicose ($Y_{Xr/Glicose}$) e durante a fase de produção o fator de conversão de substrato em PHB foi calculado para o substrato glicerol ($Y_{PHB/Glicerol}$). Tendo em vista que o crescimento celular só ocorre quando o nitrogênio não está em concentrações limitantes, o fator de conversão de glicose em célula $Y_{Xr/Glicose}$ foi obtido do início dos cultivos até o tempo em que a concentração de nitrogênio determinada estava entre sua exaustão. O fator de conversão de glicerol em PHB ($Y_{PHB/Glicerol}$) foi calculado no período entre o momento da exaustão de nitrogênio foi determinada até o final do cultivo. O fator teórico de conversão de glicerol em PHB é de $0,47 \text{ g}_{PHB}/\text{g}_{Glicerol}$, porém obter esse valor experimentalmente é difícil, já que se sabe que os microrganismos, mesmo durante a fase de produção, utilizam uma quantidade de glicerol para manutenção celular (ACKERMANN; BABEL, 1998). Na literatura, são reportados valores entre 0,25 e 0,35 $\text{g}_{PHB}/\text{g}_{Glicerol}$ para essa grandeza. Os fatores de conversão dos cultivos podem ser verificados na Tabela 6.3.

Tabela 6.3 Fatores de conversão de glicose em Xr ($Y_{Xr/Glicose}$), nitrogênio em Xr ($Y_{Xr/N}$) e glicerol em PHB ($Y_{PHB/Glicerol}$) para os cultivos (10 g.L^{-1} de glicose e 10 g.L^{-1} de glicerol), (10 g.L^{-1} de glicose e 20 g.L^{-1} de glicerol) e (10 g.L^{-1} de glicose e 40 g.L^{-1} de glicerol)

Glicose/ Glicerol	$Y_{Xr/Glicose}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	$Y_{PHB/Glicerol}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	$Y_{Xr/N}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
10/10	0,48	0,30	6,70
10/20	0,42	0,37	5,50
10/40	0,36	0,30	4,20

Os fatores de conversão encontrados neste trabalho foram superiores aos encontrados por outros autores para conversão de glicose em biomassa residual, na ordem de $0,27 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ (SCHMIDT, 2015) e $0,30 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ (ZANFONATO, 2016). Kim e colaboradores (1994) reportaram fator de conversão de glicose em biomassa residual de $0,48 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$

trabalhando com *C. necator* em batelada alimentada, valor semelhante aos encontrados neste trabalho.

A determinação dos valores de fator de conversão de nitrogênio em células é importante para estimar a concentração celular, sendo isto fundamental em um processo em que o acúmulo do polímero ocorre sob condições limitadas de nutrientes (FIORESE, 2008).

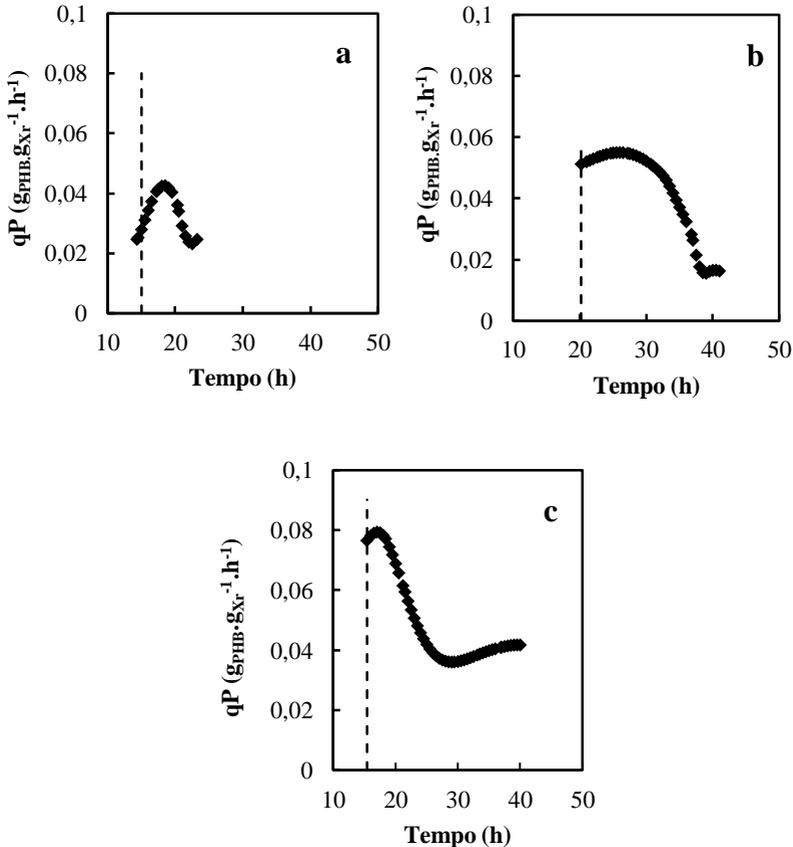
Os valores reportados na literatura para $Y_{Xr/N}$ são iguais a $7,3 \text{ g.g}^{-1}$ (ARAGÃO, 1996) e $6,25 \text{ g.g}^{-1}$ (BELFARES et al., 1995), quando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi utilizado como fonte de nitrogênio, e $8,2 \text{ g.g}^{-1}$ (IENCZAK, 2011), quando ureia foi utilizada como fonte de nitrogênio. Os valores de $Y_{Xr/N}$ obtidos nos cultivos apresentados neste trabalho variaram entre 6,4 e $4,5 \text{ g.g}^{-1}$ durante a fase de crescimento.

Os fatores de conversão de glicerol em PHB, durante a fase de produção, para os cultivos foram de $0,3 \text{ g.g}^{-1}$, $0,37 \text{ g.g}^{-1}$, $0,3 \text{ g.g}^{-1}$ respectivamente para os cultivos ((10/10), (10/20), (10/40), valores superiores aos encontrados por Nickel e colaboradores (2008) que obtiveram $0,21 \text{ g.g}^{-1}$, para cultivo de *E. coli* recombinante a partir de glicerol. Ibrahim e Steinbuchel (2010) reportaram $0,29 \text{ g.g}^{-1}$ cultivando *Zobellella denitrificans* a partir de glicerol e Mothes e colaboradores (2007) obtiveram fator de conversão de glicerol em PHB de $0,14 \text{ g.g}^{-1}$ no cultivo de *C. necator* a partir de glicerol. Quando glicerol e açúcar invertido foram utilizados como fonte de carbono, Sombrio (2015) reportou fator de conversão de glicerol em PHB de $0,51 \text{ g.g}^{-1}$.

De acordo com Apati (2012), quando o glicerol é utilizado como cosubstrato observa-se que o fator de conversão de substrato em produto é superior aos obtidos quando o glicerol é utilizado como fonte de carbono principal, independente da forma bruta ou purificada, comparando os resultados deste trabalho aos resultados de outros autores que utilizaram glicerol como única fonte de carbono.

A velocidade específica de formação de produto (qP) expressa a velocidade de formação de PHB, levando em consideração a quantidade de células capazes de realizar esse acúmulo. A Figura 6.6 mostra o comportamento de qP em função do tempo, para os cultivos com 10 g.L^{-1} glicose e 10 g.L^{-1} glicerol, 10 g.L^{-1} glicose e 20 g.L^{-1} glicerol e 10 g.L^{-1} glicose e 40 g.L^{-1} glicerol.

Figura 6.6 Evolução da velocidade específica de produção de PHB (\diamond), em biorreator, ao longo do cultivo em modo batelada em meio com (a) 10 g.L^{-1} glicose e 10 g.L^{-1} glicerol; (b) 10 g.L^{-1} glicose e 20 g.L^{-1} glicerol; (c) 10 g.L^{-1} glicose e 40 g.L^{-1} glicerol. A linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio



A determinação do $q_{P_{\max}}$ foi realizada pela observação do gráfico de q_P em função do tempo durante a fase de produção. Os valores de $q_{P_{\max}}$ obtidos foram: $0,04 \text{ g}_{\text{PHB}} \cdot \text{g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ com 18 h de cultivo, 4 h de fase de produção, como pode ser observado na Figura 6.6 (a). $0,05 \text{ g}_{\text{PHB}} \cdot \text{g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ com 26 h de cultivo, 6 h de fase de produção, como pode ser observado na Figura 6.6 (b). Na Figura 6.6 (c), o $q_{P_{\max}}$ foi de $0,08 \text{ g}_{\text{PHB}} \cdot \text{g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ com 17 h de cultivo, 2 h de fase de produção.

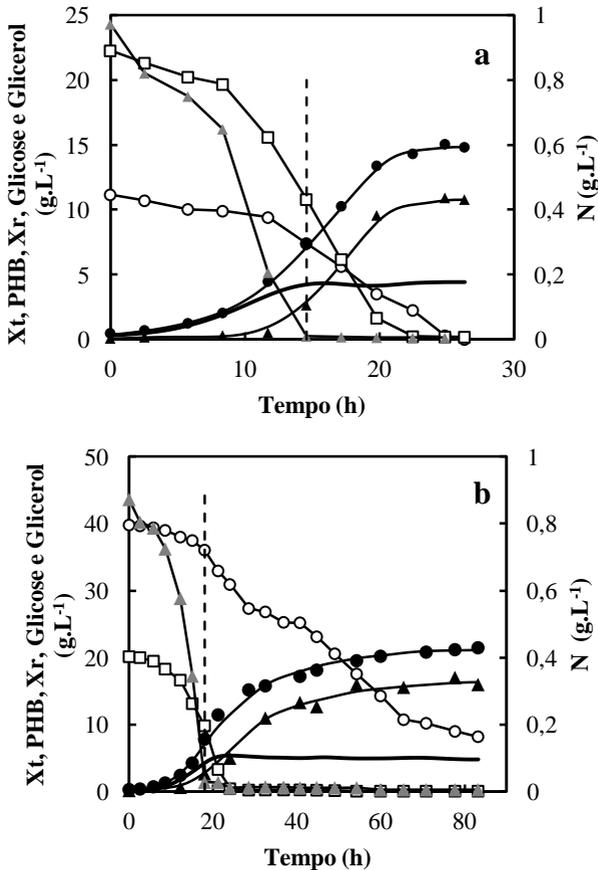
Spoljaric e colaboradores (2013) realizaram produção de PHB por *C. necator* DSM 545 em concentração inicial de 50 g.L⁻¹ de glicerol e de aproximadamente 40 g.L⁻¹ de glicose, eles reportaram qP_{max} de 0,04 g_{PHB}.g_{Xr}⁻¹.h⁻¹. Velocidade específica igual à encontrada no cultivo 10 g.L⁻¹ glicose e 10 g.L⁻¹ glicerol e metade da velocidade calculada no cultivo 10 g.L⁻¹ glicose e 40 g.L⁻¹ glicerol. Segundo os autores, pode ocorrer inibição do consumo de glicerol pela presença de glicose. No presente estudo, a produção de PHB foi avaliada com os mesmos substratos utilizados pelos referidos autores, verificando que a cepa recombinante consumiu o substrato glicerol de forma mais eficiente que a cepa parental, com isso pode ter auxiliado na obtenção de maiores velocidades de produção do biopolímero.

Nos três cultivos, os valores de qP_{max} foram determinados nas primeiras horas da fase de produção e em seguida ocorreu o decaimento do qP . Este comportamento pode ser explicado porque as células atingiram grande capacidade de produção devido à limitação de nitrogênio, mas como não ocorreu a manutenção do crescimento celular, as células vão perdendo sua capacidade de produção do biopolímero (ARAGÃO et al., 1996). A manutenção dos valores de qP pode ser obtida com alimentação de nitrogênio durante a fase de produção, pois o nitrogênio adicionado permite a manutenção da biomassa residual (SCHMIDT et al., 2016).

6.2.1.2 Cultivos com concentração de 20 g.L⁻¹ de glicose e concentrações variadas de glicerol

A produção de PHB também foi estudada em cultivos com a cepa recombinante tendo fixado o valor de glicose em 20 g.L⁻¹ e variando as concentrações de glicerol 10 g.L⁻¹ e 40 g.L⁻¹. As concentrações de nitrogênio, glicose e glicerol, em g.L⁻¹, ao longo dos cultivos podem ser visualizados na Figuras 6.7 (a) e (b). Nessas Figuras, são mostrados também os dados relativos a X_t , X_r e PHB, para os cultivos realizados em biorreator conduzidos em modo batelada, para cepa recombinante.

Figura 6.7 Evolução de X_t (●), X_r (-), PHB (▲), glicerol (○), glicose (□) e N (▲). (a) cultivo a partir de 20 g.L⁻¹ glicose e 10 g.L⁻¹ glicerol; (b) cultivo a partir de 20 g.L⁻¹ glicose e 40 g.L⁻¹ glicerol. As linhas contínuas (X_t e PHB) representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais através do *software* Microsoft Excel e o macro Lissage. A linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio



Como é possível verificar, o consumo dos substratos ocorreu durante todo o tempo de cultivo. O consumo de glicose ocorreu primeiro, majoritariamente durante a fase de crescimento. Como pode ser observado na Figura 6.7. Como observado no cultivo da Figura 6.7

(b), a alta concentração de glicerol inicial (40 g.L^{-1}) não foi totalmente consumido até o final do cultivo.

A Tabela 6.4 apresenta os resultados obtidos pelos cultivos 20 g.L^{-1} de glicose e 10 g.L^{-1} de glicerol; 20 g.L^{-1} de glicose e 25 g.L^{-1} de glicerol; 20 g.L^{-1} de glicose e 40 g.L^{-1} de glicerol.

Tabela 6.4 Resultados obtidos para os cultivos realizados em biorreator com concentração de glicose de 20 g.L^{-1} e concentrações de 10 g.L^{-1} , 25 g.L^{-1} e 40 g.L^{-1} de glicerol

Glicose/ Glicerol	Xt (g.L^{-1})	PHB (g.L^{-1})	PHB _{Final} (%)	PHB (%)	Pr _{Global} ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	μ_{Xr} (h^{-1})
20/10	15	11	73	73*	0,41	0,22
20/25	21	17	78	74*	0,30	0,20
20/40	21,5	16	77	65*	0,24	0,23

* Igual t (h) fase produção de 12 horas

Ao final da fase de produção, obteve-se 11 ; 17 e 16 g.L^{-1} de PHB, o que representou 73 ; 74 e 65% de PHB em 12 h de fase de produção, respectivamente para os cultivos (20/10), (20/25) e (20/40). De forma geral, o aumento da quantidade de carbono fez com que o acúmulo de PHB aumentasse em cultivos de 20 g.L^{-1} , pois nestes cultivos a glicose também foi direcionada para o acúmulo do biopolímero. Além disso, os maiores valores de PHB encontrados nos cultivos de 20 g.L^{-1} de glicose pode ser justificado pelos maiores valores de qP que expressa a velocidade de formação de PHB, levando em consideração a quantidade de células capazes de realizar esse acúmulo.

A partir dos dados de percentual de acúmulo, observa-se que estes valores foram próximos para ambas concentrações de substrato utilizadas, pode-se observar ainda, que a limitação em nitrogênio durante esses cultivos ocorreu quando a fonte de glicose se encontrava em concentrações limitantes, o que proporcionou o acúmulo de biopolímero a partir do glicerol.

No estudo de Kachrimanidou e colaboradores (2014), utilizando *C. necator* para produção de PHB, operando em batelada alimentada na forma de pulsos de carbono, com 25 g.L^{-1} de glicerol como fonte de carbono, sendo essa concentração mantida até o tempo final, a

produtividade obtida por esses autores foi de $0,19 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ com acúmulo de 62% de PHB. Apesar de os autores terem realizado diversos pulsos de carbono, fornecendo ao microrganismo uma quantidade de carbono maior que no presente estudo. Isso indica que a combinação de glicose e o uso da cepa geneticamente modificada favoreceu o acúmulo e a produtividade do cultivo encontrada por esse estudo, *C. necator_glpFK* foi capaz de acumular 73% de PHB e produtividade de $0,41 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Sombrio (2015), cultivando *C. necator*, em processo de batelada com adição de 30 g.L^{-1} de açúcar invertido e 15 g.L^{-1} de glicerol, reportou produção e acúmulo de PHB de $9,1 \text{ g.L}^{-1}$ e 56,1%, valores inferiores a esse trabalho. Povolo e colaboradores (2012) analisaram a produção de PHA, por bactérias isoladas do solo, a partir de resíduos graxos, incluindo o glicerol. Os cultivos foram conduzidos em glicerol (20 g.L^{-1}), com utilização de glicose na pré-cultura. Após 72 horas de cultura, os autores obtiveram biomassa final de $6,4 \text{ g.L}^{-1}$, e 73% de PHA. A produção de biopolímero encontrado pelos referidos autores foi similar as que foram encontradas no presente trabalho.

Em todos os cultivos apresentados na Tabela 6.3, o microrganismo cresceu exponencialmente em torno das primeiras 14 h, apresentando valores de μ_{Xrmax} entre $0,20 \text{ h}^{-1}$ a $0,23 \text{ h}^{-1}$

As produtividades globais foram 0,41; 0,30 e $0,24 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectivamente para os cultivos (20/10), (20/25) e (20/40). Os fatores de conversão dos cultivos podem ser verificados na Tabela 6.5.

Tabela 6.5 Resultados obtidos para os fatores de conversão de glicose em X_r ($Y_{Xr/Glicose}$), nitrogênio em X_r ($Y_{Xr/N}$) e glicerol em PHB ($Y_{PHB/Glicerol}$)

Glicose/ Glicerol	$Y_{Xr/Glicose}$ (g.g^{-1})	$Y_{PHB/Glicerol}$ (g.g^{-1})	$Y_{Xr/N}$ (g.g^{-1})
20/10	0,50	0,70	4,50
20/25	0,40	0,40	7,00
20/40	0,40	0,40	6,40

Os fatores de conversão para estes cultivos foram superiores aos cultivos em que foram utilizadas concentrações de 10 g.L^{-1} de glicose.

Em cultivo de *C. necator* DSM 545, em batelada alimentada, com açúcar invertido e glicerina (85%-88% glicerol) como substrato,

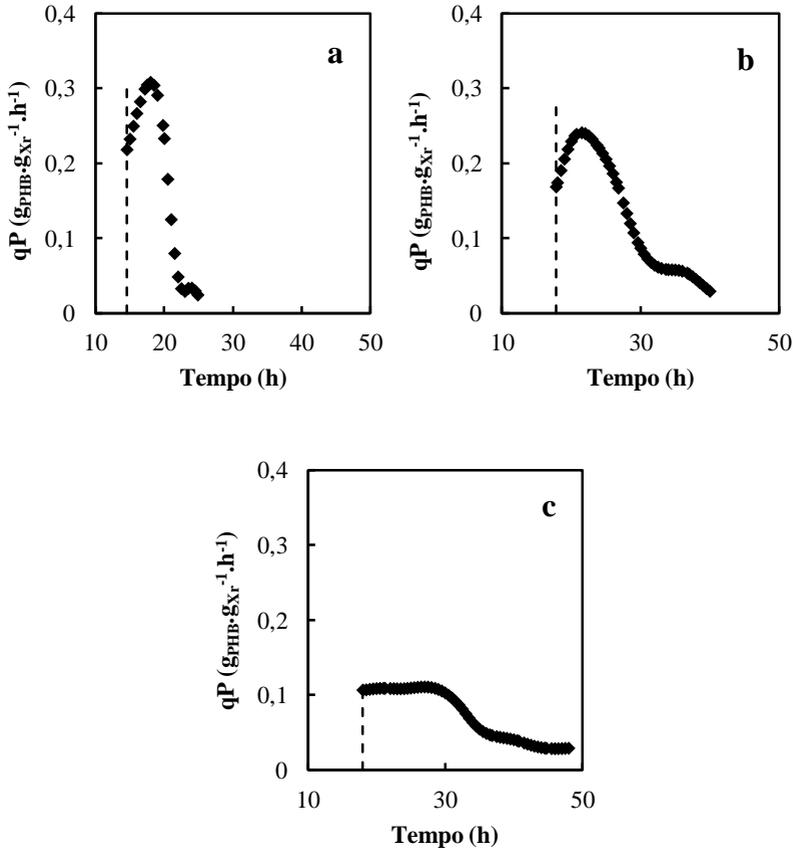
Sombrio e colaboradores (2017) reportaram fatores de conversão de $0,12 \text{ g}_{\text{Xr}} \cdot \text{g}_{\text{S}}^{-1}$ e $0,20 \text{ g}_{\text{Xr}} \cdot \text{g}_{\text{S}}^{-1}$, onde S representa o consumo de açúcar invertido e glicerol. Os fatores de conversão determinados pelos autores são menores do que os reportados no presente estudo. Esses resultados indicam que *C. necator_glpFK* se mostrou mais eficiente na conversão de glicerol em PHB do que *C. necator* DSM 545.

Os valores de $Y_{\text{Xr}/\text{N}}$ obtidos nos cultivos apresentados na Tabela 6.4 variaram de 4,5 e $7,0 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ durante a fase de crescimento, esperava-se encontrar valores próximo para todos os cultivos, pois a fonte de nitrogênio foi a mesma para todos eles. Patnaik e colaboradores (2006), encontraram valor de $Y_{\text{Xr}/\text{N}}$ igual a $4,5 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, indicando semelhança aos dados reportados no presente trabalho.

Destaca-se o cultivo 20 g L^{-1} de glicose e 10 g L^{-1} de glicerol, pois neste foi obtido o maior $Y_{\text{PHB}/\text{Glicerol}}$, evidenciando que o aumento da concentração de glicose impulsionou maior formação de biomassa residual e que a menor concentração de glicerol favoreceu a conversão deste em PHB. Contudo, deve-se salientar que neste cultivo (Figura 6.7 (a)) ocorreu o consumo concomitante de glicose e glicerol durante a fase de produção. Esse consumo de dois substratos para produção de PHB pode ter aumentado o fator de conversão de glicerol em PHB deste cultivo.

A determinação do $q\text{P}_{\text{max}}$ de cada cultivo foi realizada pela observação do gráfico de $q\text{P}$ pelo tempo. A Figura 6.8 mostra os gráficos de $q\text{P}$ pelo tempo para os cultivos (20/10), (20/25) e (20/40). As linhas pontilhadas indicam o início da fase de produção.

Figura 6.8 Evolução da velocidade específica de produção de PHB (\diamond), em biorreator, ao longo do cultivo em modo batelada em meio com (a) 20 g.L⁻¹ glicose e 10 g.L⁻¹ glicerol; (b) 20 g.L⁻¹ glicose e 25 g.L⁻¹ glicerol; (c) 20 g.L⁻¹ glicose e 40 g.L⁻¹ glicerol. A linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio



As velocidades específicas máximas de produção de PHB ($q_{P_{\max}}$) foram iguais a 0,31, 0,24 e 0,11 $\text{g}_{\text{PHB}} \cdot \text{g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente para os cultivos, (20/10), (20/25) e (20/40). Na Figura 6.8 (a), (b) e (c) esses valores foram atingidos logo após a exaustão em nitrogênio, com aproximadamente 18 h de cultivo e com 3 h de fase de produção para o cultivo (20/10), 21 h de cultivo e com 3 h de fase de produção para o cultivo (20/25) e com aproximadamente 27 h para o cultivo e com 9 h

de fase de produção para o cultivo (20/40). Posteriormente, houve um decréscimo na velocidade específica de produção do polímero até o final do cultivo. Destaca-se o qP_{\max} obtido em 20 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol, além de ter sido o maior dentre os cultivos, foi alcançado com menor tempo de cultivo Figura 6.8 (a).

Mozumder e colaboradores (2014), utilizando *C. necator* e glicose com substrato para produção de PHB, obtiveram qP_{\max} de 0,22 g.g⁻¹.h⁻¹ quando a fonte de carbono utilizada foi o glicerol, o resultado de qP_{\max} foi de 0,23 g.g⁻¹.h⁻¹.

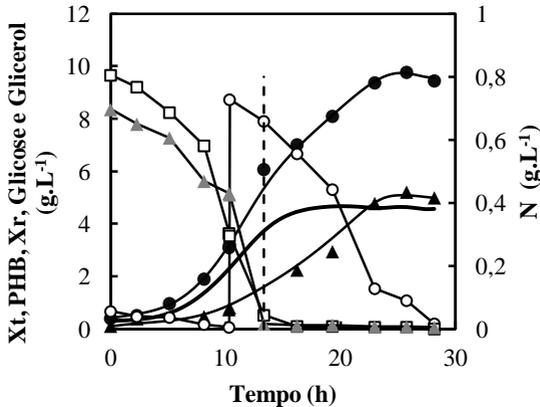
No estudo de Hermann-Krauss e colaboradores (2013), foi reportado qP_{\max} de 0,04 e 0,02 g_{PHA}.g_{Xr}⁻¹.h⁻¹ para produção de PHA por *Haloferax mediterranei* em glicerol e glicerina, respectivamente. Verifica-se que os autores obtiveram esses valores de qP_{\max} nas horas iniciais de fase de produção (5 h de fase de produção). No presente estudo, os valores de qP_{\max} obtidos com *C. necator_glpFK* em glicerol e glicose foram maiores do que os reportados com *Haloferax 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 aprimorado para melhor consumo e utilização de glicerol como fonte de carbono.

6.2.2 Influência do tipo de alimentação de glicerol sobre a produtividade em polímero

A condução desse cultivo teve como objetivo verificar a influência do tipo de alimentação de glicerol sobre a produtividade em polímero. O pulso da fonte de glicerol foi dado quando a glicose estava em 3,54 g.L⁻¹ para garantir a manutenção da fonte de carbono no biorreator.

Na Figura 6.9 são mostrados os dados relativos de X_t , X_r e PHB; concentração dos substratos: glicerol, glicose e N, para o cultivo realizado com pulso de glicerol, por *C. necator_glpFK*. As linhas contínuas (X_t e PHB) representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais realizados com o auxílio do *software* Lissage.

Figura 6.9 Evolução de Xt (●), Xr (-), PHB (▲), gliceros (○), glicose (□) e N (▲), em biorreator, ao longo do cultivo em modo batelada em meio com 10 g.L⁻¹ glicose e pulso de 10 g.L⁻¹ gliceros. As linhas contínuas (Xt e PHB) representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais através do *software* Microsoft Excel e o macro Lissage. A linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio



No cultivo de *C. necator_glpFK* com adição de gliceros no início do cultivo e no cultivo com pulso de gliceros, os valores de velocidade específica de crescimento ($\mu_{X_{\max}}$) foram de 0,26 h⁻¹ e 0,24 h⁻¹ respectivamente. Para o cultivo com adição de gliceros no início do cultivo, a exaustão de nitrogênio ocorreu em 15 h e para o outro cultivo a exaustão ocorreu com 13 h.

O pulso de gliceros levou a maiores valores de percentual e acúmulo de PHB, em relação ao cultivo em que o gliceros foi adicionado no início do cultivo. Para o cultivo com pulso de gliceros, a produtividade de PHB foi de 0,31 g.L⁻¹.h⁻¹ e 52% de polímero, em 11 horas de fase de produção, valores superiores aos encontrados no cultivo que iniciou com gliceros que foram de 0,17 g.L⁻¹.h⁻¹, 33% no mesmo tempo de fase de produção como mostrado anteriormente na Figura 6.3 (b).

O pulso de gliceros favoreceu o aumento do percentual de acúmulo e produtividade de PHB, em relação ao cultivo com adição de gliceros no início do cultivo, pois o esgotamento da fonte de nitrogênio ocorreu mais tarde, proporcionando somente a manutenção do microrganismo.

Cavalheiro e colaboradores (2009) reportaram que, antes do esgotamento de nitrogênio, o glicerol foi direcionado principalmente para a produção e manutenção de células e após exaustão de nitrogênio o glicerol foi utilizado principalmente para a produção de PHB.

Na Tabela 6.6 estão apresentados os valores de fator de conversão global de glicose em biomassa residual, nitrogênio em biomassa residual e glicerol em PHB para os cultivos (10 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol adicionado no início do cultivo) e (10 g.L⁻¹ de glicose e adição posterior de 10 g.L⁻¹ de glicerol).

Tabela 6.6 Valores de fator de conversão global de glicose em biomassa residual, nitrogênio em biomassa residual e glicerol em PHB para os cultivos (10 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol adicionado no início do cultivo) e (10 g.L⁻¹ de glicose e adição posterior de 10 g.L⁻¹ de glicerol)

Cultivo	Y_{Xr/Glicose}	Y_{Xr/Nitrogênio}	Y_{PHB/Glicerol}
10/10 Início	0,47	6,70	0,30
10/10 Posterior	0,40	7,70	0,40

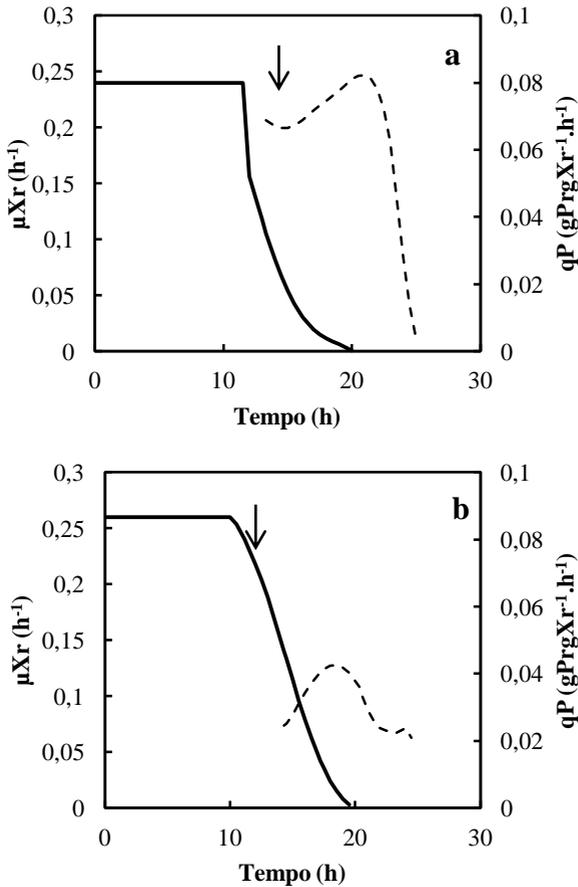
Os fatores de conversão $Y_{Xr/Glicose}$ e $Y_{PHB/Glicerol}$ para o cultivo com adição de glicerol no início do cultivo foram de 0,47 g.g⁻¹ e 0,30 g.g⁻¹, respectivamente. Em comparação ao cultivo com adição posterior de glicerol, manteve-se o $Y_{Xr/Glicose}$ de 0,40 g.g⁻¹, porém o $Y_{PHB/Glicerol}$ aumentou para 0,50 g.g⁻¹. Esse aumento no fator de conversão de glicerol em PHB evidenciou que glicerol adicionado na forma de pulso favoreceu a conversão deste em PHB.

Em estudo da produção de PHB por *C. necator* em açúcar invertido e glicerol adicionado somente na fase de produção, Schroeder, Schneider e Sombrio (2003) reportaram fatores de conversão de 0,20 g_{Xr}/g_S e 0,22 g_{PHB}/g_S, sendo o segundo obtido pelo consumo total de substrato. Verifica-se que, no cultivo com adição posterior de glicerol foram obtidos maiores fatores de conversão.

Com o presente estudo, demonstrou-se que a estratégia de alimentação posterior de glicerol, por *C. necator_glpFK*, apresentou aumento de produtividade em biopolímero. Dessa forma, sugere-se a realização de novas estratégias de alimentação em glicerol, uma vez que, os dados deste trabalho comprovaram o aumento da produtividade.

A Figura 6.10 mostra o comportamento da velocidade específica de crescimento do microrganismo e de produção de PHB.

Figuras 6.10 Evolução da velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ_{Xr} (—)) e de produção de PHB (qP (---)) para os cultivos: (a) com adição de 10 g.L^{-1} glicose e adição posterior de 10 g.L^{-1} glicerol (b) com adição de 10 g.L^{-1} glicose e 10 g.L^{-1} de glicerol. A seta indica o momento da exaustão da fonte de nitrogênio



O microrganismo apresentou crescimento exponencial desde o início dos cultivos até aproximadamente 10 h e 12 h, apresentando um

$\mu_{X_{rmax}}$ de $0,26 \text{ h}^{-1}$ e $0,24 \text{ h}^{-1}$, respectivamente para os cultivos com adição de 10 g.L^{-1} glicose e 10 g.L^{-1} de glicerol e com adição de 10 g.L^{-1} glicose e um pulso de 10 g.L^{-1} glicerol.

No momento da exaustão da fonte de nitrogênio, o μ_{X_r} era igual a $0,11 \text{ h}^{-1}$ para ambos cultivos. De acordo com Ienczak et al. (2011), a fase de produção deve iniciar-se quando o valor de μ_{X_r} estiver entre $0,05$ e $0,08 \text{ h}^{-1}$ para *C. necator* seja capaz de produzir elevadas quantidades de polímero intracelular. A velocidade máxima de produção de polímero para o cultivo com pulso de glicerol foi superior à obtida para o cultivo com adição de glicerol no início do cultivo, como pode ser observado na Figura 6.10. O qP_{max} obtido no cultivo com alimentação de glicerol no início da fase de produção foi de $0,08 \text{ g}_{Pr} \cdot \text{g}_{X_r}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ após 21 h de cultivo e 7,7 h de fase de produção. Para o cultivo com adição de glicerol no início do cultivo o qP_{max} foi de $0,04 \text{ g}_{Pr} \cdot \text{g}_{X_r}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ após 18,5 h de cultivo e 3,5 h de fase de produção. Porém, sua manutenção não foi verificada uma hipótese seria a falta da fonte de carbono e nitrogênio.

De forma geral, os valores de $\mu_{X_{rmax}}$ de *C. necator_glpFK* variaram entre $0,20$ e $0,26 \text{ h}^{-1}$. O cultivo realizado com 20 g.L^{-1} de glicose e 10 g.L^{-1} de glicerol, além de apresentar maior fator de conversão de glicose em biomassa residual $0,50 \text{ g.g}^{-1}$ e produtividade global $0,41 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, também apresentou menor tempo de cultivo 26 h, destacando-se dentre as estratégias de cultivo para produção de PHB avaliadas neste estudo.

Segundo Schmidell e colaboradores (2001), a produtividade, em vez de 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. Avaliando-se as produtividades global e de fase de produção os cultivos realizados com adição de 20 g.L^{-1} de glicose foram os que apresentaram melhores resultados.

De forma geral, um dos principais objetivos no desenvolvimento de processos biotecnológicos é maximizar a produtividade, ou seja, obter a mais alta concentração dos produtos de interesse em um determinado volume de reação, dentro do menor intervalo de tempo.

Verificou-se que a combinação dos substratos glicose e glicerol foi satisfatória nos cultivos para cepa recombinante de 20 g.L^{-1} de glicose e 10 g.L^{-1} de glicerol e no cultivo 20 g.L^{-1} de glicose e 25 g.L^{-1} de glicerol, sendo estes cultivos as melhores estratégias avaliadas no presente estudo. Os valores de produtividade global foram de $0,7 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ com 73% de PHB e de $0,37 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ com 74% de PHB.

Boeira (2018), em estudo da produção de PHB por *C. necator_glpFK* de modo batelada alimentada a partir de vinhaça e glicerina bruta, reportou produtividade em 17 horas de fase de produção de $0,35 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ com porcentagem de PHB de 58%. Schmidt (2015), trabalhando em modo batelada sequencial com reciclo externo de células e exaustão de nitrogênio na fase de produção para a produção de PHB a partir de glicose, reportou produtividade global de $1,14 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ com porcentagem de PHB de 70% e $2,31 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 19 horas de fase de produção.

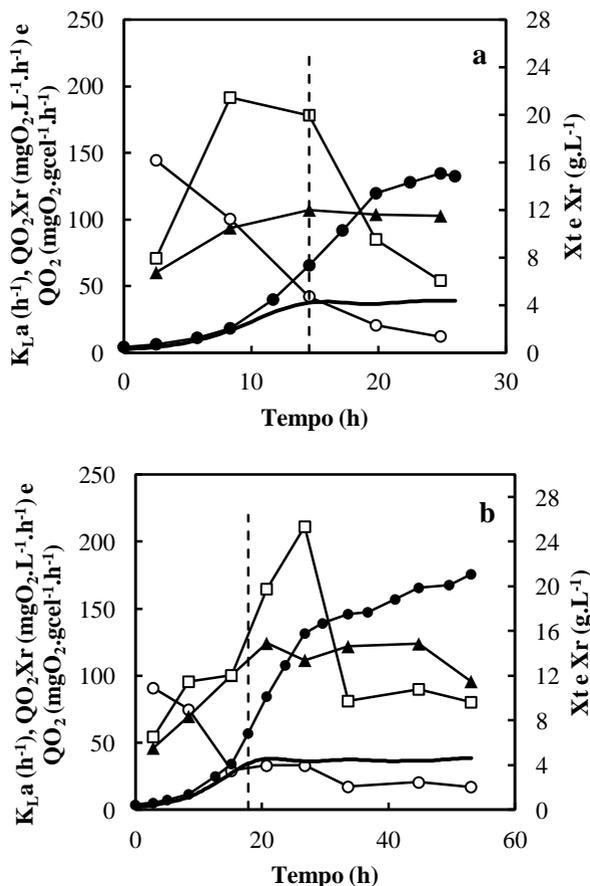
Dessa forma, a produtividade e acúmulo de PHB foram superiores a trabalhos reportados na literatura, isso demonstra que a combinação de glicose com glicerol em modo batelada para produção de PHB apresenta-se como alternativa promissora.

6.2.3 Transferência de oxigênio para o cultivo *C. necator_glpFK*

A transferência de oxigênio foi estudada durante os cultivos de *C. necator_glpFK* para estimar parâmetros respiratórios deste microrganismo, nas condições de cultivo impostas em biorreator nesse trabalho. Não há relatos na literatura sobre a determinação dos parâmetros respiratórios de *C. necator_glpFK*. Dentre os parâmetros respiratórios estão a velocidade específica de respiração (QO_2), coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}), velocidade específica de consumo de oxigênio para manutenção celular (m_o) e fator de conversão de oxigênio em células ($Y_{X/O}$).

Na Figura 6.11, são mostrados os resultados das análises de respirometria dos cultivos a partir de 20 g.L^{-1} de glicose e 10 g.L^{-1} de glicerol e de 20 g.L^{-1} de glicose e 25 g.L^{-1} de glicerol, respectivamente. A análise de respirometria foi realizada a cada duas amostragens, durante o cultivo, para determinação dos parâmetros respiratórios do microrganismo.

Figura 6.11 Dados de $K_L a$ (\blacktriangle), $QO_2 Xr$ (\square), QO_2 (\circ), Xt (\bullet) e Xr ($—$) durante o cultivo a partir de 20 g.L^{-1} de glicose e 10 g.L^{-1} de glicerol (a) e a partir de 20 g.L^{-1} de glicose e 25 g.L^{-1} de glicerol (b). A linha continua representa a ligação entre dos pontos e a linha pontilhada representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio



As concentrações iniciais da fonte de nitrogênio foram praticamente iguais para os dois cultivos ($0,8 \text{ g.L}^{-1}$), desta forma, a biomassa residual atingida também foi próxima nos dois casos ($4,5 \text{ g.L}^{-1}$). Este comportamento pode ser confirmado pelas curvas de $QO_2 Xr$, que atingiram valores máximos próximos, em torno de $200 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Se for observada a evolução da velocidade específica de respiração (QO_2), notase que é possível visualizar através dela o momento em que

começa ocorrer a limitação de nitrogênio e, conseqüentemente, o início da produção de PHB, isto é indicado através do início da desaceleração desta velocidade, que passa a ser mais acentuada a partir do momento em que ocorre a exaustão do nitrogênio no meio. De acordo com Schmidt (2011), nesta etapa, ocorreu um decréscimo na velocidade específica de consumo de oxigênio, que foi proporcional ao decréscimo da velocidade específica de crescimento microbiano.

Os valores de K_{La} seguem mesmo comportamento entre os cultivos analisados, pois quanto maior a demanda de oxigênio pelas células, maior também deverá ser a quantidade de oxigênio suprida ao meio de cultivo. Nos cultivos, o valor de K_{La} atingiu seu máximo no momento da exaustão da fonte de nitrogênio, onde foi iniciada a fase estacionária de crescimento e a biomassa atingiu seu valor máximo.

Na Figura 6.11 (a), é possível verificar que os valores de K_{La} aumentaram até 14,6 h de cultivo (tempo que ocorreu a exaustão em nitrogênio) e momento no qual foi verificado seu valor máximo (107 h^{-1}) o mesmo comportamento foi possível verificar para os valores de QO_2X . Logo após a limitação do nitrogênio, os valores de K_{La} decresceram, mantendo-se constantes até o final do cultivo. Na análise da Figura 6.11 (b), cultivo utilizando 20 g.L^{-1} de glicose e 25 g.L^{-1} de glicerol, observa-se um comportamento similar para os valores de K_{La} , sendo que os mesmos aumentaram até o momento próximo da limitação em nitrogênio (aproximadamente 19 h de cultivo) atingindo neste ponto, seu valor máximo (124 h^{-1}), apresentando uma redução em seus valores na fase de produção do polímero. No entanto, observa-se que os valores de k_{La} para este cultivo apresentaram valores superiores quando comparados ao cultivo em 20 g.L^{-1} de glicose e 10 g.L^{-1} de glicerol. Os valores de K_{La} inferiores obtidos para o cultivo de 20 g.L^{-1} de glicose e 10 g.L^{-1} de glicerol podem ser justificados pelo baixo valor de μ_{xT} no início da fase de produção.

Os dados de respiração celular para os cultivos utilizando a cepa recombinante foram similares aos obtidos por Schmidt (2015), que trabalhou em sistema batelada sequencial com reciclo externo de células utilizando glicose e *C. necator* DSM 545. Os valores máximos encontrados por este autor foram da ordem de 100 para $QO_2 \text{ mgO}_2 \cdot \text{gcel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e 120 h^{-1} para k_{La} .

Faccin e colaboradores (2013) observaram um efeito significativo da transferência de oxigênio, através de medidas do K_{La} , na produção de PHB por *B. megaterium*, identificando-se um valor ótimo do coeficiente de $21,6 \text{ h}^{-1}$ entre valores que iam de $7,2 \text{ h}^{-1}$ a $133,2 \text{ h}^{-1}$.

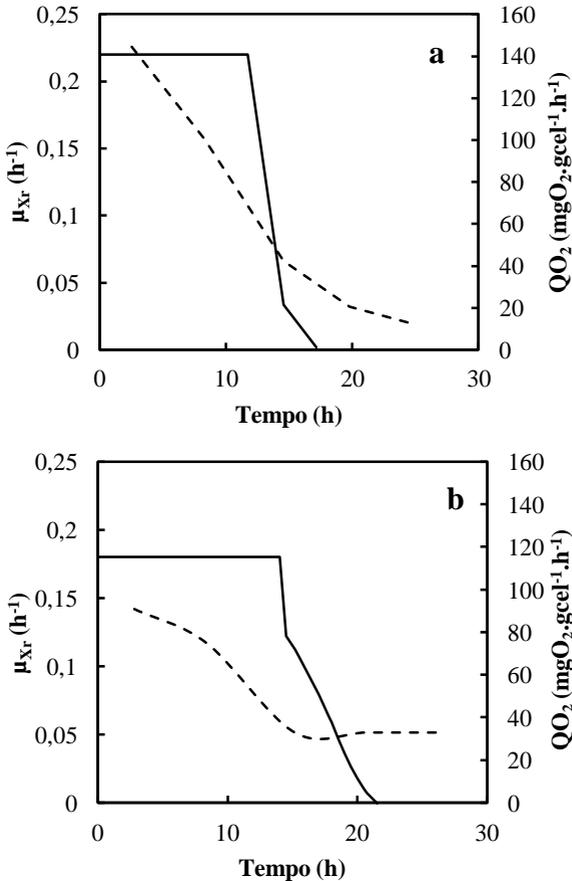
O comportamento de QO_2 , razão entre a velocidade de respiração da biomassa (QO_2X_r) e a concentração de X_r . Esta última representa a concentração de biomassa seca menos a concentração de PHB na célula. Assim, o X_r após a limitação em nitrogênio deve ser praticamente constante em virtude de as células entrarem em fase de baixa velocidade de crescimento. No início do cultivo, quando a concentração de biomassa aumenta ao longo do tempo, os valores de QO_2 também aumentam, até atingirem um valor máximo na fase exponencial de crescimento, em que $\mu_{X_r} = \mu_{max}$ e então começam a decair.

As determinações de QO_2 são de muito interesse, pois essa velocidade específica está intimamente relacionada com o estado fisiológico da biomassa presente no biorreator.

A Figura 6.12 mostra o perfil de μ_{X_r} e QO_2 *versus* o tempo para os cultivos 20 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol (a) e 20 g.L⁻¹ de glicose e 25 g.L⁻¹ de glicerol (b).

O comportamento de QO_2 mostrou relação com o crescimento celular como pode-se observar nas Figuras 6.12 (a) e (b), uma vez que, em ambos, o decaimento da curva de consumo de oxigênio foi mais acentuado na fase inicial, onde a velocidade específica de crescimento celular era constante e máxima. Posteriormente, quando houve uma desaceleração do crescimento, o QO_2 passou a apresentar um comportamento praticamente constante.

Figura 6.12 Velocidade específica de crescimento (μ_{Xr}) (—) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2) (---), durante o cultivo a partir de 20 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol (a) e a partir de 20 g.L⁻¹ de glicose e 25 g.L⁻¹ de glicerol (b)



Observando a Figura 6.12 (a), verifica-se que o período entre 0 a 14 h de cultivo refere-se à fase exponencial de crescimento, quando μ_{Xr} apresentou valores máximos de 0,22 h⁻¹. O crescimento linear foi caracterizado pelo decréscimo de ambos μ_{Xr} e QO_2 até 16 h de cultivo. Os valores de μ_{Xr} variaram de 0,186 a 0,033 h⁻¹ durante a fase de crescimento linear.

Na Figura 6.12 (b), o máximo valor de μ_{Xr} $0,18 \text{ h}^{-1}$ foi observado entre 0 a 21,5 h de cultivo, seguido pelo seu decréscimo até o final do cultivo, enquanto que os valores de μ_{Xr} no início da fase de produção foram da ordem de $0,06 \text{ h}^{-1}$ (18 h de cultivo). De acordo com Ienczak (2011), a velocidade específica de produção do polímero está associada à velocidade específica de crescimento do microrganismo, durante a fase de produção. Este autor sugere a importância de manter os valores de μ_{Xr} entre $0,07$ e $0,05 \text{ h}^{-1}$ no início da fase de produção para se obter alto conteúdo de PHB nas células. A alta porcentagem de PHB 74%, para o cultivo 20 g.L^{-1} de glicose e 25 g.L^{-1} de glicerol, do presente estudo, pode estar associada com os altos valores de μ_{Xr} (cerca de $0,06 \text{ h}^{-1}$) observados nesta fase.

Ressalta-se que, os valores de QO_2 no início da fase de produção em ambos cultivos foram de aproximadamente $40 \text{ mgO}_2.\text{gcel}^{-1}.\text{h}^{-1}$. QO_2 é um importante indicador do estado fisiológico das células e pode ser utilizado para monitorar o processo. QO_2 pode ser determinado a partir dos valores de QO_2Xr obtidos periodicamente a partir do Método Dinâmico, apresentado neste trabalho. Portanto, como ilustrado na Figura 6.12 (a) e (b), os altos valores de QO_2 durante a fase de crescimento refletem valores altos de formação de produto. Esta estimativa é importante dada a dificuldade de se obter uma medida online de μ_{Xr} , em que os valores de Xr e PHB são necessários, mas PHB não apresenta uma metodologia precisa para ser estimado durante o cultivo.

6.2.4 Velocidade específica de consumo de O_2 para a manutenção celular e fator de conversão de oxigênio em célula

C. necator_glpFK apresentou consumo de oxigênio variável, em função do nível de atividade observado, para manutenção de suas atividades vitais, durante o cultivo em biorreator para produção de PHB. Os gráficos gerados para determinação dos parâmetros $Y_{X/O}$ e m encontram-se na (Figura A4 do Apêndice) e seus respectivos valores, para os dois cultivos, estão resumidos na Tabela 6.7. Estes parâmetros foram obtidos pela relação entre a velocidade específica de consumo de oxigênio dissolvido (QO_2) e a velocidade específica de crescimento celular (μ_{Xr}) ao longo do cultivo. De acordo com Pirt, existe uma relação linear entre esses dados, conforme se pode observar na Equação 14 (item – 5.3.8).

Tabela 6.7 Fator de conversão de oxigênio em célula ($Y_{Xr/O}$) e velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção celular (mo) para os cultivos em 20 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol e em 20 g.L⁻¹ de glicose e 25 g.L⁻¹ de glicerol

Cultivo	$Y_{Xr/O}$ ($g_{Xr} \cdot gO_2^{-1}$)	mo ($mgO_2 \cdot gcel^{-1} \cdot h^{-1}$)
20/10	0,0021	21,21
20/25	0,0033	24,11

Os valores de $Y_{Xr/O}$ e o mo foram de 0,0021 $g_{Xr} \cdot gO_2^{-1}$ e 21,21 $mgO_2 \cdot gcel^{-1} \cdot h^{-1}$, para cultivo realizado em 20 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol e de 0,033 $g_{Xr} \cdot gO_2^{-1}$ e 24,11 $mgO_2 \cdot gcel^{-1} \cdot h^{-1}$, quando o cultivo foi realizado com 20 g.L⁻¹ de glicose e 25 g.L⁻¹ de glicerol. Observa-se que os valores de $Y_{Xr/O}$ e mo foram ligeiramente superiores para o cultivo realizado com concentração superior de glicerol. Durante a fase de crescimento, o oxigênio fornecido ao sistema é utilizado somente para o crescimento celular, enquanto na fase de produção, o oxigênio é utilizado tanto para o crescimento celular quanto para a manutenção das células que estão produzindo o biopolímero (FARIAS, 2009).

Estes resultados mostraram que o valor de $Y_{Xr/O}$ apresentou valor ligeiramente superior para cultivo realizado em concentração de 25 g.L⁻¹ de glicerol em virtude do maior acúmulo de biomassa e conteúdo polimérico quando comparado à cultura em 10 g.L⁻¹. Os parâmetros de respiração celular reportados por Schmidt (2011) utilizando *C. necator* DSM 545, a partir de glicose e frutose, apresentaram valores de 0,0048 $g_{Xr} \cdot gO_2^{-1}$ para $Y_{X/O}$ e 46,22 $mgO_2 \cdot gcel^{-1} \cdot h^{-1}$ mo. A diferença entre os parâmetros respiratórios de *C. necator_glpFK*, quando comparado à cepa parental, pode ser atribuída à mudança genética realizada e aos substratos utilizados.

Estes resultados podem ser verificados na Tabela 6.8, que apresenta um resumo geral dos dados de cultivo para ambas as culturas.

Tabela 6.8 Variáveis de cultivo avaliadas no momento da realização dos ensaios para determinação de $Y_{Xr/O}$ e m_o para produção de PHB por *C. necator_glpFK*

Cultivo	Tempo (h)	Xt (g.L ⁻¹)	PHB (g.L ⁻¹)	$Y_{Xr/O}$ (g/g)	m_o (mgO ₂ .gcel ⁻¹ .h ⁻¹)
20/10	26	15	11	0,0021	21,21
20/25	55	20,1	17	0,033	24,11

Os resultados encontrados para a análise de transferência de oxigênio durante o cultivo mostram a importância da determinação dos parâmetros K_La , QO_2 , $Y_{Xr/O}$ e m_o e comprovam que os mesmos podem ser utilizados para acompanhar o comportamento do microrganismo durante cultivos para produção de PHB por *C. necator_glpFK*.

O comportamento do microrganismo estudado mostrou que, na fase em que o crescimento foi maior, a demanda de oxigênio aumentou ao longo do tempo, uma vez, que a concentração celular também estava aumentando, sendo usado apenas em pequena parte do oxigênio para a manutenção celular. Em seguida, como o crescimento microbiano reduziu, a demanda de oxigênio também sofreu um decréscimo, sendo que a maior parte desta foi utilizada para a manutenção das células já presentes no meio, lembrando que a concentração de oxigênio dissolvido no meio não foi inferior a 40%, em relação à saturação com ar atmosférico, ou seja, as células não foram submetidas a condições de limitação em oxigênio.

6.2.5 Caracterização do PHB Produzido por *C. necator_glpFK*

As propriedades do PHB obtidas no cultivo 20 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol com a cepa *C. necator_glpFK*, em biorreator, que proporcionou maior produtividade global foram determinadas a partir das técnicas de caracterização anteriormente descritas no item 5.4.

Os valores obtidos por cromatografia gasosa de PHB e os resultados de pureza e recuperação calculados pelas equações 15, 16 e 17, (descritas no item 5.4.4).

O valor de pureza encontrado para o polímero extraído neste trabalho foi de 95%, um pouco abaixo do valor de 99%, encontrado por Quines (2015). O referido autor atribuiu esse alto valor de pureza à alta

solubilidade do PHB no carbonato de propileno e à facilidade de separação do polímero do solvente, pela precipitação e lavagem do polímero com água destilada. Essa diferença de 4% de pureza encontrado no presente trabalho, pode ser em função da utilização de carbonato de propileno reutilizado na extração do PHB neste estudo, embora Quines (2015) tenha afirmado que o solvente poderia ser reutilizado até 11 vezes.

Fiorese (2008) obteve pureza de 71,8 a 83,6% e recuperação de 63,2 a 95%, com diferentes métodos de extração realizados, porém todos com carbonato de propileno como solvente e acetona para lavagem do polímero. A biomassa utilizada pelo autor foi de *C. necator* a partir glicose como substrato, enquanto Quines (2015) usou biomassa cultivada em frutose e glicose como substratos. Portanto, como os valores encontrados no presente trabalho estão de acordo com a literatura para produção de PHB com *C. necator* e extração com carbonato de propileno, o uso de glicerol combinado com glicose não afetou os resultados de recuperação e pureza do polímero.

6.2.5.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O estudo com a técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi importante para identificação do biopolímero produzido por *C. necator* glpFK através da caracterização dos grupamentos funcionais do mesmo. A Figura 6.13 apresenta os espectros de FTIR para o biopolímero extraído, em que os valores dos picos característicos da amostra estão destacados, e a comparação das principais bandas de absorção da amostra deste trabalho com os dados da literatura estão apresentadas na Tabela 6.9.

Figura 6.13 Espectro de FTIR para a amostra de PHB extraídas de *C. necator_glpFK*

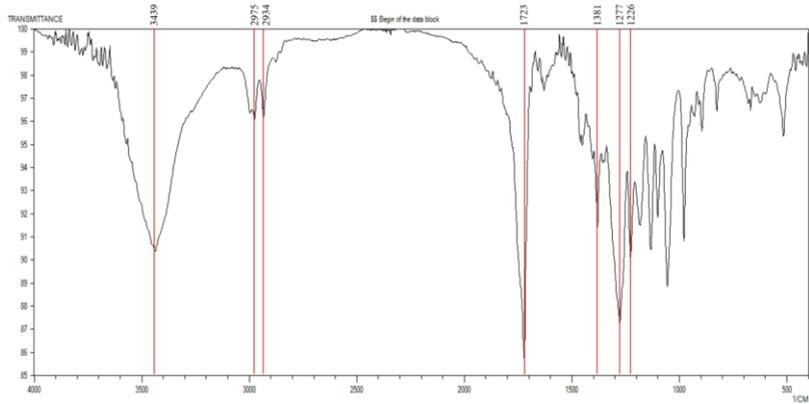


Tabela 6.9 Bandas características no espectro de FTIR para o PHB extraído

Faixa de absorção (cm ⁻¹)		Atribuição do grupo funcional	Referência
Amostra de PHB	PHB literatura		
1226-1277	1278	C-O-C	Maia, 2016
	1120-1280		Saratale; Oh, 2015
	1227-1287		Quines, 2015
	1050-1230		Contreras et al., 2015
	1053-1275		Sombrio, 2016
1381	1382-1458	CH ₃	Maia, 2016
	1379-1455		Saratale; Oh, 2015
	1385		Quines, 2015
	1370-1390		Contreras et al., 2015
	1379		Sombrio, 2016
1723	1720	C=O	Maia, 2016
	1721		Saratale; Oh, 2015
	1724		Quines, 2015
	1726		Contreras et al., 2015
	1719		Sombrio, 2016
2934-2975	2931-2972	C-H	Maia, 2016
	2910-3300		Saratale; Oh, 2015
	2937-2983		Quines, 2015
	2850-2960		Contreras et al., 2015
	2934-2976		Sombrio, 2016
3439	3437	OH	Maia, 2016
	3444		Saratale; Oh, 2015
	3940		Quines, 2015

A amostra apresentou os mesmos picos e bandas, característicos do PHB: bandas em $1226 - 1277 \text{ cm}^{-1}$ e $2934 - 2975 \text{ cm}^{-1}$ correspondentes aos grupos C-O-C e CH, respectivamente; picos em 1381 e 1723 cm^{-1} que equivalem aos grupos CH_3 e C=O, respectivamente.

Em ambos os espectros, houve o aparecimento de um pico em 3439 cm^{-1} , também encontrado por Maia (2016), Saratale; Oh, (2015) e Quines (2015), que foi atribuído ao estiramento OH, indicando a presença de umidade no material.

Compilando os resultados de Maia (2016), Saratale; Oh, (2015), Quines (2015), Contreras e colaboradores (2015) e Sombrio (2016), bandas em torno de 1050 e 1287 cm^{-1} correspondem à vibração da molécula com deformação axial ou estiramento do grupo C-O-C, nos picos entre $1370 - 1458 \text{ cm}^{-1}$ há uma deformação angular simétrica que corresponde ao grupo CH_3 . Bandas entre $1719 - 1726 \text{ cm}^{-1}$ são atribuídas a deformações axiais da carbonila C=O, e as deformações axiais simétrica e assimétrica da ligação C-H na cadeia de PHB foram encontradas nas bandas de $2850 - 3300 \text{ cm}^{-1}$.

Em suma, com a análise de FTIR, foi possível confirmar a amostra do polímero extraído, a partir de glicose e glicerol, como sendo o PHB e concluir que o processo de extração deste a partir do cultivo de *C. necator_glpFK*, com carbonato de propileno reutilizado, não causou alterações químicas drásticas em sua cadeia polimérica, pois os picos de absorção observados nos espectros estão de acordo com os reportados na literatura tanto para o espectro do biopolímero produzido.

6.2.5.2 Viscosidade

Experimentos viscosimétricos mostram a existência de uma relação entre tamanho de partícula, ou tamanho molar, e a viscosidade de dispersões coloidais inorgânicas ou de soluções macromolares. Esta relação torna possível determinar a massa molar a partir da viscosidade de soluções macromolares diluídas (CANEVAROLO, 2006).

A viscosidade intrínseca, utilizada no cálculo da massa molar média Equação 18 (item 5.4.5), foi obtida através da extrapolação gráfica para a concentração tendendo a 0, do gráfico de viscosidade reduzida pela concentração de PHB das soluções descritas na Tabela 5.4. A Figura A5 do Apêndice e a Tabela 6.10 apresenta os resultados de viscosidade intrínseca e massa molar média de cada polímero analisado.

Tabela 6.10 Resultados das viscosidades intrínsecas (η_i) e da massa molar média (\overline{MV}) para os dois polímeros analisados: polímeros obtidos (a) *C. necator*_glpFK 20 g.L⁻¹ glicose e 10 g.L⁻¹ glicerol, e (b) polímero comercial da PHB Industrial

Amostra	η_i (mL.g ⁻¹)	\overline{MV} (g.mol ⁻¹)
a	60,92	5,9 x 10 ⁴
b	90,96	1,0 x 10 ⁵

Para o biopolímero extraído de *C. necator*_glpFK a partir 20 g.L⁻¹ glicose e 10 g.L⁻¹ glicerol neste trabalho, o valor de η_i foi inferior ao obtido para o polímero comercial da PHB Industrial, de 1,0 x 10⁵ g.mol⁻¹.

Leite (2004) reportou valores para os polímeros comerciais da PHB Industrial de 6,4 x 10⁵ e 8,87 x 10⁵ g.mol⁻¹ e da Sigma Aldrich de 3,7 x 10⁵ g.mol⁻¹, enquanto 6,3 x 10⁵ g.mol⁻¹ foi obtido por Figueiredo e colaboradores (2014), valores superiores aos encontrados neste trabalho.

Segundo Bastioli (2005) e Canevarolo (2013), um polímero submetido à alta temperatura pode levar a uma diminuição da massa molar e causar fragilidade, pois pode ocorrer rompimento das cadeias do polímero, formando outras de tamanho menor, com conseqüente mudança na estrutura química e redução da massa molar.

Pode-se dizer que o biopolímero extraído neste trabalho pode ter sofrido degradação térmica das suas cadeias poliméricas, diminuindo sua massa molar, pois foi extraído a 150 °C por 45 min.

Por outro lado, Quines (2015) ao utilizar as mesmas condições de extração realizadas neste trabalho, porém com biomassa produzida por *C. necator* utilizando glicose e frutose como substratos, obteve massa molar de 8,8 x 10⁴ g.mol⁻¹ para o PHB. Apesar da ordem de grandeza ser a mesma, o valor da massa molar foi ligeiramente superior ao encontrado neste trabalho, indicando que o uso do glicerol como substrato pode diminuir a massa molar do PHB produzido.

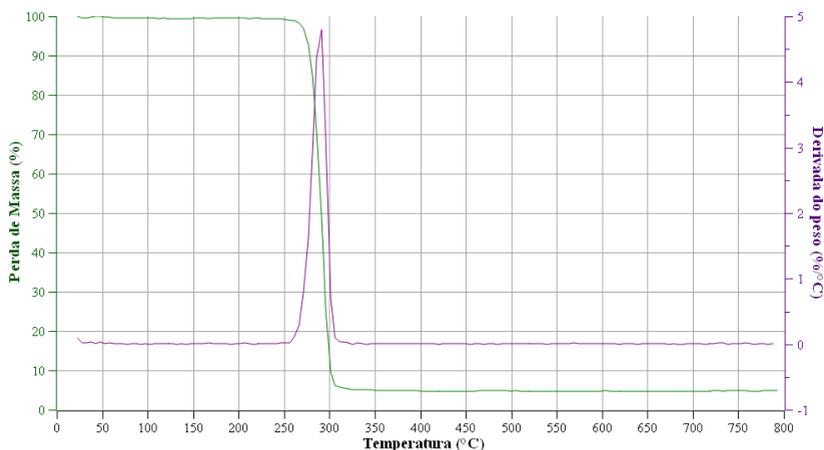
6.2.5.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise de TGA, além de determinar a temperatura de degradação polimérica, também é importante para caracterizar o grau de pureza de um polímero, pois a porcentagem de perda de massa

representa a degradação total do material polimérico, sendo que a parte não degradada é referente às impurezas.

A Figura 6.14 apresenta a curva de TGA da amostra de PHB extraído neste trabalho.

Figura 6.14 Curvas de TGA, termogravimetria e termogravimetria derivada, da amostra de PHB extraídas de *C. necator_glpFK* a partir de 20 g.L⁻¹ glicose e 10 g.L⁻¹ glicerol



A porcentagem de perda de massa 95,18 % representa a degradação total da amostra de PHB, sendo que a parte não degradada é referente às impurezas. Portanto, o resultado de pureza observado pela análise termogravimétrica 95,18% confirma o resultado de pureza encontrado pela cromatografia gasosa apresentada no item 6.2.5.

Pelo termograma da Figura 6.14 (curva verde), observou-se que o polímero extraído do cultivo sofreu apenas um estágio de perda de massa, apresentando temperatura de início de degradação ($T_i = 266,43$ °C) e temperatura máxima de degradação ($T_{pico} = 291,26$ °C). O valor de T_{pico} foi determinado a partir da temperatura máxima do pico observado na primeira derivada da curva de TGA (curva roxa). Abdelwahab (2012) realizou os testes de TGA em filmes de polímero comercial em pó, solubilizados em clorofórmio seguido de evaporação do solvente e reportou intervalo menor de degradação para o polímero comercial da PHB Industrial, de massa molar $4,25 \times 10^5$ g.mol⁻¹, sendo $T_i = 260$ °C e $T_{pico} = 279$ °C, valores inferiores aos obtidos para o biopolímero

extraído com carbonato de propileno neste estudo, o que indica que o biopolímero extraído apresentou maior estabilidade térmica do que o obtido pelo autor citado. É interessante ressaltar que a alta temperatura de decomposição encontrada para o PHB obtido neste trabalho é um fator atrativo comercialmente, uma vez que esta característica favorece sua aplicação em processos de moldagem por extrusão e sob altas temperaturas, possibilitando a produção de filmes biodegradáveis, por exemplo, o que representa uma possibilidade alternativa à utilização de plásticos de origem petroquímica.

Os resultados encontrados no presente trabalho indicam que não houve alteração na propriedade de degradação térmica e de pureza para a obtenção de PHB. Além disso, os valores encontrados estão dentro dos reportados na literatura para o polímero comercial, com algumas variações.

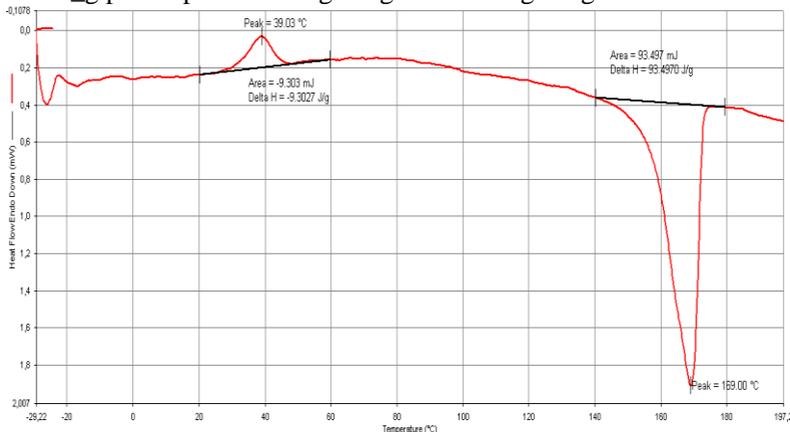
6.2.5.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As propriedades térmicas de materiais poliméricos semicristalinos são geralmente avaliadas pelos seguintes parâmetros: temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e grau de cristalinidade (X_c), que afetam fortemente as aplicações potenciais dos polímeros.

O resultado da análise térmica por DSC do biopolímero extraído neste trabalho está apresentado na Figura 6.15.

É possível perceber a presença de dois picos de cristalização e fusão (T_c e T_m), para a amostra, em 39,03 °C (T_c) e 169,00 °C (T_m). A porcentagem de cristalinidade do biopolímero extraído foi calculada a partir da Equação 19 (item 5.4.6).

Figura 6.15 Curva de DSC para a amostra de PHB extraídas de *C. necator*_glpFK a partir de 20 g.L⁻¹ glicose e 10 g.L⁻¹ glicerol



Os grânulos de PHB acumulados por bactérias apresentam característica amorfa, porém, quando extraídos formam estruturas cristalinas devido à liofilização ou secagem das células e por tratamentos utilizados para recuperação do biopolímero (HAHN; CHANG; LEE, 1995). O grau de cristalinidade (X_c) do biopolímero extraído neste estudo foi de 59,29%, valor dentro do intervalo reportado na literatura para PHB, 55-80% (HOLMES; LIM, 1990; GRIGULL et al., 2008). O grau de cristalinidade tem influência significativa sobre as propriedades mecânicas do biopolímero, pois o mesmo afeta a extensão das ligações secundárias intermoleculares, existentes nas regiões cristalinas (MACHADO et al., 2010; CALLISTER, 2002).

A temperatura de fusão (T_m) do polímero extraído neste estudo foi de 169,0 °C. Este valor obtido para a temperatura de fusão de PHB está entre o intervalo de dados reportado na literatura, de 160 – 180 °C (DALCANTON, 2006; FIORESE et al., 2009; MARJADI; DHARAIYA, 2014).

A temperatura de fusão é uma característica de extrema importância devido às limitações de aplicação de polímeros que apresentam temperatura de degradação térmica próxima à temperatura de fusão em processos de moldagem e que exigem manipulação dos polímeros em elevadas temperaturas (FIGUEIREDO et al., 2014).

Tanadchangsang, Yu (2012), Contreras e colaboradores (2015) e Sombrio (2016) produziram PHB com *C. necator* utilizando glicerol como substrato e obtiveram resultados para T_m um pouco acima do

encontrado nesse trabalho, variando entre 172,7 – 173,9 °C, enquanto o resultado de X_c foi semelhante (59,9 – 65%). Quanto aos valores para o polímero comercial da PHB Industrial, Farias (2009) obteve valor de T_m de 175,4 °C e X_c de 64,4%, valores próximos do encontrado nesse trabalho. Com base nos resultados de T_i (266,43 °C), apresentado no item anterior, e de T_{pico} (291,26 °C), observa-se que o PHB extraído pode se processado a uma temperatura inferior à temperatura de degradação, o que reduz as possibilidades de degradação polimérica durante processos de extrusão, injeção e termoformagem.

A temperatura de transição vítrea encontrada nesse trabalho, (T_g), -0,82 °C, foi inferior aos valores reportados na literatura para PHB extraído de *C. necator* com carbonato de propileno, ou seja, segundo Fiorese e colaboradores (2009), esse valor foi de 4,9 °C. De acordo com Anderson e Dawes (1990), valores de T_g entre -5 e 5 °C caracterizam o PHB. Segundo Lucas e colaboradores (2001) quanto menor a temperatura de transição vítrea, mais flexível é o material.

7 CONCLUSÃO

O uso de glicerol combinado a glicose para a produção de PHB por *C. necator_glpFK* se mostrou viável, uma vez que o substrato glicerol foi consumido durante todo cultivo celular, tornando possível o seu aproveitamento como produto de maior valor agregado. A partir dos resultados discutidos, podem ser destacadas as seguintes conclusões:

- Os substratos glicose e glicerol podem ser utilizados em cultivos para produção de PHB, com ambas as cepas estudadas. Comparativamente, a cepa recombinante consumiu os substratos de forma mais eficiente, já que essa tem maior capacidade de consumir glicerol quando comparada à cepa parental.

- Os resultados apresentados indicam que para se obter maior produtividade de processo, a concentração de glicose deve ser de 20 g.L⁻¹ e a concentração de glicerol de 10 g.L⁻¹ ou 25 g.L⁻¹, na tentativa de reduzir os custos do processo de produção de PHB. O aproveitamento do subproduto glicerol na concentração de 25 g.L⁻¹ é a estratégia mais apropriada para levar a produção de PHB e conseqüentemente a problemas relacionados ao seu destino.

- A estratégia de cultivo adicionando pulso de glicerol após o esgotamento de glicose apresentou maior produtividade em polímero do que o cultivo em que os substratos são adicionados desde o início.

- Foi possível determinar os parâmetros de QO₂, K_La, Y_{Xr/O} e m de *C. necator_glpFK* durante a produção de PHB, tanto em 20 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol quanto em 20 g.L⁻¹ de glicose e 25 g.L⁻¹ de glicerol, apresentando comportamento de consumo de oxigênio similar em ambas as culturas.

- As propriedades térmicas do polímero produzido com glicose e glicerol com carbonato de propileno reutilizado apresentou alta recuperação de PHB, com elevada pureza e propriedades físicas semelhantes às reportadas na literatura para PHB, com uma diminuição da massa molar, utilizando-se um solvente ambientalmente mais indicado, e com a possibilidade de reutilização. Foi confirmado que o carbonato de propileno, solvente de baixa toxicidade, pode ser reutilizado no processo de extração.

Os resultados obtidos neste trabalho são importantes, pois mostram que *C. necator_glpFK* é capaz de crescer em glicerol

combinado a glicose, possibilitando a valorização do substrato glicerol, pela produção de PHB.

8 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar glicerol bruto combinado a glicose, para a produção de PHB a partir de *C. necator_glpFK*;

- Otimizar o processo de produção de PHB, a partir de *C. necator_glpFK*, visando alta concentração celular a partir de diferentes estratégias de cultivo, como: alimentação de nitrogênio durante a fase de produção;

- Investigar a produção de copolímero, a partir de *C. necator_glpFK*.

9 REFERÊNCIAS

ABDELWAHAB, M. A.; FLYNN, A.; CHIOU, B.-S.; IMAMC, S.; ORTS, W.; CHIPELLINI, E. Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA–PHB blends. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, p. 1822-1828, 2012.

ABIOVE. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. http://www.abiove.org.br/site/_FILES/Portugues/05022016-17562905_02_2016_estadao_conteudo.pdf. Acesso em: 07 setembro 2016.

AGNEW, D. E.; PFLEGER, B. F. Synthetic biology strategies for synthesizing polyhydroxyalkanoates from unrelated carbon sources. **Chemical Engineering Science**, v. 103, p. 58-67, 2013.

AHN, W.S.; PARK, S. J.; LEE, S.Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 235-240, 2001.

AKHTAR, S.; POUTON, C. W.; NOTARIANNI, L. J. The influence of crystalline morphology and copolymer composition on drug release from solution cast and melt-processed P(HB-HV) copolymer matrices. **Journal of Controlled Release**, v. 17, p. 225-234, 1991.

ALBUQUERQUE, P. B. S.; MALAFAIA, C. B. Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 615-525, 2017.

ALMEIDA, A.; NIKEL, P. I.; GIORDANO, A. M.; PETTINARI, M. J. Effects of granule-associated protein PhaP on glycerol-dependent growth and polymer production in poly(3-hydroxybutyrate)-producing *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, p.7912-7916, 2007.

ALDOR, I.S. E KEASLING, J.D. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 475-483, 2003.

ANDREESSE, B.; LANGE, A. B.; ROBENEK, H.; STEINBUCHEL, A. Conversion of glycerol to poly(3-hydroxypropionate) in recombinant

Escherichia coli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 622–626, 2010.

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

APATI, G. P. **Síntese, caracterização e degradação de p(3hb) por *Cupriavidus necator*, utilizando glicerol como substrato**. Tese de Doutorado (Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2012.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. Biotecnologia: tópicos de microbiologia industrial, v. 2. São Paulo: E. Blücher. 1990.

ARAGÃO, G. M. F. **Production de polyhydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures**. These (Doctorat spécialité: Biologie et génétique Moléculaires et Cellulaires – Biotechnologie) – L'institut National des Sciences appliquées de Toulouse, Toulouse. 1996.

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

ARAGÃO, G. M. F.; SCHMIDEL, 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.

ARENAS, T.L.; CONTRERAS, M. G.; REZA, O. A.; CRUZ, M. S. Analysis of the fermentation strategy and its impact on the economics of the production process of PHB (polyhydroxybutyrate). **Computers & Chemical Engineering**, v. 107, p. 140-150, 2017.

ASHBY, R. D.; SOLAIMAN, D. K. Y.; FOGLIA, T. A. Synthesis of Short-/Medium-Chain-Length poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 2106-2112, 2005.

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.

BASTIOLI, C. **Handbook of biodegradable polymers**. Rapra Technology Limited, p. 566, 2005.

BELFARES, L.; PERRIER, M.; RAMSAY, B.A.; RAMSAY, J.A.; JOLICOEUR, M.; CHAVARIE, C. Multi-inhibition kinetic model for the growth of *Alcaligenes eutrophus*. **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 41, p. 249-256, 1995.

BHATTACHARYYA, A. et al. Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 34, 2012.

BIOPLASTICS. http://docs.european-bioplastics.org/2016/pr/2014/EuBP_PR_market_data_bioplastics_141203.pdf. Acesso em: 05 de julho de 2017.

BOEIRA, C. Z. **Produção de poli-hidroxibutirato por *Cupriavidus necator* recombinante em glicerina e vinhaça**. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2018.

BRANDL, H. et al. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(3-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977–1982, 1988.

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

CALLISTER Jr. W. D. Ciência e engenharia de materiais: uma introdução, **5ª ed., Livros Técnicos e Científicos**: Rio de Janeiro, 2002.

CANEVAROLO, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. 1. ed. São Paulo: ARTLIBER, p. 444. 2007.

CANEVAROLO, S. V. **Ciência dos Polímeros**. 3. ed. São Paulo: ARTLIBER, p. 280, 2013.

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

CAVALHEIRO, J. M. B. T.; RAPOSO, R. S.; ALMEIDA, M. C. M. D.; CESÁRIO, M. T.; SEVRIN, C.; GRANDFILS, C.; FONSECA, M. M. R. Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Bioresource Technology**, v.111, p. 391-397, 2012.

CENTENO-LEIJA, S.; HUERTA-BERISTAIN, G.; GILES-GOMEZ, M.; BOLIVAR, F.; GOSSET, G.; MARTINEZ, A. Improving poly-3-hydroxybutyrate production in *Escherichia coli* by combining the increase in the NADPH pool and acetylCoA availability. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 105, p. 687– 696. 2014.

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

CHEN, Z.; SONG, Y.; ZHANG, J.; LIU, W.; CUI, J.; LI, H.; CHEN, F. Laminated electrospun nHA/PHB-composite scaffolds mimicking bone extracellular matrix for bone tissue engineering. **Materials Science & Engineering: C**, v. 72, p. 341-351, 2017.

CONTRERAS, A. R.; KOLLER, M.; DIAS, M. M. S.; MONFORT, M. C.; BRAUNEGG, G.; CALVO, M. S. M. Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 95, p. 50-57, 2015.

CORRÊA, M. P. **Extração do biopolímero P(3HB) com solvente renovável**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

DALCANTON, F. **Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxi-*butirato*) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos.**

Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

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**, v. 33, n. 3, p. 552–556, 2010.

DENNIS, D.; SEIN, V.; MARTINEZ, E.; AUGUSTINE, B. PhaP is involved in the formation of a network on the surface of polyhydroxyalkanoate inclusions in *Cupriavidus necator* H16. **Journal Bacteriology**, v.190, p.555-563, 2008.

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.

DURNIN, G. et al. Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 1, p. 148–161, 2009.

FACCIN, D. J. L.; RECH, R.; SECCHI, A. R.; CARDOZO, N. S. M.; AYUB, M. A. Z. Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 420-425, 2013.

FARIAS, D. **Produção e caracterização de poli(3-hidroxi-*butirato-co-3-hidroxi-*valerato*) por *Cupriavidus necator* em melão cítrico.***

Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

FIGUEIREDO, T. V. B.; CAMPOS, M. I.; SOUSA, L. S.; SILVA, J. R.; DRUZIAN, J. I. Produção e caracterização de poli-*hidroxialcanoatos* obtidos por fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel. **Química Nova**, v. XY, p.1-7, 2014.

FIORESE, M. L. **Estratégias de cultivo e recuperação e caracterização de poli (3-hidroxi-*butirato*) produzido por *Ralstonia eutropha*.** Tese de doutorado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

FIGIORESE, M. L., FREITAS, F., PAIS, J., RAMOS, A. M., ARAGÃO, G. M. F., REIS, M. A. M. Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, p. 454–461, 2009.

FORMOLO, M. C.; DUARTE, M. A. T.; SCHNEIDER, A. L.; FURLAN, S. A.; PEZZIN, A. P. T. Polihidroxialcanoatos: biopoliésteres produzidos a partir de fontes renováveis. **Revista saúde e Ambiente**, v. 4, n. 2, p. 14-21, 2003.

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.

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.

GOGOLEWSKI, S.; JAVANOVIC, M.; PERREN, S. M.; HUGHES, M. Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/PHV). **Biomaterials**, v. 11, p. 679-685, 1990.

GRIGULL, V. H., SILVA, D. D., GARCIA, M. C. F., FURLAN, S. A., PEZZIN, A. P. T., SCHNEIDER, A. L. S., ARAGÃO, G. M. F. Production and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Oleic Acid by *Ralstonia eutropha*. **Food Technology Biotechnology**, v. 46, p. 223, 2008.

GUMEL, A. M.; ANNUAR, M. S. M.; CHISTI, Y. Recent advances in the production, recovery and applications of polyhydroxyalkanoates. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 580–605, 2013.

HAHN, S. W.; CHANG, Y. K.; LEE, S. Y. **Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in**

Alcaligenes eutrophus and recombinant *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, v. 61, n°1, p. 34-39, 1995.

HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.57, 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.

HOLMES, P. A., LIM, G. B. Separation process. **U.S. Patent, n° 4.910.145**, 1990.

IBRAHIM, M. H. A.; STEINBUCHER, A. *Zobellella denitrificans* strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol. **Journal Applied Microbiology**, v. 108, p. 214–225, 2010.

IENCZAK, J. L. **Estratégia de cultivo em alta concentração celular para a produção de Poli(3-hidroxibutirato) em substratos com moderada concentração da fonte de carbono**. Florianópolis. Tese de doutorado (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

IENCZAK, J. L.; ARAGÃO, G. M. F. Biotechnologically Produced Biodegradable polyesters, *In: Handbook of biodegradable polymers*, LENDLEIN, A. E SISSON, A. (eds.) WILEY – VCH VERLAG GMBH & Co. KGaA. Weinheim, Alemanha, v. 1, p. 23-38, 2011.

IENCZAK, J. L.; QUINES, L. K.; MELO, A. A.; BRANDELLERO, M.; MENDES, C. R.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F. High cell density strategy for poly(3-hydroxybutyrate) production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 585-596. 2011.

IENCZAK, J. L.; SCHMIDT, M.; QUINES, L. Q.; ZANFONATO, K.; PRADELLA, J. G. C.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production in Repeated fed-Batch with Cell Recycle Using a Medium with low Carbon Source Concentration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 408-417, 2016.

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.

KADDOR, C.; STEINBÜCHEL, A. Implications of various phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system mutations on glycerol utilization and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation in *Ralstonia eutropha* H16. **AMB Express**, v. 1, n. 1, p.16, 2011.

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

KAPRITCHKOFF, F. M., BONOMI, A., MIRANDA, E. A., PRADELLA, J. G. C., MAIORANO, A. E., ZUCCOLO, M., SCHMIDELL, W. **Seleção de enzimas visando a lise da parede celular de *Ralstonia eutropha***. In: XIII- SINAIFERM - Simpósio Nacional de Fermentações, 2000.

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

KHARDENAVIS, A. A.; KUMAR, M. S.; MUDLIAR, S. N.; CHAKRABARTI, T. Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly-hydroxybutyrate. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3579-3584, 2007.

KIM, B. S.; LEE, S. C.; LEE, S. Y. ; CHANG, H. N.; CHANG, Y. K.; WOO, S. I. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, p. 892-898, 1994.

KIM, Y. B.; LENZ, R. W. Polyesters from microorganisms. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, v.71, p.51-79, 2001.

KIVANC, M.; BAHAR, H.; YILMAZ, M. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from molasses and peach pulp. **Abstracts/Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 0-21, 2008.

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

KOLLER, M.; BRAUNEGG, G. Advanced approaches to produce polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable and economic fashion. **The EuroBiotech Journal**, v. 2, p. 89-103, 2018.

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

KOURMENTZA, C.; KORNAROS, M. Biotransformation of volatile fatty acids to polyhydroxyalkanoates by employing mixed microbial consortia: The effect of pH and carbon source. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 388-398, 2016.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607, 2005.

KUCHTA, K.; CHI, L.; FUCHS, H.; POTTER, M.; STEINBUHEL, A. Studies on the influence of phasins on accumulation and degradation of PHB and nanostructure of PHB granules in *Ralstonia eutropha* H16. **Biomacromolecules**, v.8, p.657-662, 2007.

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.

KUMAR, M.S., MUDLIAR, S.N., REDDY, K.M.K., CHAKRABARTI, T. Production of biodegradable plastics from active sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant. **Bioresource technology**, v. 95, p. 327-330. 2004.

LAUFENBERG, G. Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept, (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167-198, 2003.

LAFFERTY, R. M., HEINSLE, E. Use of cyclic carbonic acid esters as solvents for poly-(β -hydroxybutyric acid). **U.S Patent n° 4,140,741**, 1979.

LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Effect of complex nitrogen source on the synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* in flask and fed-batch cultures. **Journal of Environmental Polymer Degradation**, v. 2, p. 169-176, 1994.

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

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

LEITE, H. M. E. **Formulação e caracterização de matrizes de Poli-hidroxibutirato para liberação controlada de fármacos**. Tese de Mestrado em Engenharia e Ciências dos Materiais, Campos dos Goytacazes, 2004.

LOPAR, M.; SPOLJARIC, I. V.; CEPANEC, N.; KOLLER, M.; BRAUNEGG, G.; HORVAT, P. Study of metabolic network of *Cupriavidus necator* DSM 545 growing on glycerol by applying elementary flux modes and yield space analysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 6, p. 913-930, 2014.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**, Epapers: Rio de Janeiro, 2001.

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.

LUO, X., GE, X.; CUI, S.; LI, Y. Value-added processing of crude glycerol into chemicals and polymers. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 144-154, 2016.

- 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-Hidroxibutirato (PHB) e de Compósitos PHB/Pó de Madeira. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, p. 65-71. 2010.
- McCHALICHER, C. W. J.; SRIENC, F.; ROUSE, D. P. Solubility and degradation of polyhydroxyalkanoate biopolymers in propylene carbonate. **American Institute of Chemical Engineers**, v. 56, p. 1616-1625, 2009.
- 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.
- MAIA, N. V. L. P. **Produção e caracterização de blendas poliméricas de (poli(3-hidroxibutirato)) (P(3HB)) e amido de milho na produção de plástico biodegradável**. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- MARANGONI, C.; FURIGO, A.; DE ARAGÃO, G. M. F. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 137–141, 2002.
- MARJADI, D., DHARAIYA, N. Recovery and characterization of poly(3-Hydroxybutyric acid) synthesized in *Staphylococcus epidermidis*. **African Journal of Environmental Science and Technology**, v. 8, p 319-329, 2014.
- MATSUMOTO, K.; MATSUSAKI, H.; TAGUCHI, S.; SEKI, M.; DOI, Y. Cloning and characterization of the *Pseudomonas* sp. 61-3 phaG gene involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 1, p. 142–7, 2001.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- 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.; GOORMACHTIGH, L.; GONZALEZ, G. L.; DE WEVER, H.; VOLCKE, P. I. E. Modeling pure culture heterotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB). **Bioresource Technology**, v. 155, p. 272-280, 2014.

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*. **Bioresource Technology**, v.133, p. 38–44, 2013.

NIKEL, P. I.; PETTINAR, M. J.; GALVAGNO, M. A.; MÉNDEZ, B. S. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol by a recombinant *Escherichia coli* arcA mutant in fed-batch microaerobic cultures. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 77, p. 1337–1343, 2008.

OBRUCA, S.; SEDLACEK, P.; KOLLER, M.; KUCERA, D.; PERNICOVA, I. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. **Biotechnology Advances**, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.006>, 2017.

OJUMU, T.; YU, J.; SOLOMON, B. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymers. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 18–24, 2004.

PAIS, J.; FARINHA, I.; FREITAS, F.; SERAFIM, L. S.; MARTINEZ, J. C.; AREVALO-RODRIGUEZ, M.; AUXILIADORA, P. M.; REIS, M.A. Improvement on the yield of polyhydroxyalkanoates production from cheese whey by a recombinant *Escherichia coli* strain using the proton suicide methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 55, p. 151–158, 2014.

PATHAK, S.; SNEHA, C.; MATHEW, B. B. Bioplastics: Its Timeline Based Scenario & Challenges. **Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry**, v.2, p. 84-90, 2014.

PATNAIK, P. Dispersion optimization to enhance PHB production in fed-batch cultures of *Rastonia eutropha*. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1994-2001, 2006.

PEÑA, C.; CASTILLO, T.; NUÑEZ, C.; SEGURA, D. Bioprocess Design: Fermentation Strategies for Improving the Production of Alginate and Poly- β -Hydroxyalkanoates (PHAs) by *Azotobacter*

vinelandii. Rijeka, Croatia: **INTECH- Open Access Publisher**, p. 217–242, 2011.

PEÑA, C.; CASTILLO, T.; GARCIA, A.; MILLAN, 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.

PIRT, S. J. **Principles of microbe and cell cultivation**. Londres, Blackwell Scientific Publications. 1975.

POSADA, J. A.; NARANJO, J. M.; LÓPEZ, J. A.; HIGUITA, J. C.; CARDONA, C. A. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 310-317, 2011.

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 *Haloarcucla marismortui*. **Folia Microbiology**, v. 57, p. 71-79, 2012.

POHLMANN, A. et al. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1257–1262, 2006.

PÖTTER, M. et al. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology**, v. 148, n. 8, p. 2413-2426, 2002.

PÖTTER, M.; MÜLLER, H.; STEINBÜCHEL, A. Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 825-833, 2005.

POVOLO, S. et al. Production of Polyhydroxyalkanoates from Fatty Wastes. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 20, n. 4, p. 944–949, 2012.

QUINES, L. K. M. **Extração de poli(3-hidroxibutirato), produzido por *Cupriavidus necator*, utilizando carbonato de propileno combinado com métodos mecânicos**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

QUINES, L. K. M.; IENCZAK, J. L.; SCHMIDT, M.; ZANFONATO, K.; RODRIGUES, M. I.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F. Extração de poli(3-hidroxiobutirato), produzido por *Cupriavidus necator*, com carbonato de propileno. **Química Nova**, v. 38, p. 214-220, 2015.

RABERG, M.; PEPLINSKI, K.; HEISS, S.; EHRENREICH, A.; VOIGT, B.; DORING, C.; BOMEKE, M.; HECKER, M.; STEINBUCHER, A. Proteomic and transcriptomic elucidation of the mutant *Ralstonia eutropha* G⁺¹ with regard to glucose utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n. 6, p. 2058-2070. 2011.

RAI, R. et al. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. **Materials Science and Engineering R: Reports**, v. 72, n. 3, p. 29–47, 2011.

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

RAICHNER, G. **Análise econômica da produção de polímeros biodegradáveis no contexto de uma biorefinaria a partir de cana-de-açúcar**. São Paulo. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo. 2011.

RAMADAS, N.V.; SINGH, S.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 17-23, 2009.

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

RAZA, Z. A.; ABID, S.; BANAT, I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. **International Biodeterioration and 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.

REHM, B.H.A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics.

Biochemical Journal, v. 376, p. 15-33, 2003.

REINECKE, F.; STEINBUCHER, A. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 91-108, 2009.

REOLON, T. M. **Determinação da viscosidade do biopolímero produzido pelo fungo nativo *Botryosphaeria rhodina* MMPI.**

Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2011.

SARATALE, G. D.; OH, M-K. Characterization of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) produced from *Ralstonia eutropha* using an alkali-pretreated biomass feedstock. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 627-635, 2015.

SCHIMIDELL W. **Agitação e aeração em biorreatores.** In: W.

Schimidell, U.A. Lima, E. Aquarone, W. Borzani. *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica* São Paulo: Edgard Blücher, vol. 2.; p.277-331, 2001.

SCHMIDT, M. **Produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* DSM 545 em meio suplementado com óleo de soja miniemulsionado.** Florianópolis. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. 2011.

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. Florianópolis. 2015.

SCHMIDT, M.; IENCZAK, J. L.; QUINES, L. K.; ZANFONATO, K.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F. Poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) 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-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* em batelada alimentada. **Polímeros-Ciência e Tecnologia**, v. 27, p. 110-115, 2003.

SHARMA, P.K.; FU, J.; SPICER, V.; KROKHIN, O. V.; CICEK, N.; SPARLING, R.; LEVIN, D. V. Global changes in the proteome of *Cupriavidus necator* H16 during poly-(3-hydroxybutyrate) synthesis from various biodiesel by-product substrates. **AMB Express**, v. 6, p. 36. 2016.

SILVA, L. F.; TACIRO, M. K.; RAICHER, G.; PICCOLI, R. A. M.; MENDONÇA, T. T.; LOPES, M. S. G.; GOMEZ, J. G. C. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 71, p. 2-7. 2014.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; CROCKER, N. V. Genetic construction of recombinant *Pseudomonas chlororaphis* for improved glycerol utilization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 45-49, 2016.

SOMBRIO, B. R. **Produção de poli(3-hidroxibutirato) por *cupriavidus necator* em processo descontínuo alimentado com pulso de glicerol.** Dissertação de Mestrado (Engenharia de Bioprocessos). Universidade da Região de Joinville-UNIVILLE. Joinville. 2015.

SOMBRIO, B. R.; SCHROEDER, T.; GARCIA, M. C. F.; APATI, G. P.; SCHNEIDER, A. L. S.; PEZZIN, A. P. T. **Produção de Poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* em processo descontínuo alimentado com pulso de glicerol.** In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais – CBECiMat, nº 22, Natal, 2016.

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-batch culture using glycerol. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 27, p. 27-32, 2017.

SPOLJARIC, I. V.; LOPAR, M.; KOLLER, M.; MUHR, A.; SALERMO, A.; REITERER, A.; MALLI, K.; ANGERER, H.; STROHMEIER, K.; SCHOBER, S.; MITTELBAACH, M.; HORVAT, P. Mathematical modeling of poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] synthesis by

- Cupriavidus necator* DSM 545 on substrates stemming from biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 482–494, 2013.
- STEINBIICHEL, A.; STEINBIICHEL, A. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 219-228, 1995.
- STEINBÜCHEL, A.; LÜTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 81-96, 2003.
- STUBBE, J.; TIAN, J. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of PHA synthase. **Natural Product Report**, v.20, p.445-57, 2003.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v.25. p. 1503-55, 2000.
- SURIYAMONGKOL, P., WESELAKE, R., NARINE, S., MOLONEY, M. , SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review. **Biotechnology Advances**, v.25, p. 148-175, 2007.
- TANADCHANGSAENG, N.; YU, J. Microbial synthesis of polyhydroxybutyrate from glycerol: gluconeogenesis, molecular weight and material properties of biopolyester. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 11. 2012.
- TSUJI, H.; IKADA, Y. Blends of aliphatic polyesters. 1. Physical properties and morphologies os solution-cast blens from poly(DLlactide) and poly(ϵ -caprolactone). **Journal of Applied Polymer Science**. 60: 2367-2375, 1996.
- VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2285 – 2289, 2004.
- VASTANO, M.; CASILLO, A.; CORSARO, M. M.; SANNIA, G.; PEZZELLA, C. Production of medium chain length polyhydroxyalkanoates from waste oils by recombinant *Escherichia coli*. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, p. 700-709, 2015.

VOLOVA, T. G.; KALACHEVA, G. S.; GORBUNOVA, O. V.; ZHILA, N. O. Dynamics of activity of the key enzymes of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Ralstonia eutropha*, v. 40, n. 2, p. 201-209, 2004.

VOLOVA, T.; ZHILA, N. O.; KALACHEVA, G. S.; BRIGHAM, C. J.; SINSKEY, A. J. Effects of intracellular poly(3-hydroxybutyrate) reserves on physiological-biochemical properties and growth of *Ralstonia eutropha*. **Research in Microbiology**, v. 164, n. 2, p. 164-171, 2013.

XAVIER, R. J.; BABUSHA S. T.; GEORGE J.; RAMANA K.V.; Material Properties and Microbial Activity of Polyhydroxybutyrate (PHB) Films Incorporated with Vanillin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, p. 1498-1510, 2015.

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

WELLEN, R.M.R.; RABELLO, M.S.; FECHINE, G.J.M.; CANEDO, E.L. The melting behaviour of poly(3-hydroxybutyrate) by DSC. **Reproducibility study, Polymer Testing**, v. 32, p. 215-220, 2013.

WIECZOREK, R. et al. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 9, p. 2425-2435, 1995.

YANG, F.; HANNA, M.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol – a byproduct of biodiesel production. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, p. 13, 2012.

APÊNDICE

Figura A1 Curva típica para determinar o fator de conversão de glicose em célula ($Y_{Xr/Glicose}$). Cultivo de 10 g.L^{-1} de glicose e 20 g.L^{-1} de glicerol. O coeficiente angular representa o valor do $Y_{Xr/Glicose}$.

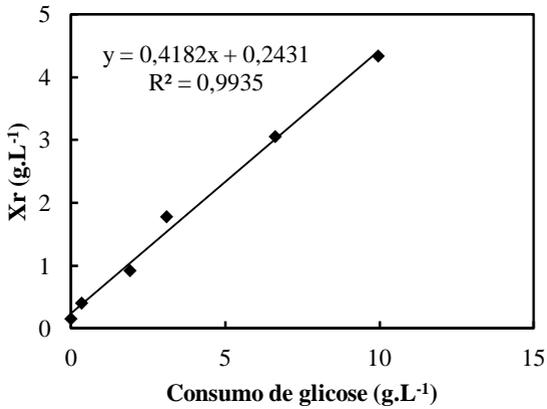


Figura A2 Curva típica para determinar o fator de conversão de nitrogênio em célula ($Y_{Xr/Nitrogênio}$). Cultivo de 10 g.L^{-1} de glicose e 20 g.L^{-1} de glicerol. O coeficiente angular representa o valor do $Y_{Xr/Nitrogênio}$.

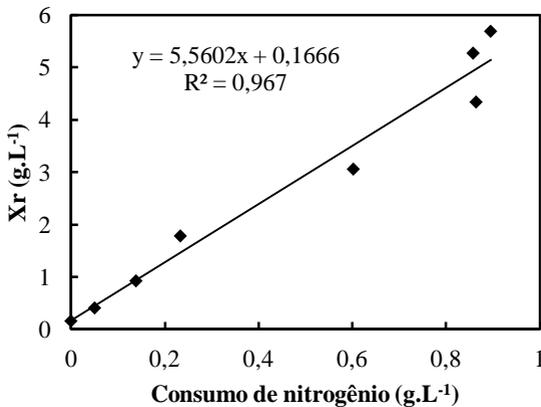


Figura A2 Curva típica para determinar o fator de conversão de glicerol em PHB ($Y_{\text{PHB/Glicerol}}$). Cultivo de 10 g.L^{-1} de glicose e 20 g.L^{-1} de glicerol. O coeficiente angular representa o valor do $Y_{\text{PHB/Glicerol}}$

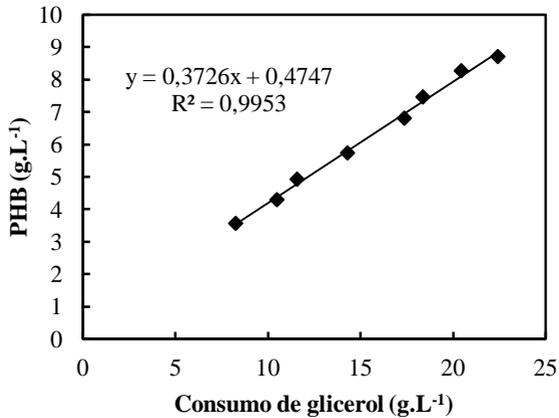
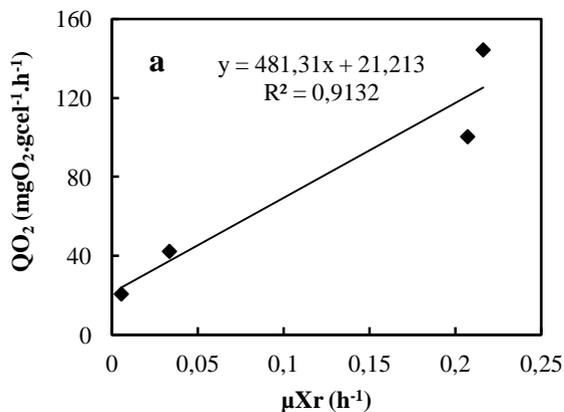


Figura A4 Gráficos para determinação do $Y_{X/O}$ e do q_{O_2} para os cultivos 20 g.L^{-1} de glicose e 10 g.L^{-1} de glicerol (a) e 20 g.L^{-1} de glicose e 25 g.L^{-1} de glicerol (b)



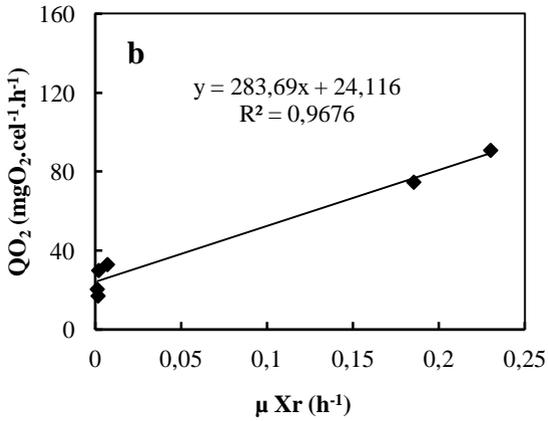


Figura A5 Curva de viscosidade reduzida como função da concentração da solução da amostra de PHB: extraída de *C. necator_glpFK*

