

Raul Remor Dalsasso

**PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE  
VINHAÇA E MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR  
*Cupriavidus necator* DSM 545**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patricia Poletto  
Coorientador (se houver): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>.  
Gláucia Maria Falcão de Aragão

Florianópolis  
2019




**“PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO A PARTIR  
DE VINHAÇA E MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR POR  
*Cupriavidus necator* DSM 545”**

Por

**Raul Remor Dalsasso**

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre 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.ª. Dra. Patricia Poletto  
**Orientadora**


  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão  
**Coorientadora**

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira  
**Coordenadora**

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª. Dra. Patricia Poletto

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Cristiano José de Andrade

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª. Dra. Jaciane Lutz Ienczak

**Florianópolis, 27 de fevereiro de 2019.**



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

Dalsasso, Raul Remor  
Produção de polihidroxibutirato a partir de  
vinhaça e melão de cana-de-açúcar por *Cupriavidus*  
*necator* DSM 545 / Raul Remor Dalsasso ;  
orientadora, Patricia Poletto, coorientadora,  
Gláucia Maria Falcão de Aragão, 2019.  
149 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós  
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis,  
2019.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Biopolímero. 3.  
Cultivo. 4. Hidrólise. 5. Bioprocessos. I. Poletto,  
Patricia. II. Aragão, Gláucia Maria Falcão de. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.



Dedico este trabalho aos nossos antepassados e todos aqueles que se empenharam na construção de um mundo melhor.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer à minha família, pelo apoio. Agradeço também à UFSC, ao departamento EQA e ao laboratório LIEB pela oportunidade de desenvolvimento e realização deste trabalho. Agradeço à CAPES, financiadora deste projeto. Agradeço ao grupo de pesquisa do qual participei, representado pelas minhas atenciosas orientadoras, Gláucia e Patrícia, pela rica troca de experiências e conhecimento.



O uso apropriado das coisas varia de acordo com o tempo, lugar e pessoa. Deve-se ser progressivo o uso prático de cada objeto, de cada ideia. Através de uma progressiva pesquisa científica temos que fazer um crescente uso dos potenciais humanos. Numa era de ciência avançada, o uso de ferramentas e aparatos de uma era menos desenvolvida não são, de modo algum, sinal de progresso. O uso de ferramentas e materiais avançados, desenvolvidos através da imaginação dinâmica e progressiva, pode criar grandes ou pequenos obstáculos no caminho da sociedade; vocês devem encará-los corajosamente. Através da luta e dos choques vocês tem que que continuar marchando para a vitória, para o caminho da justificação do universalismo, a preciosa meta da vida humana.

(Prabhat Ranjan Sarkar)



## RESUMO

A busca pelo desenvolvimento de produtos que possam substituir os polímeros de fósseis tem crescido nas últimas décadas. Nesse contexto, uma das grandes dificuldades que tais estudos encaram é desenvolver produtos com custo competitivo. Dentre os materiais com potencial de substituição dos polímeros fósseis consta o polihidroxibutirato (PHB). O PHB, um poliéster de origem biológico, vem sendo estudado devido às suas características plásticas, apresentando também renovabilidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade. Dentre as bactérias produtoras de PHB, destaca-se *Cupriavidus necator* DSM 545, capaz de acumular mais de 80% de sua massa em PHB e de utilizar diversos substratos como fonte de carbono. Dentre os substratos que *C. necator* pode utilizar para a produção de PHB, constam subprodutos agroindustriais renováveis e de baixo custo, como vinhaça e melaços. A vinhaça, resíduo da destilação na produção de álcool de cana-de-açúcar, é produzida em abundância no Brasil e utilizada como fertilizante, podendo causar danos ambientais. A vinhaça, por ser uma fonte de carbono de baixa concentração, exige estratégias de cultivo com o objetivo de atingir produtividades e volumes de cultivo viáveis, como a utilização de substratos combinados. O melaço de cana-de-açúcar, resíduo da cristalização do açúcar, possui alta concentração de carbono, além de ser abundante e de baixo custo. Assim, o objetivo deste trabalho é a produção de PHB a partir de uma combinação de vinhaça e melaço de cana-de-açúcar. Inicialmente foram realizados cultivos em agitador orbital para avaliar os efeitos de métodos de hidrólise da sacarose presente no melaço: enzimático, químico e biológico. Foram realizados cultivos de crescimento de *C. necator*, em biorreator de 5 L, com o uso de melaço ou mistura de melaço e vinhaça como substratos. Os resultados indicaram que houve crescimento celular e produção de PHB em ambos os cultivos, sendo que o cultivo com o uso da vinhaça apresentou maior velocidade específica máxima de crescimento das células ( $0,36 \text{ h}^{-1}$ ) e produtividade em PHB ( $0,42 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), apresentando 56% de celular máximo de PHB. Assim, o uso do melaço e vinhaça combinados surge como uma alternativa para uma melhora na competitividade do PHB com os polímeros fósseis, bem como para a valorização da vinhaça, evitando-se que esta seja utilizada de modo inadequado e prejudicial ao meio ambiente.

**Palavras-chave:** Biopolímero. Cultivo. Hidrólise. Invertase.

## ABSTRACT

The search for the development of products that can replace fossil polymers has grown in recent decades. One of the great difficulties faced is to develop competitive products. Among the materials with potential replacement of the fossil polymers is polyhydroxybutyrate. Polyhydroxybutyrate (PHB), polyester of bacterial origin, has been studied in the last decades due to its plastic characteristics, also presenting renewability, biodegradability and biocompatibility. Among PHB-producing bacteria, we highlight *Cupriavidus necator* DSM 545, capable of more than 80% of its PHB mass and using several substrates as a carbon source. Among the substrates that *C. necator* can use for PHB production are renewable and low cost agroindustrial byproducts, such as vinasse and molasses. Vinasse, the residue of distillation in the production of alcohol from sugarcane, is produced in abundance in Brazil and used as fertilizer, which can cause environmental damage. Vinasse presents carbon sources in low concentration and so requires cultivation strategies with the aim of achieving viable yields and cultivation volumes. Among those strategies there is the use of combined substrates: using the vinasse simultaneously with a high concentration carbon source. Sugarcane molasses, a residue of sugar crystallization, presents high carbon sources concentration, besides being abundant and low cost. Thus, the objective of this work is the production of PHB from a combination of vinasse and molasses of sugarcane. Initially, orbital shaker cultures were performed to evaluate the effects of hydrolysis methods of sucrose present in molasses: enzymatic, chemical and biological. Cultures of *C. necator* growth were carried out in 5 L bioreactor with the use of molasses or a molasses and vinasse blend as substrates. The results indicated that there was cell growth and PHB production in both cultures, and cultivation with vinasse showed a higher specific maximum growth rate ( $0.36 \text{ h}^{-1}$ ) and PHB productivity ( $0.42 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), reaching 56% of PHB cellular accumulation. Thus, the use of combined molasses and vinasse appears as an alternative for an improvement in the competitiveness of PHB with the fossil polymers, as well as for the valorization of the vinasse, making it used improperly and harmful to the environment.

**Keywords:** Biopolymer. Cultures. Hydrolysis. Invertase.

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

<b>Figura 2.1</b>	Sistema de classificação de materiais baseada em características de biodegradabilidade e conteúdo produzido biologicamente.	33
<b>Figura 2.2</b>	Fórmula química geral dos PHA.	35
<b>Figura 2.3</b>	Estrutura química do PHB.	36
<b>Quadro 2.1</b>	Comparação de propriedades do PHB, PHBHV e PP.	37
<b>Figura 2.4</b>	Principais vantagens dos PHA em relação aos polímeros fósseis.	38
<b>Quadro 2.2</b>	Empresas fabricantes de PHB.	39
<b>Quadro 2.3</b>	Trabalhos publicados pelo grupo de pesquisa em PHB do Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química (EQA) da Universidade Federal de Santa Catarina.	41
<b>Figura 2.5</b>	Células de <i>C. necator</i> contendo grânulos de PHB.	52
<b>Figura 2.6</b>	Diagrama de um processo de produção de PHB.	45
<b>Figura 2.7</b>	Processo de produção de açúcar e etanol a partir de cana-de-açúcar.	48
<b>Figura 2.8</b>	Via metabólica de síntese de PHB a partir de glicose.	55
<b>Figura 2.9</b>	Catabolismo dos carboidratos em <i>C. necator</i> .	58
<b>Figura 2.10</b>	Via metabólica para a utilização de glicerol por <i>C. necator</i>	60
<b>Figura 3.1</b>	Representação do primeiro bloco de experimentos da Etapa 1.	63
<b>Quadro 3.1</b>	Condições utilizadas para os ensaios de rendimento de hidrólise.	65
<b>Quadro 3.2</b>	Nomeclatura dos cultivos realizados visando os efeitos do método de hidrólise do melaço no crescimento de <i>C. necator</i> .	67
<b>Figura 3.4</b>	Cinética de crescimento da biomassa consumo de substrato para os cultivos CAc, CEnz, CBio e CCon realizados em incubadora rotatória.	72
<b>Figura 4.1</b>	Representação do bloco de experimentos realizado na Etapa 2.	76
<b>Quadro 4.2</b>	Nomeclatura dos cultivos realizados na Etapa 2.	78
<b>Figura 4.2</b>	Cinética de consumo de ART e crescimento da biomassa total, biomassa residual e da	84

	concentração de proteínas para cultivo com glicose e frutose e com melão.	
<b>Figura 4.3</b>	Cinética de consumo de ART e crescimento da biomassa total, biomassa residual e concentração de proteínas, para cultivo com melão e vinhaça.	86
<b>Figura 4.4</b>	Gráfico utilizado para o cálculo de $\mu_{\max}$ para o cultivo CVinMel.	87
<b>Figura 4.5</b>	Comparação do crescimento da biomassa total e consumo de ART ao longo do tempo para os cultivos CMel, CVin e CCon em biorreator.	88
<b>Figura 5.1</b>	Representação do bloco de experimentos realizado na Etapa 3.	92
<b>Quadro 5.1</b>	Nomeclatura dos meios de cultivo utilizados na Etapa 3.	93
<b>Figura 5.2</b>	Variação da concentração de S, Xt, Xr e PHB para cultivo PMel.	99
<b>Figura 5.3</b>	Cinética de consumo de glicose, frutose e N para cultivo PMel.	102
<b>Figura 5.4</b>	Variação da concentração de S, Xt, Xr e PHB para cultivo CVinMel.	104
<b>Figura 5.5</b>	Cinética de consumo de glicose, frutose, glicerol, ácido láctico, ácido acético e N para cultivo PVinMel	105
<b>Figura 5.6</b>	Velocidades específicas de crescimento da biomassa residual e de produção de PHB para cultivo PMel e PVinMel.	108
<b>Figura 5.7</b>	Produtividade em fase de produção para cultivo PMel ou PVinMel.	109
<b>Figura 5.8</b>	Acúmulo de PHB ao longo da fase de produção para cultivo PMel ou PVinMel.	110

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.4</b>	Composição do melaço de cana-de-açúcar.	51
<b>Tabela 3.1</b>	Rendimentos de hidrólise atingidos e condições para os procedimentos de hidrólise avaliados.	69
<b>Tabela 3.2</b>	Velocidades específicas de crescimento máxima para cultivos que utilizaram hidrólise por ácido sulfúrico, invertase, <i>S. cerevisiae</i> e para cultivo controle em incubadora rotatória.	74
<b>Tabela 4.1</b>	Caracterização da vinhaça utilizada neste trabalho	77
<b>Tabela 4.2</b>	Valores de velocidade específica de crescimento máxima, fator de conversão de ART em biomassa total e produtividade máxima em células para os cultivos CVinMel, CMel e CCon, realizados em biorreator.	90
<b>Tabela 5.1</b>	Resumo dos parâmetros obtidos nos cultivos de <i>C. necator</i> DSM 545 utilizando melaço ou vinhaça e melaço como fontes de carbono e resultados da literatura.	111
<b>Tabela 5.2</b>	Fatores de conversão obtidos nos cultivos realizados neste trabalho e em outros estudos.	112





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAc	Cultivo de crescimento de <i>C. necator</i> com o uso de melação hidrolisado por ácido.
CBio	Cultivo de crescimento de <i>C. necator</i> com o uso de melação hidrolisado por levedura.
CCon	Cultivo de crescimento de <i>C. necator</i> controle, com o uso de glicose e frutose.
CEnz	Cultivo de crescimento de <i>C. necator</i> com o uso de melação hidrolisado por enzima.
CMel	Cultivo de crescimento de <i>C. necator</i> com o uso de melação
CVinMel	Cultivo de crescimento de <i>C. necator</i> com o uso de mistura de vinhaça e melação
MM1	Primeiro meio mineral
MM2	Meio de cultivo final
NB	<i>Nutrient Broth</i> ou caldo nutriente
PE	Polietileno.
PHB	Polihidroxibutirato
PHBV	Polihidroxibutirato-hidroxivalerato
PMel	Cultivo de produção de PHB com o uso de melação.
PP	Polipropileno.
PVinMel	Cultivo de produção de PHB com o uso de vinhaça e melação.
SU	Unidade <i>Sumner</i> de atividade enzimática – quantidade de enzima que converter 1 mg de sacarose a glicose e frutose em 5 min na temperatura de 20°C e pH 4,5.



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu_{\max}$	Velocidade específica máxima de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_{\text{PHB}}$	Velocidade específica de produção de PHB ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
$\mu_{\text{Xr}}$	Velocidade específica de crescimento da biomassa residual ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_{\text{Xt}}$	Velocidade específica de crescimento da biomassa total ( $\text{h}^{-1}$ )
DO	Densidade óptica a 600 nm
PHB <sub>%</sub>	Acúmulo celular de PHB percentual (%)
$\text{Pr}_{\text{glob}}$	Produtividade global ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
$\text{Pr}_{\text{prod}}$	Produtividade em fase de produção ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
$\text{Pr}_{\text{Xt}}$	Produtividade em biomassa total ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
S	Concentração de substrato ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Xr	Concentração de biomassa residual ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Xr	Concentração de biomassa residual ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$\text{Xr}_{\text{prot}}$	Concentração de biomassa residual estimada pela concentração de proteínas ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Xt	Concentração de biomassa total ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$Y_{\text{PHB/S}}$	Fator de conversão de substrato em PHB ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$Y_{\text{Xr/N}}$	Fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$Y_{\text{Xr/S}}$	Fator de conversão de substrato em biomassa residual ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$Y_{\text{Xt/N}}$	Fator de conversão de nitrogênio em biomassa total ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$Y_{\text{Xt/S}}$	Fator de conversão de substrato em biomassa total ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
1.1	OBJETIVOS .....	29
1.1.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>29</b>
1.1.2	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>31</b>
2.1	OS POLÍMEROS E OS PLÁSTICOS .....	31
2.1.1	<b>Problemas ambientais ligados aos plásticos</b> .....	<b>31</b>
2.2	BIOPOLÍMEROS E BIOPLÁSTICOS .....	32
2.2.1	<b>O mercado dos biopolímeros</b> .....	<b>34</b>
2.3	POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA) .....	34
2.4	POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB).....	36
2.4.1	<b>Características principais do PHB</b> .....	<b>36</b>
2.4.2	<b>Aplicações atuais do PHB</b> .....	<b>38</b>
2.4.3	<b>PHB no Brasil e desafios</b> .....	<b>40</b>
2.5	PROCESSO DE PRODUÇÃO DO PHB .....	42
2.5.1	<b>Micro-organismo produtor <i>Cupriavidus necator</i></b> .....	<b>42</b>
2.5.2	<b>Métodos de condução de cultivos</b> .....	<b>44</b>
2.6	SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO .....	46
2.6.1	<b>Indústria sucroalcooleira no Brasil</b> .....	<b>47</b>
2.6.2	<b>Vinhaça</b> .....	<b>49</b>
2.6.2.1	<i>A vinhaça como matéria-prima para o PHB</i> .....	49
2.6.3	<b>Melaço de cana-de-açúcar</b> .....	<b>50</b>
2.6.3.1	<i>Melaço como substrato para produção de PHB</i> .....	52
2.7	HIDRÓLISE DA SACAROSE PRESENTE NO MELAÇO .....	53
2.7.1	<b>Hidólise ácida</b> .....	<b>53</b>
2.7.2	<b>Hidrólise enzimática</b> .....	<b>54</b>
2.7.3	<b>Hidrólise biológica</b> .....	<b>54</b>
2.8	BIOSSÍNTESE DE PHB POR <i>C. necator</i> .....	55

2.9	METABOLISMO EM <i>C. necator</i> DSM 545 EM DIFERENTES SUBSTRATOS .....	56
2.9.1	Metabolismo dos carboidratos.....	56
2.9.2	Metabolismo do glicerol.....	59
2.9.3	Metabolismo dos ácidos orgânicos voláteis.....	61
3	<b>DEFINIÇÃO DO PROCEDIMENTO DE HIDRÓLISE PARA O MELAÇO – ETAPA 1</b> .....	62
3.1	MATERIAL E MÉTODOS – ETAPA 1 .....	63
3.1.1	Melaço.....	63
3.1.2	Hidrólise do melaço.....	63
3.1.2.1	Hidrólise química com ácidos ( $H_2SO_4$ e HCl) .....	64
3.1.2.2	Hidrólise enzimática com invertase .....	64
3.1.2.3	Hidrólise biológica com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	64
3.1.3	Micro-organismo.....	65
3.1.4	Meios de cultura .....	65
3.1.5	<b>65</b>	
3.1.6	Condições de cultivo .....	66
3.1.6.1	Pré-culturas .....	66
3.1.6.2	Cultivos em incubadora rotatória.....	66
3.1.7	A mostragem.....	67
3.1.8	Métodos analíticos.....	67
3.1.8.1	Determinação de concentração da biomassa .....	67
3.1.8.2	Determinação de consumo de substrato .....	67
3.1.8.3	Determinação de sólidos solúveis ( $^{\circ}$ Brix).....	67
3.1.9	Parâmetros calculados .....	68
3.1.9.1	Análises do rendimento de hidrólise .....	68
3.1.9.2	Velocidades específicas máximas de crescimento .....	68
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO – ETAPA 1 .....	69
3.2.1	Ensaio para comparação do rendimento de hidrólise da sacarose do melaço.....	69

3.2.2	<b>Cultivos em incubadora rotatória.....</b>	<b>71</b>
3.3	CONCLUSÃO – ETAPA 1.....	75
<b>4</b>	<b>ESTUDO CINÉTICO COMPARATIVO DO</b>	
	<b>CRESCIMENTO DE <i>C. necator</i> EM MELAÇO E EM MISTURA</b>	
	<b>DE VINHAÇA E MELAÇO – ETAPA 2 .....</b>	<b>76</b>
4.1	MATERIAL E MÉTODOS – ETAPA 2.....	77
<b>4.1.1</b>	<b>Vinhaça .....</b>	<b>77</b>
4.1.1.1	<i>Preparo da vinhaça.....</i>	77
<b>4.1.2</b>	<b>Melaço .....</b>	<b>78</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Micro-organismo .....</b>	<b>78</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Meios de cultivo .....</b>	<b>78</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Condições de cultivo.....</b>	<b>78</b>
4.1.5.1	<i>Pré-culturas.....</i>	78
4.1.5.2	<i>Cultivos em biorreator .....</i>	79
<b>4.1.6</b>	<b>Determinações analíticas .....</b>	<b>79</b>
4.1.6.1	<i>Amostragem.....</i>	79
4.1.6.2	<i>Determinação da concentração da biomassa total.....</i>	80
4.1.6.3	<i>Determinação das concentrações de açúcares redutores totais, nitrogênio e proteínas.....</i>	80
<b>4.1.7</b>	<b>Tratamento de dados .....</b>	<b>80</b>
4.1.7.1	<i>Correções das concentrações.....</i>	80
4.1.7.2	<i>Cálculo da biomassa residual estimada (<math>X_{r_{prot}}</math>).....</i>	81
<b>4.1.8</b>	<b>Ajustes polinomiais .....</b>	<b>81</b>
4.1.8.1	<i>Velocidade específica máxima de crescimento celular (<math>\mu_{max}</math>).....</i>	81
4.1.8.2	<i>Produtividade em células (<math>Pr_{glob}</math>).....</i>	82
4.1.8.3	Fatores de conversão .....	82
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO – ETAPA 2 .....	83
<b>4.2.1</b>	<b>Perfil de crescimento dos cultivos em biorreator com</b>	
	<b>glicose e frutose –(CCon) e com melaço (CMel) .....</b>	<b>83</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Cultivo em biorreator com melaço e vinhaça (CVinMel)</b>	<b>85</b>

4.2.3	<b>Resultados comparativos.....</b>	<b>88</b>
4.3	CONCLUSÃO – ETAPA 2 .....	91
<b>5</b>	<b>ESTUDO CINÉTICO COMPARATIVO DO</b>	
	<b>DESEMPENHO DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PHB DE</b>	
	<b>C. NECATOR DSM 545 EM MELAÇO OU MISTURA DE</b>	
	<b>VINHAÇA E MELAÇO – ETAPA 3 .....</b>	<b>92</b>
5.1	MATERIAL E MÉTODOS – ETAPA 3 .....	93
<b>5.1.1</b>	<b>Meios de cultura .....</b>	<b>93</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Condições de cultivo .....</b>	<b>93</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Determinações analíticas .....</b>	<b>94</b>
5.1.3.1	<i>Determinação de glicose, frutose, glicerol, ácido láctico e ácido acético. ....</i>	94
5.1.3.2	<i>Determinação da concentração de PHB.....</i>	94
5.1.3.3	<i>Determinação de N total no melaço .....</i>	94
<b>5.1.4</b>	<b>Tratamento de dados .....</b>	<b>95</b>
5.1.4.1	<i>Correções das concentrações .....</i>	95
5.1.4.2	<i>Cálculo da concentração de biomassa residual (<math>X_r</math>).....</i>	95
5.1.4.3	<i>Cálculo da concentração de substrato total .....</i>	95
<b>5.1.5</b>	<b>Ajustes polinomiais .....</b>	<b>96</b>
5.1.5.1	<i>Velocidade específica máxima de crescimento celular (<math>\mu_{max}</math>).....</i>	96
5.1.5.2	<i>Velocidades específica instantâneas de crescimento celular e produção de PHB.....</i>	96
5.1.5.3	<i>Fatores de conversão .....</i>	97
5.1.5.4	<i>Produtividade global em PHB (<math>Pr_{glob}</math>).....</i>	97
5.1.5.5	<i>Produtividade em PHB em fase de produção .....</i>	97
5.1.5.6	<i>Acúmulo de PHB.....</i>	97
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO – ETAPA 3 .....	99
<b>5.2.1</b>	<b>Cultivo em biorreator com melaço (PMel) .....</b>	<b>99</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Cultivo em biorreator com mistura de vinhaça e melaço</b>	
	<b>103</b>	
<b>5.2.3</b>	<b>Resultados comparativos.....</b>	<b>107</b>



5.3	CONCLUSÃO – ETAPA 3.....	114
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES FINAIS.....</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>118</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>119</b>
	<b>APÊNDICE I .....</b>	<b>140</b>
	<b>APÊNDICE III .....</b>	<b>146</b>
	<b>APÊNDICE IV.....</b>	<b>148</b>
	<b>APÊNDICE V .....</b>	<b>149</b>
	<b>APÊNDICE VI.....</b>	<b>150</b>



# 1 INTRODUÇÃO

A busca pelo desenvolvimento de produtos com características e aplicações próximas às dos polímeros de origem fóssil tem crescido nas últimas décadas. O principal objetivo desses esforços é a redução do sério dano ambiental ligado a esses materiais não renováveis. Uma das grandes dificuldades que tais estudos encaram é desenvolver produtos com custo competitivo no mercado, o que é necessário para viabilizar sua produção em larga escala (ANJUM *et al.*, 2016). Portanto, o uso de substratos de baixo custo, culturas microbianas mistas, cepas recombinantes e o desenvolvimento de estratégias de cultivo eficientes têm sido estudados com o fim de viabilizar a produção dos biopolímeros (RODRIGUEZ-PEREZ *et al.*, 2018).

Dentre os materiais com potencial de substituição dos tradicionais polímeros fósseis constam os polihidroxicarboxilatos (PHA). O polihidroxibutirato (PHB), pertencente ao grupo dos PHA, é um poliéster de origem bacteriana que vem sendo estudado nas últimas décadas devido às suas características plásticas serem próximas às do polipropileno. Suas aplicações incluem a produção de embalagens plásticas para alimentos, têxteis, materiais plásticos descartáveis, dentre outros (KOLLER *et al.*, 2010; KOLLER; BRAUNEGG, 2018; RODRIGUEZ-PEREZ, 2018; SILVA; GOMEZ, 2007). Além disso, o PHB apresenta também as características de renovabilidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade, o que possibilita a sua utilização em produtos médicos e biomédicos de alto valor agregado como materiais para implantes, fármacos, cosméticos, dentre outros (YEO *et al.*, 2017).

Dentre as bactérias produtoras de biopolímero, destaca-se *Cupriavidus necator* DSM 545, capaz de acumular até 90% de sua massa celular em PHB e de utilizar diversas fontes de carbono, como glicose, frutose, glicerol, ácido láctico e ácido acético (DSMZ, 2018; MORINAGA *et al.*, 1978). Como alternativa, *C. necator* é capaz de utilizar subprodutos agroindustriais de baixo custo para a produção de PHB, como vinhaça e melaço de cana-de-açúcar (BAEI *et al.*, 2011; FARIAS, 2009; ZANFONATO 2016).

A vinhaça, resíduo da destilação na produção de álcool de cana-de-açúcar, é produzida na ordem de 300 bilhões de litros por ano no Brasil (USP, 2018). Frequentemente é utilizada como fertilizante, podendo causar danos ambientais quando depositada no solo (POSSIGNOLO *et al.*, 2015). Em processos biotecnológicos, a vinhaça pode ser utilizada como fonte de carbono, já que possui em sua

composição ácidos orgânicos e açúcares. Contudo, esses compostos estão presentes em baixas concentrações sendo necessário estratégias para que se atinjam produtividades e volumes de cultivo que viabilizem sua utilização em processos comerciais (MARTINHAGO *et al.*, 2014; SCHMIDT *et al.*, 2016). Dentre essas estratégias constam a utilização de substratos combinados (ZANFONATO, 2016; BOEIRA, 2018): utilizando-se a vinhaça simultaneamente com uma fonte de carbono com alta concentração, como por exemplo, o melão de cana-de-açúcar.

O melão, resíduo industrial da cristalização do açúcar, possui alta concentração de carbono fermentescível, além de alta disponibilidade e baixo custo. Cada tonelada de cana processada pela indústria sucroalcooleira no Brasil gera cerca de 40 a 60 kg de melão (BRASILEIROS, 2017). Assim, a utilização dos resíduos de forma combinada se apresenta como alternativa para a produção do PHB. A vinhaça, como demonstrado por Schmidt (2011) e Zanfonato (2016), promove uma alta velocidade de crescimento da bactéria, enquanto a fonte de carbono em maior concentração sustenta a produção do polímero.

Tendo em vista o exposto, buscou-se estudar as fases crescimento da bactéria e de produção do polímero a partir da combinação de vinhaça e melão de cana-de-açúcar, bem como a sua caracterização cinética em consumo de fontes de carbono, crescimento da biomassa e produção de PHB.

Este trabalho foi dividido em: 1. Introdução; 2. Revisão da literatura; 3. a 5. secções correspondentes às etapas empíricas deste estudo; 6. Conclusões finais; 7. Propostas para trabalhos futuro; 8. Referências bibliográficas; e 9. Apêndices. Cada um das secções, de 3. a 5., foi dividida em três subsecções: 1. Materiais e métodos; 2. Resultados e discussão; 3. Conclusão.

Na primeira etapa empírica, apresentada na secção 3., definiu-se o método de pré-tratamento hidrolítico da sacarose presente no melão a ser utilizado nos cultivos, visto que a cepa *C. necator* DSM 545 não é capaz de metabolizar esse dissacarídeo. Na secção 4. avaliou-se a cinética crescimento de *C. necator* DSM 545 em meios contendo melão puro e uma mistura de melão e vinhaça. E, por fim, na secção 5., a cinética de produção de PHB foi avaliada.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a cinética de crescimento e de produção de polihidroxibutirato (PHB) por *Cupriavidus necator* DSM 545, a partir de vinhaça e melão de cana-de-açúcar.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

I. Avaliar procedimentos de hidrólise química (HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), enzimática (invertase) e biológica (*Saccharomyces cerevisiae*) da sacarose presente no melão em termos de rendimento de hidrólise.

II. Avaliar a cinética de crescimento de *C. necator* DSM 545 em melão hidrolisado por métodos ácido, enzimático e biológico em agitador orbital.

III. Avaliar a cinética de crescimento de *C. necator* DSM 545 em biorreator com meio contendo melão ou melão e vinhaça.

IV. Avaliar a cinética de produção de PHB por *C. necator* DSM 545 em meio contendo melão ou melão e vinhaça.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 OS POLÍMEROS E OS PLÁSTICOS

Plástico, tem seu nome originário do grego *plastikos* que significa “capaz de ser moldado”. É um material obtido a partir de derivados do petróleo ou de fontes renováveis como a cana de açúcar ou milho. Esses materiais fazem parte da família dos polímeros que são formados por macromoléculas caracterizadas pela repetição múltipla de uma ou mais unidades químicas simples, os monômeros, sendo unidas entre si por reações químicas chamadas reações de polimerização (ABIPLAST, 2018).

Os materiais plásticos vêm sendo utilizados há muitos anos em substituição a diversos tipos de materiais como o aço, o vidro e a madeira devido às suas características de baixo peso, baixo custo, elevadas resistências mecânica e química, facilidade de aditivação e ainda por serem 100% recicláveis (ABIPLAST, 2018).

O consumo brasileiro *per capita* de plástico é de aproximadamente 35 kg/hab, enquanto países como EUA e Japão têm consumo *per capita* de quase 100 kg/hab. Em 2014 foram consumidas aproximadamente 2,7 milhões de toneladas de embalagens plásticas, sendo que 93% desse total são relativas às embalagens (ABIPLAST, 2018).

Atualmente, as matérias-primas dominantes para a produção de plástico são derivadas da indústria de combustíveis fósseis (HOTTLE; BILEC; LANDIS 2014).

#### 2.1.1 Problemas ambientais ligados aos plásticos

Devido ao fato de algumas aplicações dos plásticos serem de descartabilidade muito rápida, associado à grande dificuldade de degradação destes materiais no ambiente, os plásticos têm despertado grande preocupação. A produção mundial de lixo é de aproximadamente 2.000.000 ton·dia<sup>-1</sup>, ou 730.000.000 ton·ano<sup>-1</sup> (WALDMAN, 2009; ARAGÃO *et al.*, 2014). Em 2008, o consumo aparente de materiais plásticos somente em municípios no Brasil foi de 5.391 mil toneladas (IPEA, 2012).

A dificuldade de degradação não é o único dos grandes problemas associados ao uso desses materiais. A principal matéria-prima utilizada para sua produção constitui-se em um recurso não renovável, o petróleo. A incineração dos plásticos representa uma forma

de liberação de CO<sub>2</sub> na atmosfera muito mais rápida que a formação do petróleo, o processo compensatório. Assim, estamos diante de um sistema não cíclico, cujo resultado é o aumento da quantidade de CO<sub>2</sub> na atmosfera, através do fenômeno conhecido por efeito estufa. Embora ainda seja difícil prever todos os efeitos, e níveis de impacto, decorrentes do aumento na temperatura da Terra, é quase um consenso que a sociedade moderna deverá basear-se em sistemas cíclicos e equilibrados que causem alterações ao ambiente tanto menores quanto for possível (AQUARONE *et al.*, 1998; KAWAGUCHI; OGINO; KONDO, 2011; ARAGÃO, ARAGÃO; VELOSO, 2014)

Muitos países iniciaram estratégias e políticas objetivando superar esta preocupação global. A Alemanha e a Dinamarca foram os primeiros a banir o uso de sacolas plásticas na maioria das lojas de varejo nos anos 90. Subsequentemente, países na África, Ásia, Irlanda e o resto da Europa gradualmente introduziram proibições ou reforço do imposto sobre sacolas plásticas; o que contribuiu significativamente no consumo global. Para atingir a causa raiz da poluição ambiental, uma abordagem aceitável é a utilização de biopolímeros como substitutos para substituir os polímeros do petróleo, muito devido aos seus excelentes atributos eco-amigáveis (YEO, 2017).

Os biopolímeros oferecem uma alternativa renovável aos tradicionais plásticos originados do petróleo e podem ser derivados de diversas matérias-primas incluindo produtos agrícolas como grãos, resíduos agroindustriais ou de fontes alternativas como algas ou resíduos de alimentos. Fontes de carbono, como carboidratos, lipídios e proteínas, extraídos desse tipo de produto podem ser fermentados e convertidos a biopolímeros por diversos micro-organismos. Os biopolímeros oferecem a oportunidade de reduzir o consumo de recursos fósseis necessário para a produção de 21 milhões de toneladas de plástico anualmente consumidas para embalagens e bens não duráveis, assim como para o desvio de 16,7 milhões de toneladas de resíduos plásticos que iriam para aterros sanitários (HOTTLE; BILEC; LANDIS, 2013).

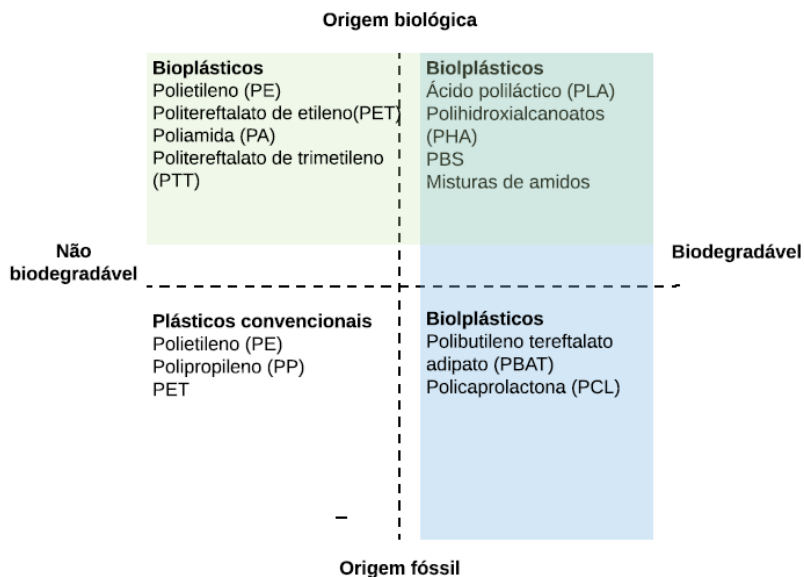
## 2.2 BIOPOLÍMEROS E BIOPLÁSTICOS

O desenvolvimento atual tem permitido identificar novos materiais que possuem propriedades termoplásticas e características de desempenho semelhantes às dos plásticos convencionais, mas que são mais facilmente degradados pela ação de micro-organismos no meio



ambiente, os plásticos biodegradáveis. A **Figura 2.1** apresenta um sistema de classificação de polímeros com base em sua biodegradabilidade e conteúdo produzido biologicamente. Um material é considerado biodegradável quando o mesmo é esgotado sob a influência de micro-organismos e condições específicas, sendo utilizado como fonte de alimento. Quando a assimilação microbiana completa da fonte de alimento fragmentada ocorre dentro de 180 dias em um ambiente composto, ele é considerado como compostável (WANG *et al.*, 2004; SCHNEIDER *et al.*, 2010; ASHTER, 2016).

**Figura 2.1** Sistema de classificação de materiais baseada em características de biodegradabilidade e conteúdo produzido biologicamente, adaptado de Plastics ZN (2018).



A definição de plásticos produzidos biologicamente é registrada na literatura do comitê *European Committee for Standardization* (CEN), o qual os define como os plásticos que sejam derivados de biomassa. Em geral, biomassa se refere aos materiais orgânicos biodegradáveis derivados de plantas, animais e micro-organismos e é considerada renovável. É importante compreender que a habilidade dos plásticos produzidos biologicamente de se degradarem não depende da sua fração

produzida biologicamente, mas da sua estrutura e propriedades físicas (HOTTLE; BILEC; LANDIS, 2013; ASHTER, 2016).

### 2.2.1 O mercado dos biopolímeros

Ao longo dos últimos anos, a produção de polímeros provindos de fontes renováveis, produzidos biologicamente ou não, apresentou significativo crescimento, mostrando-se como alternativa viável aos tradicionais plásticos de origem fóssil (HOTTLE; BILEC; LANDIS, 2013; KOLLER; BRAUNEGG, 2018). Alguns dos principais produtores de bioplásticos do mercado mundial são: Cargill's Nature Works, DuPont, Braskem (BAK), Toray Industries, Lanxess AG, Bayer, BASF e Eastman.

Atualmente, muitos estudos têm sido desenvolvidos no Brasil para produzir materiais biodegradáveis. Os polihidroxicanoatos (PHA), uma família particular de biopolímeros, têm recebido atenção especial (SANTOS, 2009; IENCZAK *et al.*, 2016; SILVA, 2016; BIOCYLE, 2018). Um dos biopolímeros mais promissores é o polihidroxibutirato (PHB), um PHA de cadeia curta, descoberto por Lemoigne nos anos de 1920 como reserva de carbono em vários micro-organismos como bactérias *Cupriavidus necator*, *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. (YEO, 2017).

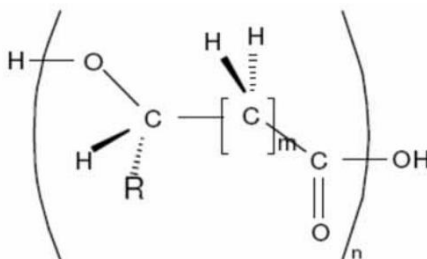
### 2.3 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)

Os polihidroxicanoatos, ou PHA, constituem um grupo diversificado de poliésteres, sendo acumulados por inúmeras bactérias como grânulos intracelulares. A função mais frequentemente atribuída a esses grânulos é a reserva de carbono e energia. A síntese de PHAs normalmente ocorre quando há excesso de fonte de carbono disponível e limitação de pelo menos um nutriente necessário à multiplicação das células do micro-organismo (N, P, Mg, Fe, etc) (AQUARONE *et al.*, 1998; KOLLER *et al.*, 2010). De modo contrário, quando há limitação de carbono ou energia, mas não de outros nutrientes, PHAs podem ser reutilizados para suprir esta necessidade (SEN; HUSSIN, BAIDURAH, 2019).

Os PHA são formados principalmente por ácidos hidroxialcanóicos insaturados e saturados. O monômero do PHA pode ser ácidos 3-hidroxialcanóico ramificados ou não ramificados ou terem suas cadeias laterais substituídas por ácidos 4- ou 5-hidroxialcanóico. Os PHA são *homo-*, *co-* e terpolímeros dependendo do tipo de monômero.

Uma ampla variedade de PHA com diferentes propriedades podem ser criadas de uma variedade de monômeros e com a variação do isomerismo constitucional (ASHTER, 2016). A **Figura 2.2** apresenta a fórmula química geral dos PHA.

**Figura 2.2** Fórmula química geral dos PHA (KOLLER, 2010). O valor de  $m$  pode variar de 1 a 3. Quando o grupo  $R$  for igual a  $H$ ,  $CH_3$ ,  $CH_2CH_3$ , para  $m=1$ , os PHA são classificados como PHA $_{scl}$  (*short chain length*), ou seja, compostos por monômeros de cadeia curta. Quando  $R = (CH_2)_2CH_3$  a  $(CH_2)_8CH_3$ , os monômeros são considerados de cadeia média, constituindo os PHA $_{mcl}$  (*medium chain length*)

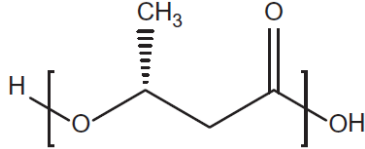


Dentre os PHAs, o polihidroxibutirato (PHB) e seu copolímero poli-3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato (PHBHV) foram os primeiros a despertar interesse científico, tecnológico e industrial em diversos países, pois, além de serem termoplásticos biodegradáveis (SCHNEIDER *et al.*, 2010), podem ser sintetizados por fermentação submersa a partir de matérias-primas renováveis (AQUARONE *et al.*, 1998; KOLLER *et al.*, 2017; SEN; HUSSIN; BAIDURAH, 2019).

## 2.4 POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)

O PHB é o um poliéster biológico de cadeia curta. Este polímero pertence a uma classe de interesse de materiais plásticos bioderivados e biodegradáveis (ASHTER, 2016). A estrutura química geral do PHB é apresentada na **Figura 2.3**.

**Fig 2.3** Estrutura química do PHB (YEO *et al*, 2017).



### 2.4.1 Características principais do PHB

No **Quadro 2.1** são apresentadas as principais características do PHB, conforme o apresentado por Koller *et al.* (2010), bem como as do copolímero PHBHV e do polipropileno (PP), de origem fóssil. É evidente a proximidade das características dos biopolímeros com as apresentadas pelo polímero fóssil. Tais características podem fazer do PHB um bom substituto do polipropileno em suas aplicações tradicionais, apresentando ainda vantagens de biodegradabilidade, renovabilidade.

**Quadro 2.1** Comparação de propriedades do PHB, PHBHV e PP, adaptado de Koller *et al.*, 2010). As faixas de propriedades apresentadas para o PHBHV correspondem a frações molares de 4 a 95% de HV.

<b>Propriedade</b>	<b>PHB</b>	<b>PHBHV</b>	<b>PP</b>
Massa molar ( $10^5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	1 – 8	3	2,2 - 7
Massa específica ( $\text{kg}\cdot\text{dm}^3$ )	1,25	1,20	0,905
Ponto de fusão ( $^{\circ}\text{C}$ )	171 – 182	75 – 172	176
Cristalinidade (%)	80	55- 70	70
Temperatura de transição vítrea ( $^{\circ}\text{C}$ )	5 a 10	-13 – 8	-10
*Permeabilidade a $\text{O}_2$ ( $\text{cm}^2\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ )	0,4	Não determinada	17
Resistência a UV	Boa	Boa	ruim
Resistência a solventes	Ruim	Ruim	Boa
*Força de tensão (MPa)	40	25 – 30	38
*Elongação à quebra (%)	6	8 – 1200	400
*Módulo de Young	3,5	2,9 (3% HV); 0,7 (25% HV)	1,7
Biodegradabilidade	Sim	Sim	Não

\* considerando-se filmes similares

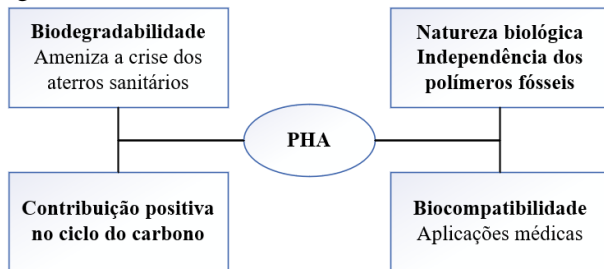
A regularidade estereo-química estrutural do PHB (**Figura 2.3**) leva a um homopolímero altamente cristalino, contribuindo para as suas propriedades mecânicas; alto módulo de elasticidade e força de tensão à quebra. Além disso, a sua estrutura lamelar contribui para propriedades de barreira superiores ao vapor d'água tornando-o aplicável para embalagens de alimentos (YEO *et al.*, 2017).

Devido às propriedades mencionadas acima, o PHB e PHBHV despertaram interesse industrial, e iniciativas para sua produção já foram implementadas em pelo menos cinco países: EUA, Inglaterra, Áustria, Alemanha, Holanda e Brasil (AQUARONE *et al.*, 1998; BIOCYCLE, 2018; BIOMER, 2018; BIOPOL, 2018; ONMNEXUS, 2018). Entretanto, um problema que ainda dificulta a produção industrial em larga escala do biopolímero é o alto custo da produção, no qual cerca de 40% é equivalente à matéria prima. Atualmente, o principal objetivo é

tornar o PHB economicamente viável e de fácil processo e manuseio. Portanto, a utilização de fontes de carbono de baixo custo ou mesmo resíduos de materiais orgânicos podem ser uma alternativa a curto prazo (SINGH, 2013; SINGH, 2016).

Segundo Koller *et al.* (2010), as principais vantagens do PHB são compartilhadas entre os PHA e podem ser resumidas conforme o apresentado na **Figura 2.4**.

**Figura 2.4** Principais vantagens dos PHA em relação aos polímeros fósseis, segundo Koller *et al.*, 2010.



Apesar de seus pontos positivos, o PHB apresenta impedimentos físicos que limitam sua competição com plásticos tradicionais. Tais impedimentos incluem, segundo Yeo *et al.*, 2017: a) o efeito de envelhecimento físico inerente, baseado na cristalização secundária que leva à fragilização; b) uma lenta taxa de cristalização e baixa densidade de nucleação promove a formação de grandes esferulitos o que facilita a rachadura e fratura, evidente pela baixa alongação na quebra; c) instabilidade térmica devido à estreita janela de processo térmico, onde o PHB se degrada através de cisão de cadeia aleatória na ligação éster na faixa de temperatura de 170-200°C; d) o alto custo de produção que limita sua competitividade em aplicações industriais e comerciais.

#### 2.4.2 Aplicações atuais do PHB

O PHB é um material versátil. Em decorrência de sua compatibilidade com sangue e tecidos de mamíferos, ele é usado como implante cirúrgico, em cirurgias como fios de sutura e vasos sanguíneos (IWATA *et al.* 2005; ZHANG; THOMAS, 2011; DONG *et al.*, 2013). O PHB é utilizado como microcápsulas em terapia ou como materiais para embalagem de células ou comprimidos (HUH *et al.*, 2014; VERGARA-PORRAS; GRACIDA-RODRIGUEZ; PÉREZ-GUERAVARA, 2016). O PHB é frequentemente utilizado na

embalagem de artigos de *deep draw* para a indústria de alimentos, por exemplo garrafas, folhas laminadas, redes de pesca, higiene, embalagens ou utensílios descartáveis (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2016; SEOANE *et al.*, 2016), lâminas agrícolas e fibras têxteis (ASHTER, 2016; YEO *et al.*, 2017). Alguns dos produtos PHB comerciais disponíveis no mercado constam apresentados no **Quadro 2.2**.

**Quadro 2.2** Empresas fabricantes de PHB. Adaptado de Ashter (2016), PAKALAPATI *et al.* (2018) e Jiang *et al.* (2016).

<b>Empresa e país</b>	<b>Características</b>	<b>Capacidade produtiva</b>
Biomer, Alemanha	-Produzido a partir de sacarose por <i>Alcaligenes latus</i> -Pellets são comercializados para processos clássicos de transformação de plásticos -Permite moldagem por injeção de peças de paredes finas -O tempo de compostagem é cerca de 2 meses	1.000 ton'ano <sup>-1</sup>
Danimer Scientific, Estados Unidos	-O polímero se degrada tanto anaerobicamente quanto aerobicamente, possui digestibilidade alcalina e boas propriedades de superfície para pintura -Pode ser produzido como fibras e não-tecidos, espumas, papéis sintéticos, filmes, artigos de injeção e moldagem por sopro.	Não declarado.
Metabolix, Estados Unidos	- Copolímero de PHB e PHBHV produzido a partir do milho. -Adaptado para injeção e moldagem por sopro, fibras, filmes, espumas, laminação e termoformagem, -Bom candidato para aplicações de embalagens de eletroeletrônicos devido às suas propriedades antiestáticas -Sensível à hidrólise apesar de seu alto grau de cristalinidade.	50.000 ton'ano <sup>-1</sup>
Tianjin Green Bio, China	-PHB produzido a partir de sacarose.	10.000 ton'ano <sup>-1</sup>
Tian'na, China	-PHB produzido a partir de milho	10.000 ton'ano <sup>-1</sup>
Kaneka, Japão	-Produzido a partir de sacarose	1.000 ton'ano <sup>-1</sup>
Biocycle PHB Industrial, Brasil	-Produção de PHB a partir de açúcares da cana-de-açúcar.	50 ton'ano <sup>-1</sup>

### 2.4.3 PHB no Brasil e desafios

O impulso em direção ao PHB ocorreu no início da década de 90, quando foi iniciado o projeto “Produção de plásticos biodegradáveis a partir de cana-de-açúcar, por via biotecnológica” (IPT, 1993) que foi desenvolvido em cooperação entre o Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), o Centro de Tecnologia da Copersucar e o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (este, associado à Universidade Federal da Paraíba, utilizando recursos do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Financiadora de Estudos e Projetos (PADCT – Finep) (SILVA; GOMEZ, 2007).

A partir deste projeto houve um estímulo ao estudo da produção de diversos plásticos biodegradáveis no país, com enfoques diversificados. Um grande esforço foi realizado e resultou no desenvolvimento de processo de produção de PHB e PHBHV, a partir da sacarose como fonte de carbono principal, que foi transferido para a empresa PHB Industrial S/A, havendo no momento diversos trabalhos de caracterização e aplicação dos PHA (SILVA; GOMEZ, 2007). Atualmente a marca Biocycle, da empresa PHB Industrial, possui uma planta piloto no município de Serrana, SP, com atual capacidade produtiva de 50 toneladas por ano, onde são realizados testes buscando a viabilidade da produção a nível industrial (BIOCYCLE, 2018).

Tanto este trabalho pioneiro, como aqueles desenvolvidos a partir de então, por outros grupos de pesquisa, direcionaram seus esforços para os seguintes temas-chave na produção de PHA: uso de substratos alternativos de baixo custo; obtenção de micro-organismos eficientes no acúmulo de PHA; aumento de produtividade por cultivo com alta densidade celular; busca de reatores alternativos e, adequação das características do produto pela modulação da massa molar (YEO *et al.*, 2017; KOLLER *et al.*, 2018).

Entre os grupos de pesquisa brasileiros, destaca-se o grupo do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, que tem se dedicado ao estudo de produção desse biopolímero por mais de 20 anos. Os trabalhos já publicados por esse grupo contribuem para o aumento substancial nos estudos sobre produção de PHA a partir de resíduos em todo o mundo. O **Quadro 2.3** apresenta alguns destes estudos. O aumento no número de publicações está relacionado com a necessidade de introduzir os bioplásticos no mercado com preços competitivos em relação aos plásticos de origem fóssil (RODRIGEZ-PEREZ *et al.*, 2018). Entre os



trabalhos realizados pelo grupo destacam-se também os estudos relacionados à forma de condução dos cultivos, modificação genética da cepa *C. necator* DSM 545 e a etapa de extração do polímero.

**Quadro 2.3** Trabalhos publicados pelo grupo de pesquisa em PHB do Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química (EQA) da Universidade Federal de Santa Catarina.

<p><u>Modificação genética de <i>C. necator</i> DSM 545</u></p> <p>Melhoramento no consumo de glicerol (ZANFONATO, 2016)</p>	<p><u>Utilização de substratos alternativos para a produção de PHA</u></p> <p>Soro de leite e açúcar invertido (MARANGONI, FURIGO, ARAGÃO, 2001)</p> <p>Melaço cítrico (FARIAS, 2009)</p> <p>Glicerol (APATI, 2012; ZANFONATO, 2016)</p> <p>Vinhaca (MARTINHAO <i>et al.</i>, 2014; ZANFONATO, 2016; BOEIRA, 2018).</p> <p>Glicerina (BOEIRA, 2018)</p>	<p><u>Estudos de estratégias de cultivo para a produção de PHA</u></p> <p>Produção e otimização (ARAGÃO, 1996; FIORESE, 2008)</p> <p>Suplementação com óleo de soja (SCHMIDT, 2011)</p> <p>Alta densidade celular (IENCZAK, 2011; IENCZAK, SCHMIDELL; ARAGÃO, 2013)</p> <p>Batelada sequencial com reciclo externo de células (SCHMIDT, 2015; IENCZAK <i>et al.</i>, 2016; SCHMIDT <i>et al.</i>, 2016)</p> <p>Glicerol e glicose combinados (GOULARTE, 2018)</p>
<p><u>Análise de viabilidade econômica da produção de PHA</u></p> <p>Produção de PHB com uso de melaço cítrico (PAVAN, 2015)</p>	<p><u>Extração e purificação de PHB</u></p> <p>Método mecânico (GARCIA, 2006)</p> <p>Enzimas (NEVES, 2009)</p> <p>Carbonato de propileno (FIORESE, 2008; QUINES, 2010)</p> <p>Carbonato de propileno combinado com métodos mecânicos (QUINES, 2015)</p>	
<p><u>Modelagem matemática do crescimento/produção</u></p> <p>Crescimento (FIORESE, 2008)</p> <p>Acúmulo de PHB (ZANFONATO, 2011)</p> <p>Crescimento a partir da velocidade de respiração (SCHMIDT <i>et al.</i>, 2015)</p> <p>Batelada sequencial com reciclo externo de células (SCHMIDT, 2015)</p>		

## 2.5 PROCESSO DE PRODUÇÃO DO PHB

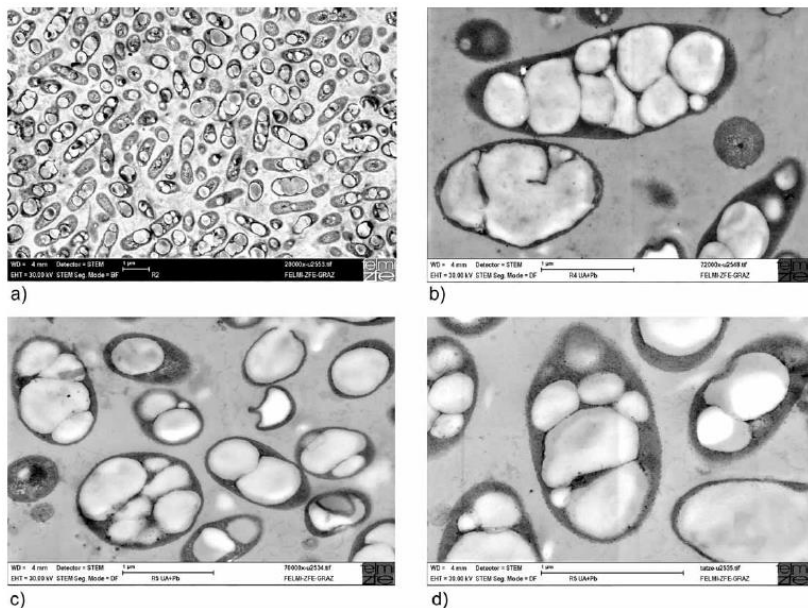
Nesta seção são abordadas algumas características do micro-organismo produtor de PHB utilizado neste trabalho, *Cupriavidus necator* DSM 545, bem como os métodos de condução de cultivo, alguns potenciais substratos para sua produção e o seu metabolismo frente aos principais compostos encontrados nestes substratos.

### 2.5.1 Micro-organismo produtor *Cupriavidus necator*

Sabe-se que mais de 300 diferentes micro-organismos são capazes de gerar PHAs como reserva natural de energia (ASHTER, 2016). Dentre os micro-organismos mais utilizados está *Cupriavidus necator*, também conhecida por *Wautersia eutropha*, *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus* ou *Hidrogenomonas eutropha*, o qual é um organismo potencial para a produção ótima de PHB.

*C. necator* é um organismo procarionte gram-negativo e aeróbio. Oxigênio e nitratos podem servir como aceptores finais de elétrons da cadeia respiratória. *C. necator* é capaz de crescer autotroficamente (assimilação de CO<sub>2</sub> via ciclo Calvin-Bensom-Basham) ou heterotroficamente. No crescimento, tem a forma de bastonetes de 0,5 por 1,8 até 2,6 µm. Sua temperatura ótima é 30°C. Pode-se encontrar *C. necator* naturalmente no solo e na água (HOLT *et al.*, 1994; GROUSSEAU, 2012). Na **Figura 2.5** são mostradas imagens de microscopia eletrônica das células de *C. necator* contendo o PHB, que é acumulado como reserva de energia.

**Figura 2.5** Células de *C. necator* contendo grânulos de PHB (KOLLER *et al.*, 2010). A ampliação e o acúmulo percentual de PHB são, respectivamente: a) 1:20.000 e 48%; b) 1:72.000 e 65%; c) 1:70.000 e 69%; c) 150.000 e 69%.



Dentre os produtores de PHB, *C. necator* é um dos que apresenta melhores condições para produção industrial. Esta bactéria destaca-se pela capacidade de acumular mais de 80% de sua massa seca em polímero, com alta massa molar e utilizando diferentes tipos de substrato como glicose, frutose, ácidos orgânicos dentre outros (RAMSAY, 1994, GROUSSEAU, 2012).

Existem substratos orgânicos que podem ser assimiladas por *Cupriavidus* como os ácidos orgânicos, ácidos graxos de cadeia longa derivado de óleos (petróleo, mamona, palma, oliva, girassol), compostos aromáticos como fenol e benzoato, porém poucos carboidratos (GROUSSEAU, 2012). Esta cepa selvagem não é capaz de assimilar a glicose, e a cepa utilizada para este estudo, DSM 545, adquiriu por mutação espontânea essa capacidade (ZANFONATO, 2016).

## 2.5.2 Métodos de condução de cultivos

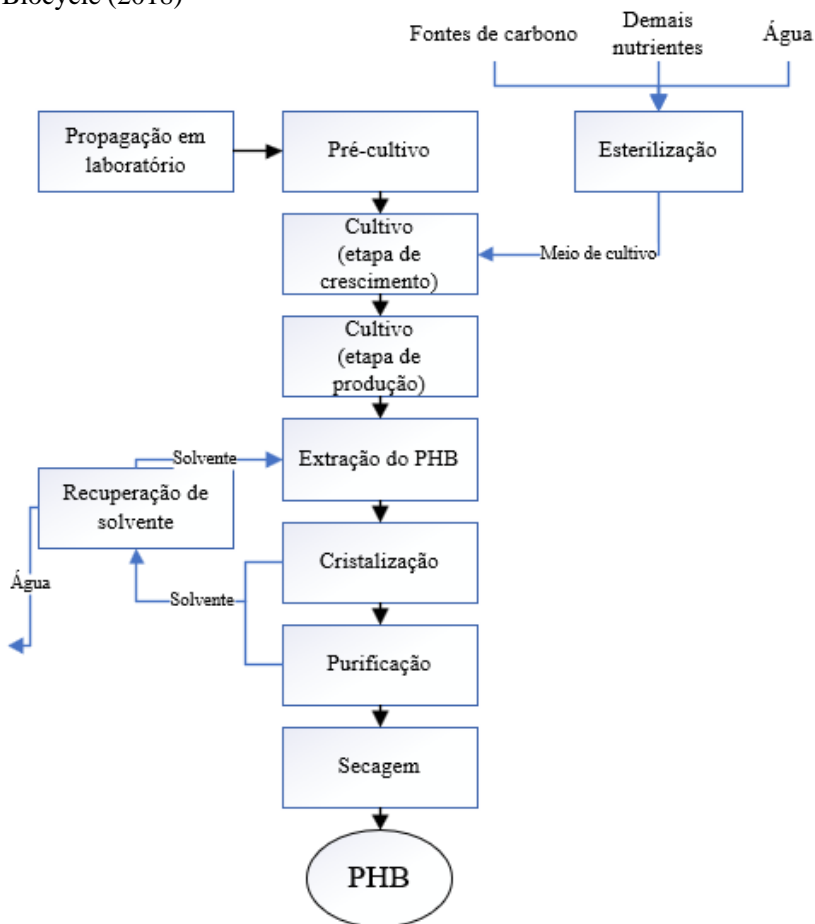
Os processos em batelada alimentada são os mais utilizados para a produção de PHB. Processos contínuos têm sido avaliados em escala laboratorial (KOLLER *et al.*, 2010; KOLLER *et al.*, 2017; RODRIGUEZ-PEREZ *et al.*, 2018). Os processos em batelada alimentada permitem facilmente a imposição da limitação de nutrientes necessária para a produção do PHA, além de possibilitar a utilização de substratos que possuam efeito inibitório a partir de determinadas concentrações, como o ácido láctico e o acético (GROUSSEAU, 2012).

O processo contínuo, em um estágio, para a produção de PHB requer a multiplicação celular e não parece, à primeira vista, ser o melhor modo de produção já que para a maioria dos micro-organismos produtores de PHB as fases de crescimento e de produção ocorrem em momentos distintos (BAEI *et al.*, 2011). Para encarar esta limitação, é necessário proceder com culturas contínuas em um primeiro reator para a produção de biomassa com alta taxa de diluição, e então, nos reatores subsequentes, uma fase de produção que possa ocorrer a alta velocidade específica. Portanto, processos contínuos tornam possível atingir produtividades altas e constantes.

A produção de PHB é um processo complexo. Nela, a qualidade final e quantidade (rendimento) do produto dependem da cepa, rota metabólica, parâmetros de cultivo, fase de produção do PHB (associada ou não ao crescimento), fontes de carbono e condições de esgotamento de nutrientes (BAEI, *et al.*, 2011). Modelos cinéticos úteis para a produção de PHB têm sido implementados, incluindo o crescimento da biomassa (densidade celular), produção de produtos, utilização de substrato simples e fontes limitadas de nutrientes (BAEI, *et al.*, 2011; ZANFONATO *et al.*, 2011).

A **Figura 2.6** apresenta um fluxograma do processo de fabricação do PHB. O PHB pode ser produzido a partir de diferentes fontes de carbono (sacarose, glicose e frutose, por exemplo) (ASHTER, 2016; BIOCYCLE, 2018).

**Figura 2.6** Diagrama de um processo de produção de PHB, adaptado de Biocycle (2018)



A produção de PHB por *C. necator* é realizada em duas etapas. Nesse tipo de processo, há, primeiramente, a fase de crescimento celular, na qual ocorre a multiplicação celular até a exaustão do elemento limitante; e a fase de produção de biopolímero, na qual são formadas quantidades expressivas de PHB (PAKALAPATI *et al.*, 2018).

Na fase de crescimento celular, as células continuamente se multiplicam, sob excesso de C, N e oxigênio, até atingirem uma concentração celular considerada ideal para o início da etapa de acúmulo

de biopolímero. Neste ponto, o PHB ocorre como discretos grânulos (com diâmetro de 0,3 a 1,0  $\mu\text{m}$ ) em células como um material de estocagem. Quando é imposta a limitação nutricional é iniciada a fase de produção de biopolímero. No final do cultivo as células podem possuir mais de 80% de sua massa seca na forma de PHB (ASHTER, 2016).

O pós-processamento constitui uma parte chave do processo de produção de PHA. Após a biossíntese do poliéster e separação da biomassa celular (normalmente por centrifugação, sedimentação, floculação ou filtração), o processo necessário para a recuperação do PHA constitui outro fator de custo não negligenciável, especialmente em produção em larga escala. A escolha do método adequado para a separação dos PHA a partir da biomassa residual é dependente de diversos fatores como a cepa produtora, a pureza necessária do produto, a disponibilidade dos agentes de isolamento e o impacto aceitável sobre a massa molar. Principalmente, três diferentes estratégias são descritas por Koller *et al.* (2010) para o isolamento de PHAs: a) extração direta da biomassa de PHA (métodos solventes – antisolvente; PHA é dissolvido intermediariamente); b) digestão química ou enzimática do material celular não-PHA (os grânulos PHA são liberados, não há dissolução intermediária do PHA); c) ruptura das células de micróbios osmofílicos em meio hipotônico (grânulos PHA são liberados, não há dissolução intermediária do PHA).

## 2.6 SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO

Os cálculos de custo-benefício demonstram que os custos de produção de PHA, somada a de equipamentos e tecnologia *downstream* são decorrentes principalmente dos custos da matéria prima. A razão para isso é que a produção de PHA em escala industrial atualmente depende de substratos de alto custo com relevância nutricional, como glicose, amido e óleos comestíveis. Assim, a utilização de substratos de baixo custo é uma estratégia para melhorar a competitividade do PHB com os polímeros fósseis (KOLLER; BRAUNEGG, 2018). Dentre esses constam resíduos agroalimentares, industriais e de plantas de tratamento de resíduos (RODRIGUEZ-PEREZ, 2018).

Diversos substratos de baixo custo têm sido utilizados para a produção de PHB, podem ser citados eles: glicerina bruta (APATI, 2012; BOEIRA, 2018), melão cítrico (FARIAS, 2009; UFSC, 2010), vinhaça de cana-de-açúcar (MARTINHAGO *et al.*, 2014; ZANFONATO, 2016), melão de cana-de-açúcar (KULPRECHA *et*

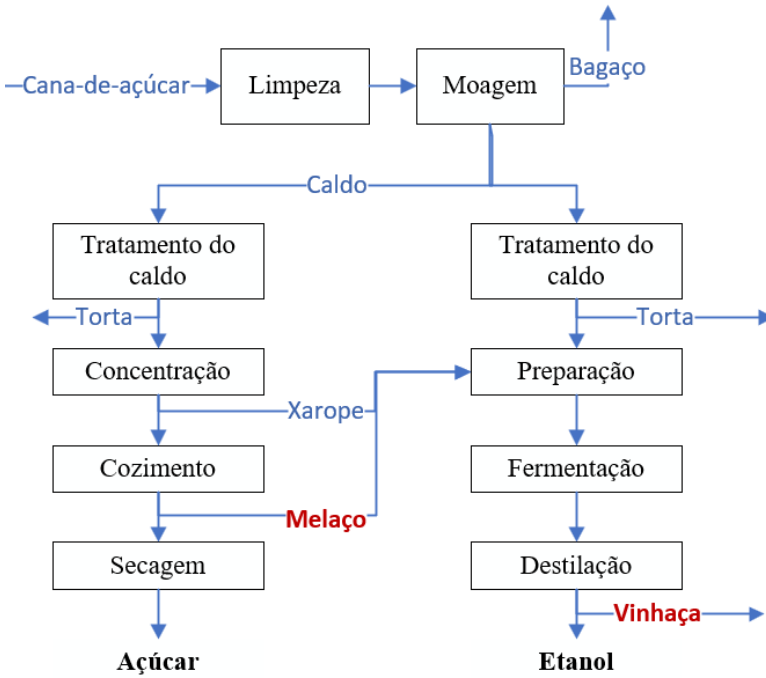
*al.*, 2009; BAEI *et al.*, 2011; SEN; HUSSIN; BAIDURAH, 2019), torta de babaçu e de soja (OLIVEIRA, FREIRE, CASTILHO, 2004), soro de leite (MARANGONI *et al.*, 2001), raiz de chicória (HAAS *et al.*, 2015), farelo de arroz, torta de óleo, farelo de trigo, palha de arroz (KRISHNAN *et al.*, 2017). águas residuárias acidificadas (RUAN; CHEN; LUN *et al.*, 2003) e até resíduos de alimentos (HAFUKA *et al.*, 2011).

### **2.6.1 Indústria sucroalcooleira no Brasil**

Entre os anos de 2011 e 2012, o Brasil passou a ser reconhecido como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, tendo processado 559 milhões de toneladas, sendo que, no total produzido, 51,6% deram origem ao etanol, e os 48,4% restantes transformados em açúcar. Na safra de 2017/2018 foram produzidas 37,70 milhões de toneladas de açúcar e 27,78 milhões de m<sup>3</sup> de etanol (BRASIL, 2018).

A **Figura 2.7** apresenta o processo tradicional utilizado para a produção de açúcar e etanol a partir de cana-de-açúcar. Como observado, há pelo menos três subprodutos desse processo que são explorados em bioprocessos. O bagaço da cana-de-açúcar que é utilizado para a geração de eletricidade, sendo que em março de 2012, esse tipo de energia correspondia a 5,8% da matriz elétrica do Brasil (POSSIGNOLO *et al.*, 2015), além de todos os esforços realizados para a produção de etanol de segunda geração com esse resíduo em escala comercial (CALIL NETO; GUIMARÃES; FREIRE; 2018). E por fim, o melaço e a vinhaça, que são os subprodutos a serem explorados nesse trabalho para a produção de PHB.

**Figura 2.7** Processo de produção de açúcar com destilaria anexa para a produção etanol a partir de cana-de-açúcar. Adaptado de UDOP (2018).





## 2.6.2 Vinhaça

A vinhaça, também chamada de vinhoto, restilo, garapão, dentre outras nomeclaturas regionais, é um resíduo líquido gerado pela destilação do mosto alcoólico no processo de produção de etanol. A vinhaça possui pH entre 3,5 e 5, alta carga orgânica e apresenta coloração marrom escura devido à presença de melanoidinas, além de um odor característico. Sua composição é bastante variável, e em geral se encontram nutrientes como o nitrogênio (até  $4,5 \text{ gL}^{-1}$ ), fósforo (até  $3,0 \text{ gL}^{-1}$ ) e potássio (até  $17,5 \text{ gL}^{-1}$ ) (HOARAU *et al.*, 2018).

Com o avanço na produtividade de cana-de-açúcar e o estímulo ao cultivo que o governo federal impôs na década de 80 por causa do aumento da produção de álcool, houve então um acréscimo na geração de vinhaça, sendo que para cada litro extraído do mesmo, eram produzidos de 10 a 18 litros de vinhaça (POSSIGNOLO *et al.*, 2015).

A principal aplicação da vinhaça é no solo, devido à sua composição. Quando aplicada no solo, a vinhaça pode trazer melhorias na fertilização das plantações. É fundamental que seja adicionada adequadamente considerando-se, dentre outros fatores, a composição mineral e orgânica do solo, para que não ocorram impactos ambientais (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013; POSSIGNOLO *et al.*, 2015).

O uso inadequado da vinhaça pode provocar uma série de efeitos negativos como a salinização do solo seguida de desestabilização estrutural do terreno, perdas na atividade microbiana e acidificação permanente do solo e dos recursos hídricos (FUES, GARCIA, ZAIAT, 2018). Com o aumento da poluição, o lançamento da vinhaça foi proibido no Brasil, como consta na portaria n° 323/1978 (CETREL, 2011).

Os potenciais da vinhaça têm atraído pesquisadores. Existem estudos que demonstram a sua aplicação na geração de bioenergia (FUESS; GARCIA; ZAIAT, 2018), produção de fungos (LAIME *et al.*, 2011) e como matéria-prima para a produção de ração para aves (ROBERTIELLO, 1982).

### 2.6.2.1 A vinhaça como matéria-prima para o PHB

Poucos estudos que utilizaram a vinhaça como substrato para a produção de PHB foram publicados até então (PRAMANIK *et al.*, 2012; MARTINHAGO *et al.*, 2014; ZANFONATO, 2016; BOEIRA, 2018). Percebe-se que a utilização da vinhaça com essa função é uma alternativa de aplicação que agrega valor a este coproduto e é ambientalmente amigável.

Pramanik *et al.* (2012) produziram PHB pela arqueobactéria halofílica extremófila *Haloarcula marismutui* em incubadora rotatória. A utilização deste tipo de bactéria se destaca pelo menor risco de contaminação, o que reduz os custos de produção, e da simplificação do processo de extração. Apesar disso, o cultivo apresentou uma fase lag extensa (144 h), o que agrega maiores custos ao processo. Além disso, foi relatado que diluições da vinhaça bruta a partir de 25% no meio de cultivo causaram a inibição do crescimento de *H. marismutui*. Porém, o pré-tratamento com carvão ativado foi suficiente para evitar o efeito inibitório em concentrações de até 100% de vinhaça. O cultivo utilizando vinhaça pura pré-tratada com carvão ativado atingiu  $15 \pm 0,35 \text{ gL}^{-1}$  de biomassa total,  $4,5 \pm 0,2 \text{ gL}^{-1}$  de PHB, acúmulo de PHB de  $30 \pm 0,3\%$ .

Zanfonato (2016) avaliou a produção de PHB por *Cupriavidus necator* DSM 545 em vinhaça pura como único substrato, sendo obtida uma baixa concentração de PHB ( $2,2 \text{ gL}^{-1}$ ). Porém um dos resultados de destaque do trabalho citado, é o aumento da velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\text{max}}$ ) na presença da vinhaça do meio de cultivo. Tanto o cultivo com vinhaça pura ( $0,26 \text{ h}^{-1}$ ) ou combinada com glicose ( $0,19 \text{ h}^{-1}$ ), mostraram valores de  $\mu_{\text{max}}$  superiores ao cultivo contendo apenas glicose ( $0,16 \text{ h}^{-1}$ ), sendo esse efeito atribuído à presença de ácido acético e láctico na vinhaça.

Boeira (2018) comparou o crescimento de *C. necator* glpFK, (*C. necator* DSM 545 modificada geneticamente, por Zanfonato (2016), para o consumo de glicerol em maior velocidade), em meios contendo a combinação da vinhaça e glicerol, vinhaça e glicerina refinada e vinhaça e glicerina bruta. Os cultivos em biorreator de 5 L demonstraram que os substratos combinados apresentaram resultados similares. Porém, o efeito da vinhaça sobre  $\mu_{\text{max}}$  também pode ser observado, em que os cultivos com vinhaça pura promoveram uma velocidade máxima de crescimento de  $0,40 \text{ h}^{-1}$ , enquanto os com glicerol atingiram  $0,11 \text{ h}^{-1}$ . Nos cultivos com o uso de glicerina refinada e bruta houve acúmulo de 31% e 50% de PHB em relação à massa celular, respectivamente. O melhor cultivo foi o com o uso de glicerina bruta e vinhaça em batelada alimentada, o qual atingiu a produtividade de  $0,22 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  e um acúmulo de 64% de PHB.

### 2.6.3 Melaço de cana-de-açúcar

Denominam-se melaços os resíduos da fabricação de açúcar que não são mais utilizados para a separação da sacarose. Eles se originam

nas usinas de açúcar, pela centrifugação das massas cozidas para a separação dos cristais de açúcar (AQUARONE *et al.* 1998; SAHU, 2018).

Cerca de 18 milhões de toneladas de melaço de cana-de-açúcar são produzidos por ano no Brasil pelo setor sucroalcooleiro. Por seu baixo custo, alta disponibilidade e alto teor de açúcares fermentescíveis, esta matéria-prima vem sendo empregada como substrato para diferentes tipos de fermentação. A produção de álcool etílico é sua principal aplicação (OLIVEIRA *et al.*, 2009; SAHU, 2018).

A composição do melaço varia de acordo com o processo de produção do açúcar. A presença de outros compostos como nitrogênio, compostos nitrogenados e alguns minerais torna esse subproduto, um substrato interessante na área de bioprocessos para a produção de diversos produtos. A **Tabela 2.4** apresenta algumas composições determinadas em estudos anteriores.

**Tabela 2.4** Composição do melaço de cana-de-açúcar. O símbolo “-” indica valores não determinados.

Componente	Referência		
	SOUKOULIS; TZIA (2018)	JUNG <i>et al.</i> (2013)	TECLU <i>et al.</i> (2009)
Carboidratos totais (%)	69,69	56,02	-
Açúcares redutores totais (%)	59,0	-	-
Sacarose (%)	-	-	35
Glicose (%)	-	-	7
Frutose (%)	-	-	9
Proteínas (%)	2,0	-	-
Gorduras (%)	0,0	-	-
Umidade (%)	28,3	-	20
Nitrogênio (%)	-	0,5 a 1,5	-
Compostos nitrogenados (%)	-	-	4,5
Ácidos não nitrogenados (%)	-	-	5
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (g 100g <sup>-1</sup> )	-	0,1 a 0,4	-
Potássio (mg 100g <sup>-1</sup> )	1470	-	-
Sódio (mg 100g <sup>-1</sup> )	60	-	-
Fósforo (mg 100g <sup>-1</sup> )	80	-	-
Magnésio (mg 100g <sup>-1</sup> )	140	-	-
Cálcio (mg 100g <sup>-1</sup> )	500	-	-
Ferro (mg 100g <sup>-1</sup> )	9,0	-	-

### 2.6.3.1 Melão como substrato para produção de PHB

O processo de produção de PHB com o uso de melão como matéria-prima é conhecido desde o início da década de 1990 (IPT, 1993) no Brasil. Apesar disso, raros são os estudos nacionais publicados sobre o assunto, possivelmente em decorrência do desenvolvimento ser realizado por empresas privadas e as informações, assim, serem mantidas em sigilo.

Além do alto teor de açúcares, o melão de cana contém fatores de crescimento essenciais (cálcio, fósforo, biotina, niacina e riboflavina) em traços (ppm), mas carece em minerais essenciais como cobalto e selênio, os quais aumentam a atividade da enzima PHB sintase (TRIPATHI; SRIVASTAVA; SINGH, 2017).

Sen, Hussin e Baidurah (2019) estudaram o efeito de diferentes pré-tratamentos hidrolíticos do melão de cana-de-açúcar sobre o crescimento e produção de PHB de *C. necator* em incubadora rotatória. Foram avaliados os tratamentos: hidrotérmico ácido em estufa; hidrotérmico ácido em banho de óleo; ácido; além do melão não pré-tratado e um controle contendo glicose como fonte única de carbono. O cultivo com glicose apresentou os melhores resultados quanto à produção de PHB. O acúmulo chegou a ser 3,5 vezes maior que o cultivo em melão não tratado e 2,1 vezes maior que o cultivo com melão pré-tratado em estufa.

Sivakumar, Shree e Panali (2017) avaliaram a produção de PHB por *Streptomyces* sp. isoladas de sedimentos do solo. Os cultivos, realizados em incubadora rotatória, utilizaram substratos naturais pré-tratados como fonte de carbono: palha de trigo, farelo de trigo, farelo de arroz, melão de cana de açúcar e torta de óleo. Os cultivos com melão de cana atingiram  $11,2 \pm 0,02 \text{ gL}^{-1}$  de biomassa total,  $0,89 \pm 0,05 \text{ gL}^{-1}$  de PHB e 7,49% de acúmulo de PHB. O que indica que mais estudos seriam necessários para otimização das condições de cultivo e maiores rendimentos em PHB.

Tripathi, Srivastava e Singh (2013) realizaram um estudo da otimização da produção de PHB por *Alcaligenes* sp. a partir de melão de cana-de-açúcar em incubadora rotatória utilizando delineamento experimental composto central rotacional de três fatores e cinco níveis. A temperatura, pH e velocidade de agitação foram os fatores considerados e suas condições otimizadas em  $34,43^\circ\text{C}$ , pH 6,54 e velocidade de agitação em 187,8 rpm, respectivamente, as quais promoveram um acúmulo de 76,80%, próximo ao predito: 77,78%. O experimento na condição otimizada foi realizado em batelada em um

biorreator de 7,5 L, no qual biomassa atingida foi de  $11,0 \pm 0,5 \text{ gL}^{-1}$  e a concentração de PHB foi  $8,58 \text{ gL}^{-1}$ , após 48 h de cultivo. Segundo os autores, fatores de crescimento, como ácidos orgânicos, vitaminas e minerais presentes no melão seriam responsáveis por induzirem um aumento na produção de biomassa e PHB.

## 2.7 HIDRÓLISE DA SACAROSE PRESENTE NO MELAÇO

Como já descrito anteriormente, *C. necator* DSM 545 é capaz de metabolizar glicose e frutose, mas não sacarose, como fonte de carbono. Nesse caso, para que todo o açúcar presente esteja disponível, o melão precisa ser pré-tratado antes de ser utilizado como substrato. Em geral, métodos químicos, enzimáticos e combinados são utilizados para converter dissacarídeos em monossacarídeos podendo ser usados como fonte de carbono por micro-organismos. Apesar da hidrólise ácida fornecer índices de conversão elevados e ser utilizada industrialmente, a hidrólise enzimática ainda é mais vantajosa e indicada em processos fermentativos por não gerar compostos indesejáveis (OLIVEIRA; BUZATO; HAULY, 2005; AZIZI; NAJAFPOUR; YOUNESI, 2017). A seguir, é apresentada uma breve descrição dos tipos de hidrólises que podem ser usados na conversão da sacarose presente no melão em monossacarídeos (glicose e frutose).

### 2.7.1 Hidólise ácida

A hidrólise ácida caracteriza-se por envolver soluções diluídas de ácidos fortes como ácido sulfúrico e clorídrico, e condições operacionais severas de pH e temperatura ( $1 < \text{pH} < 2$ ;  $100 < \text{Temperatura} < 150^\circ\text{C}$ ). Devido às suas características, a hidrólise ácida tem sua aplicação comercial restringida na indústria alimentícia, pois o uso de catalisadores ácidos acarreta alterações no sabor e na cor dos alimentos, devido às reações paralelas de escurecimento, produção de subprodutos indesejáveis e desnaturação de proteínas (SANTIAGO, 2002; ROMÃO, 2011).

Os métodos químicos de hidrólise, usados também em resíduos da agroindústria para obtenção de açúcares fermentescíveis, são geralmente citados como métodos rápidos, porém esbarram em questões como necessidade de neutralização do meio, o que pode gerar precipitados, corrosão de equipamentos e dificuldade de recuperação dos solventes (PRADO *et al.* 2016). Outro inconveniente do uso do pré-

tratamento do bagaço de cana, por exemplo, com hidrólise ácida é a formação de coprodutos inibitórios, os quais podem afetar o desempenho ao usarem-se hidrolisados. O hidroximetilfurfural (HMF) é um desses coprodutos (LOPES *et al.* 2014), o qual podem ser formado também na hidrólise do melão.

Romão *et al.* (2012), verificaram que a condição de hidrólise ácida utilizada em melão de soja (coproduto da extração de proteínas de soja, contendo até 57% de açúcares) produziu quantidade de furfural suficiente para ocasionar uma leve inibição na produção de etanol por *S. cerevisiae*. Portanto, ainda que em concentrações baixas, esses compostos podem ter efeito sobre os micro-organismos, bem como sobre o crescimento de *C. necator*, como já demonstrado na literatura para aldeídos, furfural e HMF (WANG; YIN; CHEN *et al.*, 2014).

### 2.7.2 Hidrólise enzimática

A beta-fructofuranosidase, comumente chamada invertase, sacarase ou sucrase catalisa a hidrólise de sacarose a glicose e frutose, pelo desprendimento do resíduo L-D-fructofuranosídeo não redutor (KULSHRESTHA *et al.* 2013; PANDEY; SINGHANIA, 2008)

A invertase nível alimentar utilizada na *National Enzyme Company* é obtida pela fermentação controlada de *Saccharomyces cerevisiae* e é caracterizada por sua habilidade de catalisar a inversão de soluções de sacarose. Essa enzima catalisa a hidrólise da sacarose em seus componentes D-frutose e D-glicose. A invertase é usada amplamente para a produção de diversos produtos de confeitaria e açúcares invertidos assim como um auxiliar digestivo (EEI, 2018).

### 2.7.3 Hidrólise biológica

A hidrólise biológica corresponde ao uso direto das células de *S. cerevisiae* no meio a ser hidrolisado. Poucos trabalhos relatam essa técnica, onde a autólise das células é empregada para obtenção do extrato contendo enzimas intracelulares com atividade suficiente para hidrolisar a sacarose (EMÍDIO, 2016; MIRZAEI *et al.*, 2015; STOLZ, 2005).

Stolz *et al.* (2005) compararam os métodos de hidrólise usando a enzima livre e as células de leveduras autolisadas, atingindo rendimentos muitos próximos. Segundo os autores, o procedimento deve ocorrer em meio contendo altas concentrações de açúcar, o que aumenta a pressão osmótica do meio levando a célula a autólise. Além disso, a temperatura deve ser levemente elevada para evitar a fermentação.

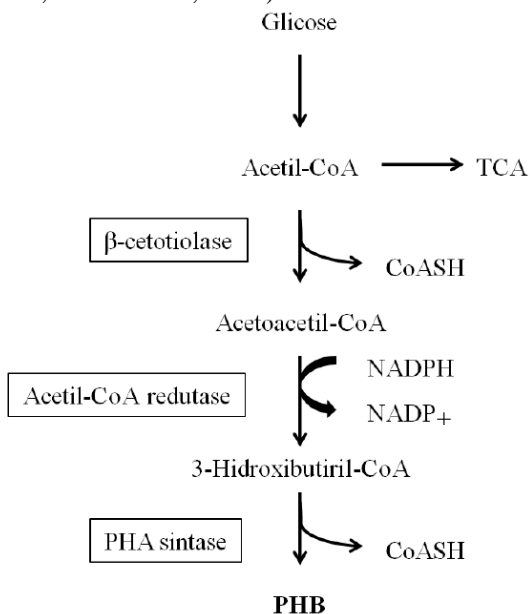
Emídio (2016) usou procedimento similar para produzir melados a partir de açúcar cristal e caldo de cana-de-açúcar atingindo o nível desejado de açúcares redutores no produto a fim de evitar a cristalização, concluindo ser este um método de baixo custo.

## 2.8 BIODISSÍNTESE DE PHB POR *C. necator*

O acúmulo de PHA é uma resposta inerente às condições de *stress* encaradas pelas células bacterianas. Tais condições são geradas *in vitro* pela exposição da bactéria a limitações de nutriente, pela qual elas trocam suas rotas metabólicas e causarão a produção de PHA como suas fontes de carbono e energia (ASHTER, 2016).

A via metabólica mais estudada para a produção de PHB é aquela encontrada em *C. necator*, e que é muito semelhante à via metabólica que leva à síntese de PHB em diversas bactérias.

**Figura 2.8** Via metabólica de síntese de PHB a partir de glicose (MADISON; HUISMAN, 1999).



Na síntese de PHB a partir de acetil-CoA (um intermediário entre as vias de degradação de carboidratos e o ciclo de Krebs) estão

envolvidas três enzimas.  $\beta$ -*acetotiolase* catalisa a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, formando uma molécula de acetoacetil-CoA; esta, por sua vez, é reduzida a D(-)-3-hidroxi-butiril-CoA numa reação estereoespecífica catalisada pela enzima 3-cetoacil-CoA redutase NADPH dependente. O último passo compreende a polimerização da unidade D(-)-3-hidroxi-butiril-CoA a um polímero em crescimento, numa reação catalisada pela enzima PHA sintase (PHILIP, KESHAVARZ, ROY, 2007; AQUARONE *et al.*, 1998).

A enzima-chave para a regulação dessa via metabólica é a  $\beta$ -*acetotiolase*. Essa enzima compete com outras enzimas pelo acetil-CoA em diferentes rotas metabólicas é inibida quando há presença de alta concentração de CoA livre, a qual é produzida no ciclo do ácido tricarbóxico durante a respiração das células. Quando algum nutriente se torna limitante à multiplicação da bactéria, a demanda por acetil-CoA diminui, e com isso todos os níveis de CoA livre se tornam reduzidos, diminuindo a inibição sobre a  $\beta$ -*acetotiolase* e desencadeando a síntese de PHB (AQUARONE *et al.*, 1998).

## 2.9 METABOLISMO EM *C. necator* DSM 545 EM DIFERENTES SUBSTRATOS

Nesta seção é apresentada uma pequena revisão referente ao metabolismo da *C. necator* DSM 545 frente a diferentes substratos, visto que neste trabalho são usados substratos complexos com a presença de carboidratos, glicerol e ácidos orgânicos.

### 2.9.1 Metabolismo dos carboidratos

Cepas selvagens de *C. necator* não são capazes de assimilar glicose, manose e ribose, mas são capazes de usar a frutose. Aparentemente a célula é capaz de oxidar a glicose intracelular, mas não possui sistema de transporte (GROUSSEAU, 2012).

A frutose é transportada para dentro da célula por transporte ativo ABC (POHLMANN *et al.*, 2006). *C. necator* não possui fosfofrutoquinase para a conversão de frutose-6-fosfato a frutose-1,6-difosfato (GOTTSCHALK; EBERHARDT; SCHLEGEL, 1964). A glicólise não pode ser realizada. Como não foi comprovada a presença de glucanato-6-fosfato desidrogenase nas cepas H16 e JMP 134 (POHLMANN *et al.*, 2006; LYKIDIS *et al.*, 2010), a frutose não seria

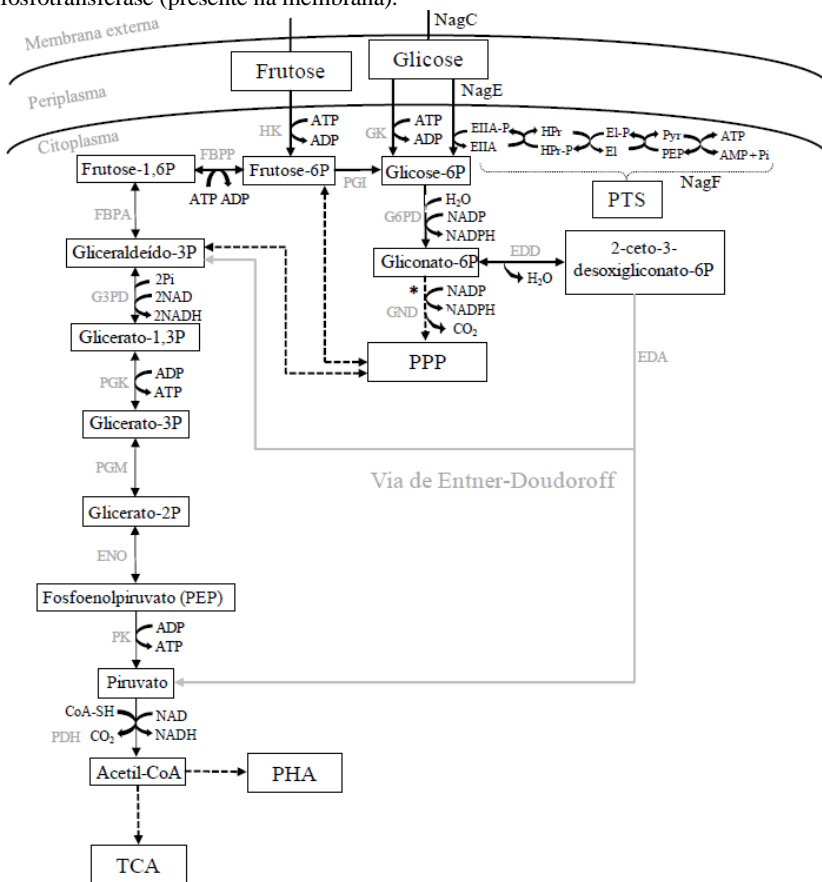


degradada pelo via das pentosefosfatos, mas exclusivamente pela via de *Entner-Doudoroff* graças ao gluconato-6-fosfato desidratase (EDD) e 2-ceto-3-desoxi-cluconato-6-fosfato aldolase (SCHLEGEL; EBERHARDT, 1972).

O catabolismo da glicose não é conhecido na cepa *C. necator* DSM 545, utilizada neste trabalho. König *et al.* 1969 evocam para este tipo de mutante um aumento na permeabilidade da glicose na membrana pela aquisição de uma permease e da glicose-6-fosfato constitutiva desidrogenase (G6PD). Assim a glicose atravessaria a membrana externa por uma porina (NagC) e então seria transportada do periplasma ao citosol e fosforilada via um sistema de transporte fosfotransferase (PTS) via NagE e NagF (RABERG *et al.*, 2011). Uma rota alternativa seria o transporte da glicose do periplasma ao citosol por difusão facilitada via NagE e então fosforilação por uma glucoquinase (GK) (POHLMANN *et al.*, 2006). A glicose-6-fosfato seria então metabolizada via *Entner-Doudoroff*.

A **Figura 2.9** apresenta um diagrama do metabolismo de carboidratos para *C. necator* DSM 545 com base nos estudos referenciados.

**Figura 2.9** Catabolismo dos carboidratos em *C. necator*, adaptado de Grousseau (2012) - Em cinza a via Entner-Doudoroff e suas enzimas: EDD, gliconato-6-fosfato desidratase; EDA, 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato aldolase; (\*) a existência desta via ainda não foi comprovada (GND, gliconato-6P-desidrogenase); Nomenclatura das demais enzimas em cinza: HK, hexoquinase; GK, hexoquinase; PGI, fosfoglicoseisomerase; G6PD, glicose-6-fosfato desidrogenase; FBPA, frutose bifosfatoaldolase; FBPP, frutose bifosfatofosfatase; G3PD, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PGK, fosfogliceratoquinase; PGM, fosfogliceratomutase; ENO, enolase; PK, piruvatoquinase; PDH, piruvato desidrogenase; abreviação PPP para a via das pentoses fosfato, TCA para a via do ácido cítrico e PTS para o sistema de transporte da fosfotransferase; NagC, proteína da membrana externa (porina), NagE, proteína do sistema açúcar fosfotransferase (presente na membrana).

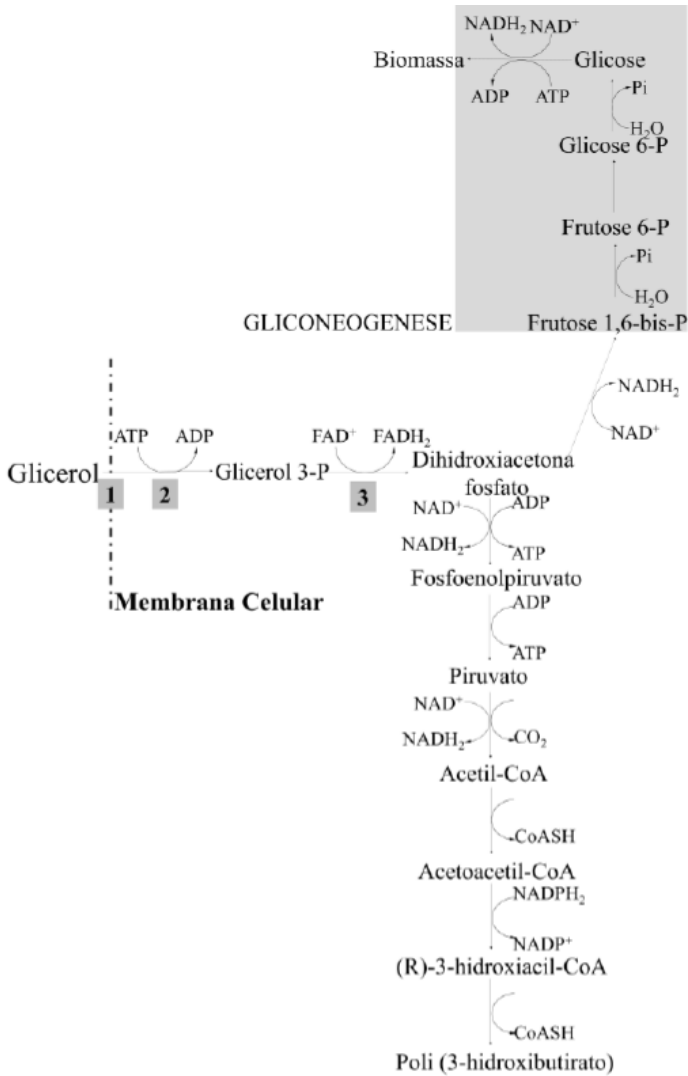


## 2.9.2 Metabolismo do glicerol

O glicerol é uma fonte de carbono que pode ser metabolizada por *C. necator* através das vias de degradação de açúcares, mas precisa ser fosforilado e oxidado a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) (CAVALHEIRO *et al.*, 2009; VRANA ŠPOLJARIĆ *et al.*, 2013; ZANFONATO, 2016).

A **Figura 2.10** apresenta um diagrama do metabolismo do glicerol por *C. necator*. A gliconeogênese, apresentada em cinza é uma parte essencial para a principal via metabólica de utilização de glicerol por micro-organismos, mas também acarreta menor eficiência de velocidade de crescimento e nos fatores de conversão para esse substrato. A glicerol quinase e a glicerol-3-fosfato dehidrogenase são as enzimas envolvidas na fosforilação do glicerol intracelular a glicerol-3-fosfato e à subsequente conversão a dihidroxiacetona fosfato. Este último é, então, introduzido à gliconeogênese (VOEGELE; SWEET; BOOS, 1993).

**Figura 2.10** Via metabólica para a utilização de glicerol para produção de PHB por *C. necator*, adaptado de Tanadchangsang e Yu (2012).



### 2.9.3 Metabolismo dos ácidos orgânicos voláteis

*C. necator* pode utilizar ácidos orgânicos voláteis, tais como acético, láctico, propiônico e butírico, como fonte de carbono e energia para crescimento e produção de PHAs como já demonstrado por Yu & Wang (2000) e Montano-Herrera et al. (2017).

Os ácidos orgânicos seguem rotas metabólicas bastante parecidas com a formação de composto intermediário e então a formação de acetil-CoA ou acetoacetil-CoA, os quais seguem pela rota já descrita para a síntese do PHB (SHI; SHIRAIISHI; SHIMIZU, 1997).

Apesar da bactéria *C. necator* metabolizar diversos ácidos como fontes de carbono adicionais, estes podem ser tóxicos, dependendo da concentração e pH. Em pHs abaixo dos pKas, para os ácidos graxos voláteis (AGVs) (láctico 3,85; acético 4,76; butírico 4,83; propiônico 4,87), a forma não dissociada predomina, e esses prontamente atravessam a membrana. Uma vez dentro da célula eles rapidamente se dissociam e acidificam o citoplasma (GARCIA-GONZALEZ; DE WEVER, 2018; SALMOND. KROLL; BOOTH, 1984). Em altos níveis de AGVs, isso pode reduzir o gradiente de prótons através da membrana, aumentar a pressão osmótica, e reduzir a taxa de utilização do ácido, taxa de crescimento e rendimento (LAWFORD; ROUSSEAU; 1993; AXE; BAILEY; 1995). Em níveis de pH próximos do ótimo para *C. necator* (7,0) os AGVs estão na forma dissociada no meio e a passagem através da membrana é limitada. Portanto, os AGVs podem ser apenas fontes efetivas de carbono quando pH e a sua concentração forem cuidadosamente regulada, evitando-se efeitos inibitórios (CHAKRABORTY; GIBBONS; MUTHUKUMARAPPAN, 2009).

### 3 DEFINIÇÃO DO PROCEDIMENTO DE HIDRÓLISE PARA O MELAÇO – ETAPA 1

Na etapa inicial deste trabalho, buscou-se um método para hidrolisar a sacarose, presente no melaço, com alto rendimento. No melaço, apesar da composição apresentar variações, cerca de 20% dos açúcares são compostos por glicose e frutose e 80% por sacarose. Assim, o pré-tratamento hidrolítico é essencial para a utilização do melaço como substrato para *C. necator* DSM 545, visto que este micro-organismo não é capaz de metabolizar a sacarose, mas sim glicose e frutose. O objetivo desta etapa foi, portanto, encontrar um método com bom rendimento, que não proporcionasse inibição do crescimento celular.

Para isso, foram realizados dois blocos de experimentos. O primeiro visou a avaliação comparativa dos diferentes métodos de hidrólise, enquanto o segundo bloco buscou avaliar a interferência dos diferentes métodos de hidrólise sobre o crescimento de *C. necator* DSM 545.

## 3.1 MATERIAL E MÉTODOS – ETAPA 1

### 3.1.1 Melaço

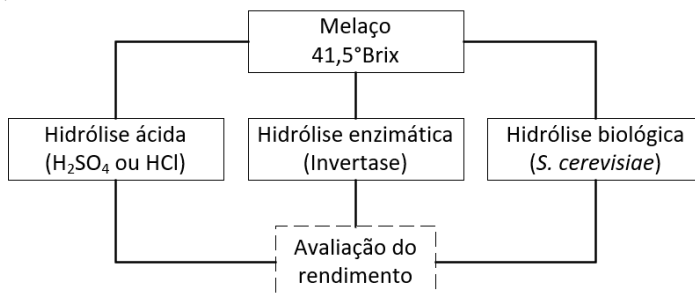
O melaço de cana-de-açúcar, gentilmente disponibilizado pela Usina Alta Mogiana (São Joaquim da Barra, SP), foi recebido em julho de 2013 e transportado em recipiente plástico de 5 L até a Universidade Federal de Santa Catarina, onde foi mantido congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de sua utilização.

### 3.1.2 Hidrólise do melaço

O melaço, antes de ser utilizado nos cultivos, passou por pré-tratamento, o qual consistiu de diluição (1:1) com água destilada, seguida de centrifugação a 8000 xg por 30 min, e finalmente a hidrólise da sacarose.

Os métodos de hidrólise testados foram: químico (HCl,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), enzimático (invertase) e biológico (*Saccharomyces cerevisiae*), como representado pela **Figura 3.1**.

**Figura 3.1** Representação do primeiro bloco de experimentos da Etapa 1, que visou o estudo dos rendimentos de hidrólise para diferentes métodos.



Para cada tipo de hidrólise foram selecionadas condições pré-determinadas de tempo, temperatura, pressão, pH e agitação, apresentadas no **Quadro 3.1**. Os procedimentos são descritos com maiores detalhes nas secções seguintes.

**Quadro 3.1.** Condições utilizadas para os ensaios de rendimento de hidrólise.

Agente	Pressão (atm)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	pH	Agitação (rpm)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,3	125	20	3,0	0
HCl	1,3	125	20	3,0	0
Invertase	Atmosférica	60	60	4,5	150
<i>S. cerevisiae</i>	Atmosférica	60	300	4,5	150

### 3.1.2.1 Hidrólise química com ácidos (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e HCl)

O método de hidrólise química usado neste trabalho foi adaptado a partir dos métodos apresentados por LIU *et al.* (2007) e AI *et al.* (2015), os quais usaram H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 M) e HCl (11 M) como catalisadores. O pH do melão foi ajustado para 3,0 com os ácidos citados acima e submetidos a autoclave sob pressão de 1,3 atm e 125°C por 20 min. Em seguida, as soluções foram centrifugadas a 8000 xg por 20 min e o sobrenadante teve o pH ajustado para 7,0 com NaOH 10 M.

### 3.1.2.2 Hidrólise enzimática com invertase

A enzima Invertase (*Novozymes*) utilizada neste trabalho foi gentilmente doada pela empresa LNF localizada na cidade de Bento Gonçalves-RS.

A invertase em pó foi diluída em tampão citrato pH 4,5, a fim de obter atividade teórica de 800.000 SU·L<sup>-1</sup>. A solução de melão teve seu pH ajustado para 4,5 com HCl 11M e a solução de invertase foi adicionada na razão 1:10 (enzima:melão), proporcionando uma solução com 80.000 SU·L<sup>-1</sup>. Após 60 min de reação a 60°C e 150 rpm, o pH foi corrigido para 7,0 e, em seguida a solução foi submetida a 90°C por 5 min para a inativação da invertase. A solução hidrolisada foi resfriada em refrigerador.

### 3.1.2.3 Hidrólise biológica com *Saccharomyces cerevisiae*

A hidrólise biológica consistiu na ação das enzimas liberadas pela levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* comercial da marca *Fleischmann*. O método consiste em um protocolo interno do laboratório no qual este estudo foi realizado, e é baseado em Emídio (2016), Mirzaei (2015) e Stolz (2005).

Inicialmente, foi realizada a hidratação da levedura. Para tal, adicionou-se 10 g de levedura em 30 mL de água destilada em *Erlenmeyer* de 125 mL e manteve-se a suspensão durante 2 h a 60°C em



agitador orbital a 150 rpm, garantindo-se a homogeneização da solução. Em seguida, adicionou-se 3 mL da suspensão de levedura tratada em 100 mL de melão diluído, assim iniciando a hidrólise da sacarose. A reação ocorreu por 5 h a 60 °C e 150 rpm.

A solução de melão hidrolisado foi centrifugada por 30 min a 8000 xg com o objetivo de separar a suspensão presente no melão. Em seguida, aqueceu-se a solução a 85°C por 5 min para garantir a inativação da enzima e de leveduras residuais. A solução foi acondicionada em refrigerador até a sua utilização.

### 3.1.3 Micro-organismo

A linhagem bacteriana *C. necator* DMS 545 foi utilizada neste trabalho. As cepas de estoque foram mantidas congeladas a -80°C em glicerol (1:1) em microtubos de 1,5 mL

### 3.1.4 Meios de cultura

Três meios de cultura líquidos foram utilizados. O primeiro meio foi utilizado para a reativação da cepa (primeira pré-cultura), o segundo para a adaptação da bactéria ao meio (segunda pré-cultura) e o terceiro para promover o crescimento celular (cultivos).

Na primeira pré-cultura, as células foram inoculadas em caldo nutriente, *Nutrient Broth* (NB), composto por 5 gL<sup>-1</sup> de peptona de carne e 3 gL<sup>-1</sup> de extrato de levedura.

Na segunda pré-cultura, foi utilizado o meio mineral (MM1), sem limitação de nitrogênio, descrito por Aragão *et al.* (1996) com modificações (em gL<sup>-1</sup>): açúcares redutores totais em glicose e frutose 20; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,39; citrato de amônio e ferro III 0,06; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,01; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5; uréia 2,13; ácido nitrilotriacético 0,19; e elementos traço 1 mL.L<sup>-1</sup>. A solução de elementos traço tem em sua composição (gL<sup>-1</sup>) H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,3; CoCl<sub>2</sub> 0,2; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 0,03; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O 0,03; NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,02; e CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,01. O pH foi ajustado para 7,0 com o uso de NaOH 10 M.

O meio de cultivo final, ou MM2, foi composto a partir dos mesmos nutrientes e concentrações do MM1, mas com a alterações na fonte de carbono de acordo com requerido para cada ensaio.

### 3.1.5

### 3.1.6 Condições de cultivo

#### 3.1.6.1 Pré-culturas

A primeira pré-cultura foi realizada em frasco *erlenmeyer* aletado de 500 mL contendo volume útil de 150 mL no meio NB, previamente esterelizado a 121°C por 15 min, com a inoculação de 1,5 mL da cepa em estoque. Este pré-inóculo foi mantido em um agitador rotatório, a 35°C e 150 rpm, por um período de 24 h, ou até o final de sua fase exponencial de crescimento. O final da fase exponencial foi determinado pelo valor de densidade óptica a 600 nm (DO) de 0,2 (medido por espectofotômetro digital) em análises do meio de cultivo diluído em 1:10, validado por experiência prévia do grupo de pesquisa. Após este período, as células foram transferidas para a segunda pré-cultura.

O segundo pré-inóculo foi realizado em um frasco *erlenmeyer* aletado de 1 L contendo 400 mL de meio MM1, não limitado, inoculado com 10% (v/v) da primeira pré-cultura, proveniente do meio NB. O *erlenmeyer* foi mantido em incubadora rotatória a 35°C e 150 rpm por cerca de 20h, ou até o final de sua fase exponencial de crescimento, representado por um valor de DO de 0,8 para o meio de cultivo diluído em 1:10. O valor de DO utilizado como referência foi determinado como final da fase exponencial de crescimento em ensaios anteriores do grupo de pesquisa.

#### 3.1.6.2 Cultivos em incubadora rotatória

Para os cultivos em incubadora rotatória, o produto da segunda pré-cultura foi incubado em agitador rotatório a 150 rpm, 35°C, 26 h ou até o final do crescimento da biomassa, instante a partir do qual cerca de 3 pontos experimentais apresentaram valores próximos. O volume da segunda pré-cultura, transferido para os frascos *erlenmeyer* aletados de 1 L contendo 400 mL de MM2, representou uma fração de 10% (v/v) desse volume de trabalho. Os cultivos, visando estudo do crescimento, foram realizados com nitrogênio em 1,0 gL<sup>-1</sup>, evitando a limitação deste nutriente durante a fase de crescimento. A concentração utilizada de N permite o crescimento não limitado de cerca de 6,4 gL<sup>-1</sup> e um crescimento total de 8,0 gL<sup>-1</sup> de biomassa residual, com base em estudos anteriores do grupo de pesquisa.

Foram realizados 4 cultivos em duplicata em incubadora rotatória, sumarizados no **Quadro 3.2**, onde os tratamentos de hidrólise foram comparados a um cultivo controle usando a mistura de glicose e

frutose. Cada um dos cultivos apresentou a concentração inicial de  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de açúcares redutores totais (ART).

**Quadro 3.2** Nomeclatura dos cultivos realizados visando os efeitos do método de hidrólise do melão no crescimento de *C. necator*.

<b>Substrato</b>	<b>Denominação do cultivo</b>
Melão hidrolisado ácido	CAc
Melão hidrolisado enzimático	CEnz
Melão hidrolisado biológico	CBio
Glicose e frutose	CCon

### 3.1.7 A mostragem

Ao longo dos cultivos, foram retiradas amostras do meio aproximadamente a cada 2 h. Foram coletadas 2 alíquotas de 2 mL em microtubos de plásticos e centrifugadas a  $10956 \text{ xg}$  por 3 min. Os sobrenadantes foram congelados para posterior análise de consumo de substrato. Outra alíquota de 2mL foi retirada e diretamente levada à análise de crescimento da biomassa.

### 3.1.8 Métodos analíticos

#### 3.1.8.1 Determinação de concentração da biomassa

A concentração biomassa foi avaliada pela determinação da densidade óptica em espectrofotômetro (modelo SF325NM, Tecnal Equipamentos para laboratórios, Piracicaba, São Paulo) a 600 nm (DO). Devido à coloração escura apresentada pelo meio de cultivo, realizou-se uma leitura do meio sem a adição do inóculo, tal valor foi então subtraído na leitura das amostras.

#### 3.1.8.2 Determinação de consumo de substrato

A determinação de ART foi realizada pelo método do ácido 3-5-dinitrosalicílico (DSN) (MILLER, 1959). A curva de calibração foi construída com glicose nas concentrações de 0 a  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### 3.1.8.3 Determinação de sólidos solúveis ( $^{\circ}$ Brix)

O teor de sólidos solúveis, em  $^{\circ}$ Brix, da solução de melão utilizada nos cultivos foi determinada por refratômetro digital TS Meter-D (*Reichert Technologies*).

### 3.1.9 Parâmetros calculados

#### 3.1.9.1 Análises do rendimento de hidrólise

O rendimento de hidrólise percentual aproximado (%H) foi obtido a partir dos dados de °Brix e de ART ( $\text{g L}^{-1}$ ). Para o cálculo foram utilizadas as **Equações 3.1 e 3.2**, com base no método utilizado por de Tomotani e Vitolo (2010).

$$\%H = \frac{100 (A_r - A_{r0})}{1,0527 S_0} \quad (3.1)$$

$$S_0 = A_{t0} - A_{r0} \quad (3.2)$$

Sendo  $A_r$  o teor de ART no hidrolisado ( $\text{g L}^{-1}$ ),  $A_{r0}$  o teor de ART no instante inicial ( $\text{g L}^{-1}$ ),  $S_0$  o teor aproximado de sacarose no instante inicial ( $\text{g L}^{-1}$ ), 1,0527 o fator de correção estequiométrico e  $A_{t0}$  é o teor de açúcares totais no instante inicial ( $\text{g L}^{-1}$ ) aproximado pela medida de °Brix, por refratômetro digital.

#### 3.1.9.2 Velocidades específicas máximas de crescimento

A velocidade específica máxima de crescimento, relativa à fase de crescimento exponencial foi calculada com base no método descrito por Aquarone *et al.* (1998) e Zanfonato *et al.* (2016). O cálculo foi realizado a partir da **Equação 3.4** ajustada aos dados experimentais, sendo esta o resultado da integração da **Equação 3.3** do tempo 0 até  $t$ :

$$\mu_x = \frac{1}{(\text{DO})} \cdot \frac{d(\text{DO})}{dt} \quad (3.3)$$

$$\ln(\text{DO}) = \ln(\text{DO}_0) + \mu_{\max} \cdot t \quad (3.4)$$

onde  $\mu_x$  representa a velocidade específica de crescimento,  $\mu_{\max}$  a velocidade específica máxima de crescimento,  $\text{DO}_0$  o valor de DO instante inicial e  $t$  o tempo de cultivo. Os dados relativos à fase exponencial de crescimento foram escolhidos de modo que o valor do coeficiente de determinação da reta ajustada ( $R^2$ ) fosse o maior possível. Os ajustes desconsideraram o ponto no instante inicial de cultivo, a fim de evitar efeitos da fase de adaptação do micro-organismo.

## 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ETAPA 1

### 3.2.1 Ensaios para comparação do rendimento de hidrólise da sacarose do melão

Na **Tabela 3.1** estão apresentados os rendimentos da hidrólise da sacarose do melão, assim como as condições utilizadas em cada um dos ensaios.

**Tabela 3.1** Rendimentos de hidrólise atingidos e condições para os procedimentos de hidrólise avaliados.

Método de hidrólise	Rendimento (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pressão (atm)	pH
HCl	92	125	20	1,3	3,0
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50	125	20	1,3	3,0
Invertase	90	60	60	amosférica	5,0
<i>S. cerevisiae</i>	75	60	300	atmosférica	5,0

Dentre as hidrólises ácidas, o método com o uso de HCl apresentou melhor desempenho e atingiu um rendimento de hidrólise de 92%, enquanto o resultado obtido com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi de 50%. Sen, Hussin e Baidurah (2019), ao realizar tratamento hidrotérmico do melão com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 N em um reator autoclave de síntese hidrotérmica e posterior transferência da solução para um forno convectivo a 105 °C por uma hora, atingindo 76% de conversão da sacarose. Tal resultado vai ao encontro do apresentado por Moroz et al. (1973) e Brauder e Moroz (1981), que atribuíram o poder de inversão de 100 para o ácido clorídrico e de 53,6 para o sulfúrico. O poder de inversão é definido pela relação entre a constante cinética de inversão da sacarose de determinado ácido em relação à constante do ácido clorídrico a 25°C, multiplicado por 100.

Considerando as hidrólises de natureza enzimática, a hidrólise por invertase apresentou o melhor resultado, atingindo conversão de 90%, enquanto o método usando *S. cerevisiae* atingiu 75%.

Tanto no método com *S. cerevisiae* e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nas condições testadas, há a presença de uma parcela substancial da sacarose que não foi convertida em açúcares redutores, o que indica que não sejam os mais indicados para a utilização em fermentações com a *C. necator* DSM 545.

Como efeito observado, ambas as hidrólises ácidas induziram à formação de precipitado, que apresentou coloração e odor de caramelo. Tal fato é um indício da perda de açúcares, além da possível formação de coprodutos indesejáveis. Alguns dos produtos da degradação de açúcares são tóxicos ao metabolismo de *C. necator*, como o hidroximetilfurfural (HMF) (WANG *et al.*, 2014; HAAS *et al.*, 2015; GOMES; RAMPON; RAMOS, 2017). Com a formação do precipitado nesses ensaios faz-se necessária a sua separação. A necessidade de uma etapa adicional para a separação do precipitado (centrifugação, por exemplo), agrega custos e tempo de processo, o que torna menos interessante a implementação desse tipo de método comercialmente.

Dessa forma, podem-se apontar vantagens e desvantagens nos métodos de hidrólise testados. A hidrólise ácida por HCl apresentou a vantagem de atingir alto rendimento em um curto tempo de processo. Porém, suas desvantagens aparentes podem estar relacionadas com: 1) o custo do processo em função da alta temperatura e pressão; 2) uma possível degradação de açúcares do meio que pode levar à formação de inibidores, indicada pela formação de precipitado; 3) a necessidade da adição de uma etapa de centrifugação no pré-tratamento do melaço.

A hidrólise enzimática por invertase também apresentou a vantagem de um alto rendimento em um tempo curto, porém em condições de operação mais amenas do que a hidrólise ácida. As condições de temperatura (60°C) e pressão (atmosférica) utilizadas podem ser atingidas com um consumo energético consideravelmente inferior às utilizadas nas hidrólises químicas (120°C e 1,3 atm), o que se mostra muito atraente para aplicações em larga escala. Uma possível desvantagem do uso do método enzimático pode ser o custo da enzima. Contudo, os preços dos agentes de hidrólise dependem de diversos fatores relativos ao processo de produção utilizado e à localização da planta, por exemplo. Assim, apenas uma análise econômica seria capaz de garantir qual dos métodos de hidrólise seria ideal economicamente.

Dentre as vantagens do uso da hidrólise por *S. cerevisiae*, pode-se citar o menor custo da levedura quando comparada à enzima purificada. Isso em decorrência da invertase ser, geralmente, produzida a por *S. cerevisiae*. Porém, isso também não garante que este método seja mais viável economicamente quando comparado com o uso da invertase, e apenas uma análise econômica forneceria dados consistentes para que se obtenha uma conclusão consistente. O procedimento com o uso da levedura possui mais etapas, e nas condições testadas, levou a um longo tempo de processo, rendimento de hidrólise inferior, o que torna o processo desinteressante quando visadas aplicações comerciais. Este trabalho não

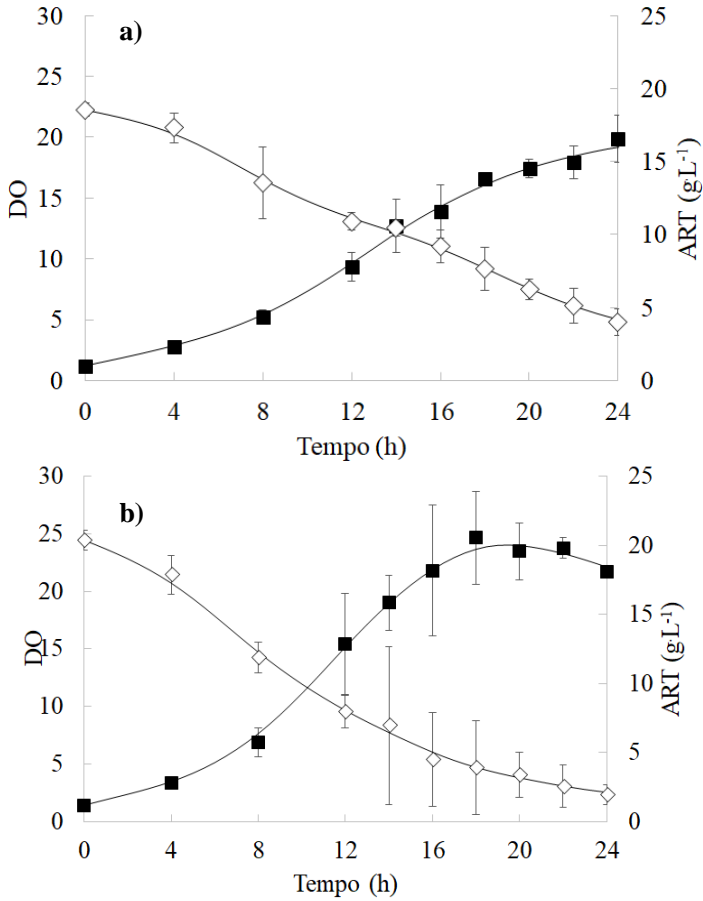
estudou a otimização deste método de hidrólise, o que poderia ser interessante para trabalhos futuros.

A partir dos resultados obtidos, optou-se por usar a hidrólise por HCl como método de hidrólise ácida, descartando-se a hidrólise por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nos ensaios subsequentes.

### **3.2.2 Cultivos em incubadora rotatória**

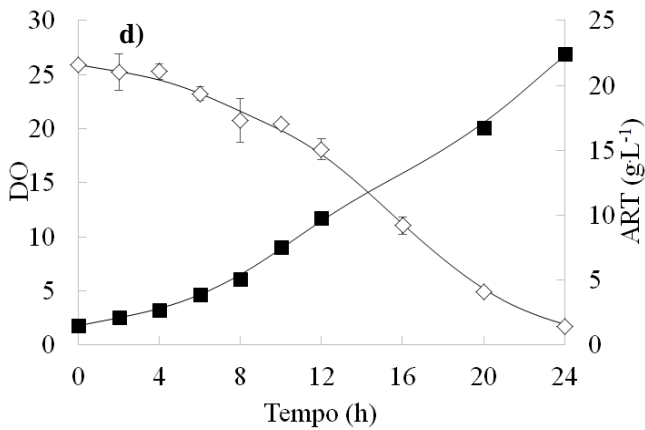
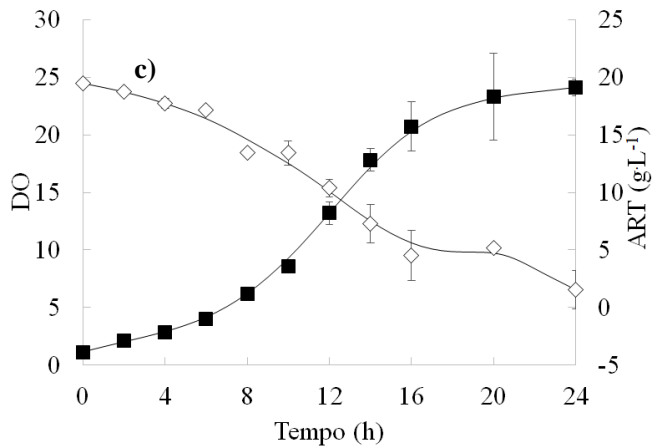
O crescimento da biomassa ao longo do tempo de cultivo, para os cultivos em que se utilizou os processos de hidrólise por HCl (CAc), por invertase (CEnz), por *S. cerevisiae* (CBio), além do controle (CCon), estão apresentados na **Figura 3.4**. Os resultados demonstram que houve crescimento em todos os cultivos, como indicado pelo crescimento da concentração de biomassa e consumo de substrato. Portanto, nenhum dos processos de hidrólise provocou inibição completa do crescimento celular.

**Figura 3.4** Cinética de crescimento da biomassa (■) e consumo de substrato (◇) para os cultivos CAc (a), CEnz (b), CBio (c) e CCon (d) realizados em incubadora rotatória.





**Figura 3.4 (continuação)** Cinética de crescimento da biomassa (■) e consumo de substrato (◇) para os cultivos CAc (a), CEnz (b), CBio (c) e CCon (d) realizados em incubadora rotatória.



Pela **Tabela 3.2** é possível observar que a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) para o CEnz foi similar à do cultivo CCon, indicando a ausência de efeitos inibitórios. Os cultivos CAc e CBio apresentam valores de  $\mu_{\max}$  menores que o cultivo controle, o que pode indicar um efeito de inibição do crescimento de *C. necator*. Esse efeito era esperado para o cultivo CAc, onde há a provável presença de compostos inibidores resultantes da degradação de carboidratos. Uma hipótese para o  $\mu_{\max}$  inferior apresentado pelo cultivo CBio é uma possível interferência no crescimento celular pela presença residual de células ativas de *S. cerevisiae* e de seus metabólitos com potencial inibidor

**Tabela 3.2** Velocidades específicas máximas de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) para cultivos em que se utilizou a hidrólise da sacarose por ácido sulfúrico (CAc), invertase (CEnz), *S. cerevisiae* (CBio) e para cultivo controle (CCon) em incubadora rotatória..

<b>Cultivo</b>	<b><math>\mu_{\max}</math> (<math>\text{h}^{-1}</math>)</b>
CCon	0,184 $\pm$ 0,000 <sup>a</sup>
CEnz	0,187 $\pm$ 0,019 <sup>ab</sup>
CAc	0,150 $\pm$ 0,005 <sup>b</sup>
CBio	0,157 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>

OBS: Letras diferentes “a - b” correspondem a valores diferentes em teste de Tukey com 0,05 de significância para testes em duplicata.

### 3.3 CONCLUSÃO – ETAPA 1

Todos os procedimentos de hidrólise testados foram capazes de disponibilizar os monossacarídeos da sacarose. Entretanto, apenas os procedimentos de hidrólise ácida por HCl e enzimática por invertase foram capazes de atingir bons rendimentos, acima de 90%. Dentre esses dois métodos, a hidrólise enzimática se destaca pelo tempo total inferior de processo, condições mais brandas de temperatura, pressão e pH, além de não necessitar de uma operação adicional de remoção de precipitado pós-hidrólise. Esse procedimento destacou-se ainda por não apresentar efeito inibitório, mantendo um  $\mu_{\max}$  similar ao cultivo controle (CCon).

Cabe destacar que, embora com velocidades e rendimentos diferentes, todos os procedimentos de hidrólise testados em cultivo foram capazes de fornecer um substrato que promova o crescimento de *C. necator* DSM 545.

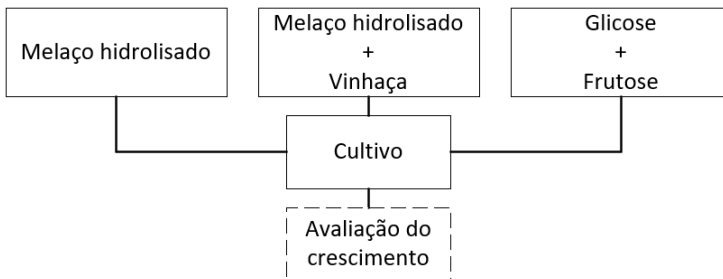
Considerando-se o exposto, o procedimento de hidrólise enzimática foi escolhido para ser utilizado nas etapas subsequentes deste trabalho como pré-tratamento do melaço de cana-de-açúcar.

## 4 ESTUDO CINÉTICO COMPARATIVO DO CRESCIMENTO DE *C. necator* EM MELAÇO E EM MISTURA DE VINHAÇA E MELAÇO – ETAPA 2

O objetivo desta etapa foi determinar o comportamento cinético de crescimento e de consumo de substrato de *C. necator* DSM 545 em melaço e em mistura de melaço e vinhaça. O conhecimento da cinética de crescimento na presença dos dois substratos é fundamental para o planejamento de cultivos visando a produção de PHB.

Para a realização desta etapa, foi realizado um bloco de experimentos com três cultivos em batelada em biorreator, ilustrado pela **Figura 4.1**.

**Figura 4.1** Representação do bloco de experimentos realizado na Etapa 2.



## 4.1 MATERIAL E MÉTODOS – ETAPA 2

### 4.1.1 Vinhaça

A vinhaça utilizada neste trabalho foi recebida como doação da Usina Iracema, produtora de etanol e açúcar localizada no município de Iracemápolis, SP. A vinhaça, coletada das colunas de destilação em maio de 2013, foi acondicionada em recipientes plásticos de 5 L. Após o transporte até a Universidade Federal de Santa Catarina, a vinhaça permaneceu congelada (-20°C) até o momento de sua utilização. A **Tabela 4.1** apresenta a caracterização química da vinhaça utilizada neste trabalho, realizada por Zanfonato (2016).

**Tabela 4.1** Caracterização da vinhaça utilizada neste trabalho, realizada por Zanfonato (2016).

Grandeza	Valor
pH inicial	4,4
DQO (mgL <sup>-1</sup> )	22.700
Nitrogênio (gL <sup>-1</sup> )	0,06
Ácido láctico (gL <sup>-1</sup> )	2,5
Ácido acético (gL <sup>-1</sup> )	0,6
Frutose (gL <sup>-1</sup> )	3,3
Sacarose (gL <sup>-1</sup> )	7,2
Glicerol (gL <sup>-1</sup> )	4,5
Cloretos (%)	0,158
Sulfatos (%)	0,096
Ca total (mgL <sup>-1</sup> )	578
Fe total (mgL <sup>-1</sup> )	23,2
Mn total (mgL <sup>-1</sup> )	3,21
Mg total (mgL <sup>-1</sup> )	138,8
Cu total (mgL <sup>-1</sup> )	0,66
Zn total (mgL <sup>-1</sup> )	0,043
K total (mgL <sup>-1</sup> )	1,2
Na total (mgL <sup>-1</sup> )	75
Etanol (gL <sup>-1</sup> )	1,2

#### 4.1.1.1 Preparo da vinhaça

A vinhaça passou por um pré-tratamento antes de sua utilização. Este consistiu no ajuste do pH para 7,0, através da adição de NaOH 10

M, além da esterelização por filtração em sistema com membrana tubular capilar de polipropileno autoclavável (modelo MD020 CP 2N Mycrodin Nadir, FRINGS DO BRASIL Engenharia e Comércio Ltda.), com diâmetro de poro igual a 0,2  $\mu\text{m}$ , área de filtração de 0,1  $\text{m}^2$ , pressão máxima de 3 bar e vazão de 1,5  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  para esterilização. O sistema de filtração foi autoclavado por 20 min a 121°C antes de sua utilização.

#### 4.1.2 Melaço

O melaço utilizado foi hidrolisado com invertase como descrito na seção 3.1.1.

#### 4.1.3 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado nesta etapa foi o mesmo apresentado na Etapa 1 deste trabalho (seção 3.1.3).

#### 4.1.4 Meios de cultivo

Os meios de cultura a pré-cultura utilizados nesta etapa foram similares aos utilizados na Etapa 1 deste trabalho (seção 3.1.4). Para o meio de cultivo utilizando vinhaça, a mesma substitui a água destilada na formulação do meio. Todos os cultivos foram dosados com 1,0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de nitrogênio, a fim de não ocorrer limitação deste nutriente durante a fase de crescimento.

O **Quadro 4.2** apresenta um resumo das composições utilizadas para cada cultivo realizado.

**Quadro 4.2** Nomeclatura dos cultivos realizados na Etapa 2 deste trabalho.

Cultivo	Substratos
CMel	Melaço
CVinMel	Melaço e vinhaça
Controle (CCon)	Glicose e frutose

#### 4.1.5 Condições de cultivo

##### 4.1.5.1 Pré-culturas

As pré-culturas utilizadas nesta etapa foram similares às utilizadas na Etapa 1 deste trabalho (seção 3.1.5.1).

#### 4.1.5.2 Cultivos em biorreator

Os cultivos em biorreator foram realizados em biorreator encamisado de bancada de 5 L (New Brunswick Scientific CO, modelo BIOFLO 110), com volume inicial de 4 L. O biorreator, contendo o meio MM2, com exceção da fonte de carbono, uréia e fosfato monopotássico, foi autoclavado por 30 min a 121°C. As soluções de fontes de carbono (glicose e frutose ou melação hidrolisado), de controle de pH (NaOH 10% e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%), a fontes de fosfato e o antiespumante (propilenoglicol Mn.ca. 200, Sigma-Aldrich) foram esterilizados separadamente. A fonte de nitrogênio (uréia) foi esterilizada utilizando-se filtração por membrana de celulose regenerada com (diâmetro de poro 0,22 µm). O volume do inóculo foi correspondente a 10% do volume útil final do biorreator, proveniente da segunda pré-cultura. Os cultivos visando o estudo do crescimento da biomassa tinham 1,0 gL<sup>-1</sup> de N que corresponde a 2,13 gL<sup>-1</sup> de uréia, evitando a limitação. A concentração de N utilizada, como na etapa 1 deste trabalho, foi utilizada para que não seja limitante ao longo do tempo de cultivo.

A temperatura do biorreator foi controlada em 35°C e seu pH em 7,0, com soluções de NaOH 2,5 M e HCl 2,73 M. A pressão parcial de oxigênio dissolvido em relação à saturação com ar atmosférico foi mantida acima de 50% da saturação, sendo as condições iniciais de agitação e aeração de 450 rpm e 0,5 vvm, respectivamente, e foram progressivamente aumentadas até 950 rpm e 1,5 vvm.

Os dados do sistema de controle do reator foram salvos *on-line* em *software* de aquisição de dados em um microcomputador. Os dados salvos foram referentes à velocidade de agitação, temperatura, pressão parcial de oxigênio dissolvido e do pH.

Após a inoculação, amostras foram retiradas do biorreator em intervalos regulares de aproximadamente 2 h para a determinação das concentrações de biomassa total, ART, nitrogênio e proteínas.

### 4.1.6 Determinações analíticas

#### 4.1.6.1 Amostragem

Amostras do meio foram retiradas aproximadamente a cada 2 h a partir do início dos cultivos. Três amostras de 2 mL de meio de cultivo foram coletadas em microtubos de plástico e centrifugados a 10956 *xg* por 3 min. Os precipitados foram lavados com 1 mL de água destilada e centrifugados, sendo este procedimento repetido por duas vezes. Os sobrenadantes foram congelados para as posteriores análises de

consumo de substrato. Os precipitados foram separados para as análises de concentração da biomassa e de proteínas.

#### 4.1.6.2 Determinação da concentração da biomassa total

A concentração de biomassa foi determinada por método de análise gravimétrica do precipitado da centrifugação da amostra como descrito anteriormente, após secagem em estufa a 105°C por 24 h nos microtubos de plástico. Após o tempo de secagem, os microtubos foram depositados em dessecador por 20 minutos e pesados.

Como se observou a presença de um fino precipitado no meio de cultivo, mesmo sem a adição do inóculo, foi realizada uma análise para o meio sem inóculo, e o valor resultante foi subtraído de todas as demais medidas.

#### 4.1.6.3 Determinação das concentrações de açúcares redutores totais, nitrogênio e proteínas

O teor de açúcares redutores foi determinado pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). A determinação de nitrogênio foi realizada pelo *kit* Uréia ES (Gold Analisa), que determina a concentração de uréia por método enzimático-colorimétrico. O teor de proteínas foi quantificado pelo método colorimétrico de biureto com modificações (ARAGÃO, 1996; SCHMIDT, 2015).

### 4.1.7 Tratamento de dados

#### 4.1.7.1 Correções das concentrações

O meio de cultivo teve seu conteúdo diluído pela adição das soluções de controle de pH ao longo do cultivo. Assim, foi necessária a correção das concentrações dos componentes do meio. Para isso, foi utilizado método baseado ao apresentado por Rocha Filho e Vitolo (2017). Ao final de cada cultivo os volumes utilizados das soluções de ácido e base foram contabilizados. Com auxílio do gráfico de controle de pH, fornecido pelo sistema de controle do biorreator, foi estimado o volume de solução adicionada no meio de cultivo em cada intervalo entre pontos. Cada ponto analisado teve seu valor corrigido ao ser multiplicado pelo fator de correção calculado pela **Equação 4.1**:

$$F_{\text{cor,t}} = \frac{V_{\text{ad}} + V_0}{V_0} \quad (4.1)$$



onde  $F_{cor,t}$  corresponde ao fator de correção adimensional do ponto relativo ao tempo de cultivo  $t$  (h),  $V_{ad}$  é o volume total adicionado no meio de cultivo (mL) até o instante  $t$  e  $V_0$  é o volume do meio de cultivo logo após o inóculo.

#### 4.1.7.2 Cálculo da biomassa residual estimada ( $X_{r_{prot}}$ )

A biomassa total, medida pelo método gravimétrico, corresponde ao PHB somado à biomassa celular residual ( $X_{r_{prot}}$ ). Para estimativa da biomassa residual foi realizada a análise de proteínas do meio. Vale salientar que nesta etapa do trabalho,  $X_{r_{prot}}$  foi estimado por esta técnica para garantir que não há formação de PHB, com base na tendência apresentada pelos dados, não em seu valor absoluto. Nesta etapa não foram realizadas determinações de PHB diretamente.

Como padrão na análise de proteínas, foi usada a albumina bovina. Porém em função das diferenças entre a albumina bovina e a proteína da parede célula da *C. necator*, realizou-se uma correção levando em conta o número de ligações peptídicas por grama de proteína na albumina bovina (0,88 ligações.g<sup>-1</sup>) (Friedli, 1996) e para *C. necator* (0,94 ligações.g<sup>-1</sup>) (ARAGÃO, 1996). Para a estimativa de  $X_r$  a partir do teor de proteínas obtido foi utilizado o fator obtido por Schmidt (2015), que verificou a presença de 73% de proteína na biomassa residual ao final da fase de crescimento, e 66% ao final da fase de produção. Portanto, foi considerado que 73% da biomassa residual é composta por proteínas durante a fase de crescimento, e 66% na fase de produção.

#### 4.1.8 Ajustes polinomiais

Para apresentação dos dados experimentais de  $X_t$  e de concentração de substratos, foram realizados ajustes polinomiais por meio do *software* Lissage (desenvolvido por Simões, Arroyo e Uribelarrea, *Institut National des* – Toulouse, França) e do Microsoft Office Excel 2007.

##### 4.1.8.1 Velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{max}$ )

A velocidade específica de crescimento máxima, relativa à fase de crescimento exponencial, foi calculada a partir dos dados ajustados à **Equação 4.2**,

$$\ln(X_t) = \ln(X_0) + \mu_{max} \cdot t \quad (4.2)$$

onde  $X_t$  representa a concentração de biomassa total,  $\mu_{\max}$  representa a velocidade específica máxima de crescimento e  $t$  o tempo.

#### 4.1.8.2 Produtividade em células ( $Pr_{glob}$ )

A produtividade em biomassa total foi calculada segundo a **Equação 4.3**:

$$Pr_{Xt} = \frac{Xt - Xt0}{t} \quad (5.7)$$

onde  $X_t$  é a concentração de biomassa total no tempo  $t$ ,  $X_{t0}$  é a biomassa total no início do cultivo e  $t$  é o tempo.

#### 4.1.8.3 Fatores de conversão

O fator de conversão de açúcares redutores totais em biomassa total ( $Y_{Xt/ART}$ ) foi calculado a partir do coeficiente angular da reta obtida ao relacionar a concentração de biomassa total ( $X_t$ ) com a concentração de substrato consumido, ao longo do tempo.

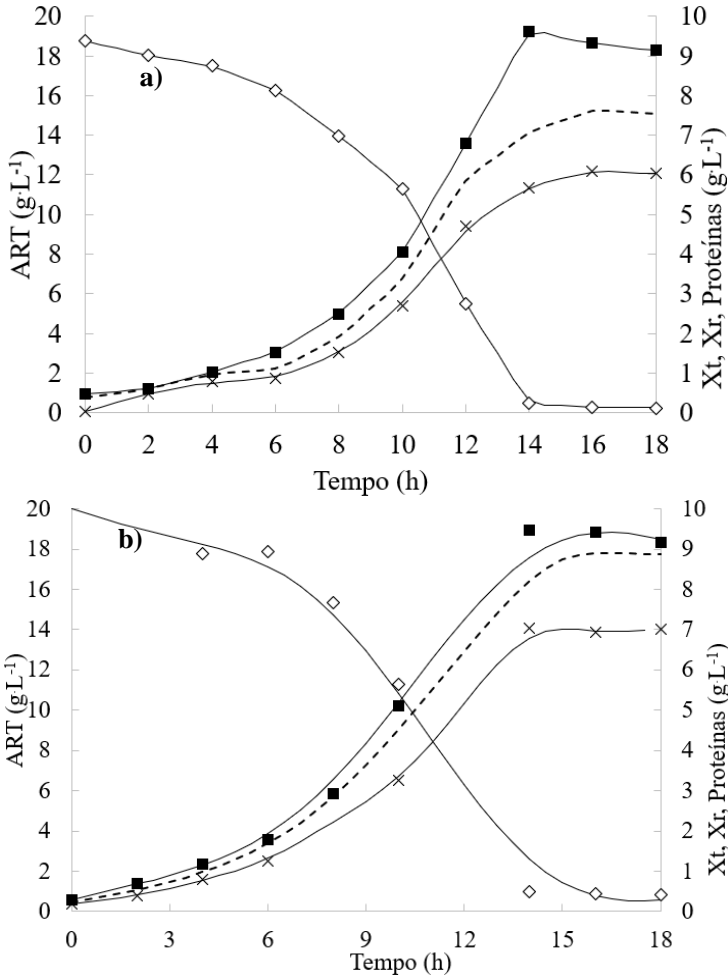
## 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ETAPA 2

A cinética de crescimento e de consumo de substrato foi avaliada para os três substratos (melaço, melaço + vinhaça, glicose + frutose) propostos neste trabalho. De forma geral, eles apresentam um perfil similar. Devido à sua maior proximidade de composição de fontes de carbono e de perfil de crescimento celular, os cultivos CCon e CMel serão apresentados juntamente.

### 4.2.1 Perfil de crescimento dos cultivos em biorreator com glicose e frutose –(CCon) e com melaço (CMel)

Os valores de  $X_t$  para o cultivo CCon e CMel foram 9,6 e 9,4  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente (**Figura 4.2**). As concentrações iniciais de N no cultivo CCon e CMel foram de, respectivamente, 1,0 e 1,19  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Assim, com base em um fator de conversão  $Y_{Xt/N}$  de 8  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (ARAGÃO, 1996; ZANFONATO, 2016), os cultivos poderiam atingir valores de  $X_t$  de, respectivamente, 8,0 e 9,52  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  sem que ocorresse a exaustão do N. Para ambos os cultivos é possível perceber uma diferença no comportamento dos perfis de  $X_t$  e de  $X_{r_{\text{prot}}}$ . Essa diferença é caracterizada pelo incremento da distância entre as curvas, acentuado a partir das 12 h. Esse efeito sinaliza o início da fase de acúmulo de PHB, possivelmente causada pela limitação nutricional em fontes N e em fontes de carbono. Assim,  $\mu_{\text{max}}$  foi calculado ao longo das 12 h de cada cultivo, período considerado como de crescimento exponencial não limitado, como pode ser observado no **Apêndice II**.

**Figura 4.2** Cinética de consumo de substrato (ART) ( $\diamond$ ), crescimento da biomassa total ( $X_t$ ) ( $\blacksquare$ ), biomassa residual ( $X_{r_{\text{prot}}}$ ) (---) e concentração de proteínas ( $\times$ ), para cultivo com glicose e frutose (CCon) (a) e com melão (CMel) (b). Os pontos representam as medidas experimentais, enquanto as linhas contínuas representam os ajustes polinomiais.



O valor de  $\mu_{\text{max}}$  determinado para os cultivos CCon e CMel foram de  $0,24 \text{ h}^{-1}$ . Schmidt (2011) obteve o mesmo valor em cultivo de *C. necator* em glicose e frutose (1:1) e meio mineral. Apati (2012) obteve

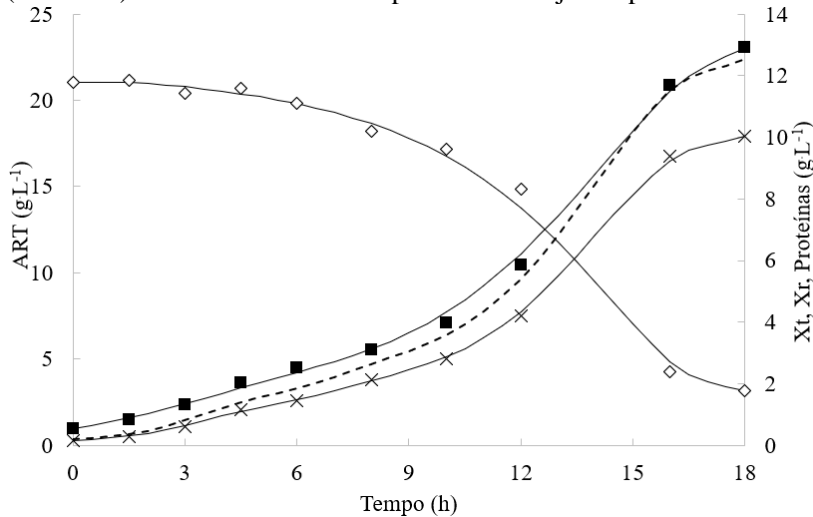
0,21 h<sup>-1</sup> em cultivo utilizando açúcar invertido em incubadora rotatória e Aragão (1996) atingiu 0,25 h<sup>-1</sup> em glicose.

Como observado na **Figura 4.2**, o consumo de substrato foi quase completo para ambos os cultivos, permanecendo uma pequena quantidade de substrato residual ao final de 18 h de cultivo. O fator de conversão de ART em biomassa total ( $Y_{Xt/ART}$ ) atingido foi de 0,49 e 0,47 g·g<sup>-1</sup> para o cultivo CCon e CMel, respectivamente, superiores aos valores encontrados para  $Y_{Xr/S}$  por Schmidt (2011) de 0,34 g·g<sup>-1</sup> e por Aragão (1996) de 0,41 g·g<sup>-1</sup> para glicose pura. Como observado, os autores citados usaram  $X_r$  para o cálculo do fator de conversão  $Y_{X/S}$ , enquanto nesta etapa deste estudo foi utilizado  $X_t$ . Porém, como já comentado  $Y_{X/S}$  pode ser utilizado para comparação visto que não existe produção expressiva de PHB durante a o período de cultivo utilizado para os cálculos (12 h). Valores levemente superiores aos da literatura eram esperados, visto que a biomassa total inclui a biomassa residual além da presença de biopolímero. Os resultados, portanto, indicam um bom rendimento de conversão.

#### 4.2.2 Cultivo em biorreator com melão e vinhaça (CVinMel)

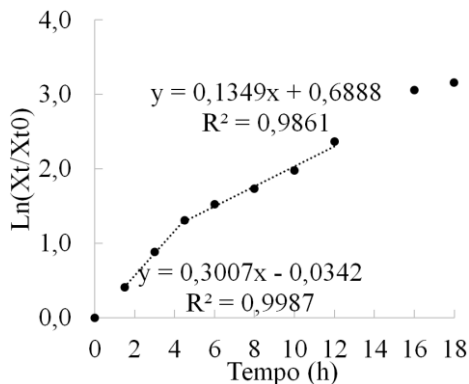
Como pode ser observado na **Figura 4.3**, a concentração de biomassa total ( $X_t$ ) atingida para o cultivo com vinhaça e melão foi de 12,9 g·L<sup>-1</sup>, em 18 h de cultivo. Observa-se que, até o final do cultivo, a biomassa não teve seu crescimento estabilizado, indicando a presença de substrato no meio e atividade microbiana. Pode ser observado que os perfis de crescimento de  $X_t$  e  $X_r$ , ou da concentração de proteínas, apresentam o mesmo comportamento, indicando que não houve acúmulo substancial de biopolímero. A concentração inicial de N para este cultivo foi de 1,09 g·L<sup>-1</sup>. Assim, com base no valor típico de  $Y_{Xt/N}$  de 8,0 g·g<sup>-1</sup>, a exaustão do N se daria quando  $X_t$  atingisse 8,72 g·L<sup>-1</sup>. Portanto, buscando-se evitar o cálculo de  $\mu_{Xt}$  com dados de crescimento celular limitado, foram utilizados apenas os dados até 12 h de cultivo.

**Figura 4.3** Cinética de consumo de substrato (ART) ( $\diamond$ ) e crescimento da biomassa total ( $X_t$ ) ( $\blacksquare$ ), biomassa residual ( $X_{r_{\text{prot}}}$ ) (- - -) e concentração proteínas ( $\times$ ), para cultivo com melão e vinhaça (CVinMel). As linhas contínuas representam os ajustes polinomiais.



Para avaliação da velocidade de crescimento, o cultivo foi dividido em duas partes, devido à evidente presença de diferentes inclinações do logaritmo neperiano de  $X_t$  ao longo da fase de crescimento exponencial (**Figura 4.4**). Na primeira inclinação, o  $\mu_{\text{max}}$  foi calculado até 4,5 h, tempo em que provavelmente esses ácidos se esgotam, resultando em  $0,30 \text{ h}^{-1}$ . Na segunda parte  $\mu_{\text{max}}$  encontrado foi de  $0,13 \text{ h}^{-1}$ . Esse fenômeno se dá, possivelmente, devido à conversão dos ácidos orgânicos da vinhaça em biomassa nos instantes iniciais do cultivo. Em cultivo com ácido láctico como única fonte de carbono,  $\mu_{\text{max}}$  encontrado por Aragão (1996) foi de  $0,40 \text{ h}^{-1}$  e Grousseau (2012) utilizando ácido acético, atingiu  $0,32 \text{ h}^{-1}$ . Tais valores podem ser comparados com a primeira parte do crescimento exponencial do presente cultivo. Portanto, observa-se que  $\mu_{\text{max}}$  em meios com glicose pode ser incrementado com a adição de ácidos orgânicos. Após 4 h de cultivo ainda há fontes de carbono e atividade no metabolismo microbiano suficientes para manter um crescimento exponencial. Apesar disso, o crescimento se dá com valor aparentemente inferior de  $\mu_{\text{max}}$ .

**Figura 4.4** Gráfico utilizado para o cálculo de  $\mu_{\max}$  para o cultivo CVinMel.



Até então não foi encontrado nenhum trabalho que tenha reportado as duas velocidades de crescimento na presença da vinhaça. Martinhago *et al.* (2014), em cultivo de *C. necator* em vinhaça adicionada de glicose, não fez distinção das fases exponenciais, e determinou o valor de  $0,20 \text{ h}^{-1}$ , um valor médio entre os dois valores de  $\mu_{\max}$  encontrados para o presente cultivo. Zanfonato (2016), em cultivo de *C. necator* em vinhaça adicionado de glicerol também não reportou o efeito, determinando um único  $\mu_{\max}$  igual a  $0,19 \text{ h}^{-1}$ . Percebe-se que, na segunda etapa de crescimento exponencial,  $\mu_{\max}$  se altera para um valor levemente inferior mais próximo ao determinado no cultivo com glicose e frutose.

Quando se avalia o consumo de substrato, observa-se um residual de aproximadamente  $3,1 \text{ gL}^{-1}$  de ART. O valor de ART residual atingido não representa a incapacidade de sua utilização. Ele ocorreu devido à quantidade superior de substrato neste cultivo quando comparado com os cultivos CMel e CCon. Além dos cerca de  $20 \text{ gL}^{-1}$  de ART presentes no meio, provenientes do melaço, soma-se ainda cerca de  $6,0 \text{ gL}^{-1}$  dos substratos originários da vinhaça. Essa concentração seria representada por glicerol, ácido acético e ácido láctico presentes na vinhaça e passíveis de serem utilizados pela bactéria. A presença de tais substratos também explicaria a menor variação de ART neste cultivo em relação aos cultivos CMel e CCon, nas primeiras 4,5 h de cultivo. Zanfonato (2016), ao avaliar cultivo com vinhaça e glicose, observou que não havia consumo de ART nas horas iniciais do cultivo apesar de rápido crescimento celular, atribuindo o efeito ao consumo preferencial dos ácidos orgânicos.

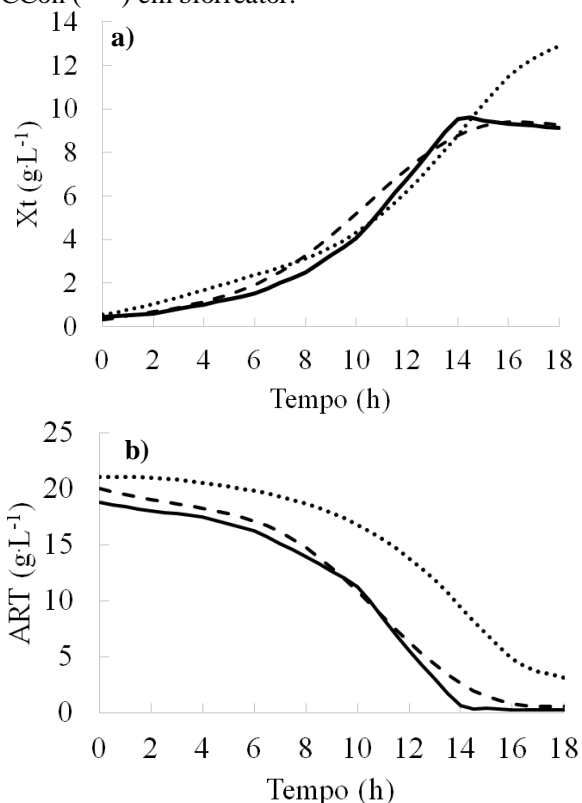
O fator de conversão de ART em biomassa total obtido foi de  $0,64 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ . Tal valor é superestimado por considerar que apenas ART são convertidos em biomassa total, enquanto, de fato, existem outras fontes de carbono para o crescimento, como glicerol, ácido acético e láctico (ZANFONATO, 2016), os quais não foram contabilizados. Valores típicos para  $Y_{XU/ART}$ , segundo trabalhos prévios do grupo de pesquisa (MARANGONI, 2000; GOULARTE, 2018), se aproximam de  $0,50 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ . Calculando  $Y_{XU/ART}$  apenas após 6h de cultivo, período no qual possivelmente não havia mais ácidos orgânicos no meio, mas glicose, frutose e glicerol, a qual também não é contabilizada em ART, atinge-se o valor de  $0,62 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ .

#### 4.2.3 Resultados comparativos

A **Figura 4.5** apresenta uma comparação das cinéticas de crescimento de  $X_t$  e consumo de ART para os cultivos CCon, CMel e CVinMel (apenas os ajustes são apresentados para efeito de comparação). Pode-se notar que o final da fase de crescimento, também observado no **Apêndice II**, acontece em tempos diferentes para os cultivos e em decorrência da carência de fontes de carbono. No cultivo CVinMel, ocorre próximo de 18 h, sendo mais tardia em relação aos cultivos CCon e CMel, que se dá em torno de 14 h.



**Figura 4.5** Comparação do crescimento da biomassa total (a) e consumo de ART (b) ao longo do tempo para os cultivos CMel (— —), CVinMel (••••) e CCon (—) em biorreator.



Para o cultivo CVinMel a variação na concentração de ART foi praticamente nula até cerca de 4 h de cultivo. Tal comportamento também foi detectado por Zanfonato (2016), e possivelmente está ligado ao consumo preferencial dos ácidos orgânicos da vinhaça. A presença das demais fontes de carbono presentes na vinhaça, como os ácidos láctico, acético e o glicerol, parece também manter a variação de ART mais baixa para o cultivo CVinMel ao longo do cultivo: tal fato é ilustrado pelo distanciamento da sua curva de consumo de ART das demais curvas até entre 12 e 14 horas de cultivo. Nessa faixa de tempo, a limitação de substrato promove redução no aumento da concentração de  $X_t$  para os cultivos CCon e CMel, mas esse efeito não chega a ser

observado em CVinMel, devido à sua quantidade maior de substrato total. As curvas referentes aos cultivos CMel e CCon apresentaram perfis similares, indicando velocidades de consumo de ART próximas entre si.

Um fato importante é que, apesar da velocidade de consumo de ART ser inferior durante a fase de crescimento não limitado (principalmente nas 4,5 primeiras horas de cultivo), o valor de  $\mu_{\max}$  para CMelVin é inclusive superior aos demais cultivos. Isso pode ser explicado pelo consumo preferencial dos ácidos orgânicos da vinhaça.

Um resumo comparativo dos parâmetros dos cultivos consta na **Tabela 4.2**. Observa-se que os cultivos CCon e CMel apresentaram resultados similares, enquanto o cultivo CVinMel apresentou um diferencial no valor de  $\mu_{\max}$  nas primeiras horas de cultivo, que resultou em um maior valor de  $Pr_{Xt}$ .

**Tabela 4.2** Valores de velocidade específica de crescimento máxima ( $\mu_{\max}$ ), fator de conversão de ART em biomassa total ( $Y_{Xt/ART}$ ) e produtividade máxima em células para os cultivos CVinMel, CMel e CCon, realizados em biorreator.

Cultivo	$\mu_{\max}$ ( $h^{-1}$ )	$Pr_{Xt}$ ( $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ )	$Y_{Xt/ART}$ ( $g \cdot g^{-1}$ )
CCon	0,24	0,65	0,50
CMel	0,24	0,60	0,47
CVinMel	0,30 (até 4,5 h) 0,13 (após 4,5 h)	0,70	0,64

### 4.3 CONCLUSÃO – ETAPA 2

A utilização da vinhaça para o crescimento de *C. necator* proporcionou duas distintas fases de crescimento exponencial, sendo que a primeira atingiu valor inicial de velocidade específica de crescimento consideravelmente mais alta do que os cultivos com glicose ou melaço. Tal comportamento possivelmente está relacionado com a presença de ácidos orgânicos da vinhaça, que seriam consumidos rapidamente, até cerca de 5 h de cultivo. Assim, a utilização da vinhaça que pode contribuir para maiores produtividades em biomassa e, conseqüentemente, em PHB. Além disso, a utilização da mistura de vinhaça e melaço pode ser uma alternativa interessante para a produção de PHB, visto que a vinhaça pura não fornece carbono suficiente para uma produção significativa.

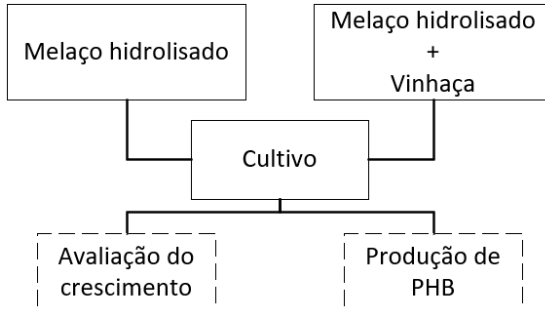
Os resultados desta etapa são importantes, pois certificam que coprodutos industriais abundantes e baratos podem ser utilizados para o crescimento de um micro-organismo produtor de PHB, o que pode proporcionar redução de custo de produção, algo essencial para a viabilização de processos industriais de produção de biopolímeros competitivos com os polímeros fósseis tradicionais.

## 5 ESTUDO CINÉTICO COMPARATIVO DO DESEMPENHO DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PHB DE *C. NECATOR* DSM 545 EM MELAÇO OU MISTURA DE VINHAÇA E MELAÇO – ETAPA 3

Nesta etapa o objetivo foi avaliar a produção de PHB a partir dos substratos testados em crescimento na etapa 2. Buscou-se a determinação da viabilidade técnica da produção de PHB em uma mistura de vinhaça e melaço, além da comparação dessa condição com o cultivo sem adição de vinhaça.

Assim, foram realizados cultivos utilizando melaço ou mistura de vinhaça e melaço como fontes de carbono. A estratégia de batelada alimentada com a aplicação de dois pulsos de melaço foi utilizada. Uma representação gráfica do bloco de experimentos realizados pode ser observada na **Figura 5.1**.

**Figura 5.1** Representação do bloco de experimentos realizado na Etapa 3.



## 5.1 MATERIAL E MÉTODOS – ETAPA 3

Os pré-tratamentos dos substratos foram realizados conforme já descrito nas seções anteriores (4.1.1 e 4.1.2), bem como o micro-organismo utilizado (3.1.2).

### 5.1.1 Meios de cultura

Os meios para primeira e segunda pré-culturas utilizados nesta etapa foram os mesmos descritos nas etapas 1 e 2 deste trabalho (3.1.3 e 4.1.5). O meio de cultivo foi também similar, com única diferença a concentração de  $0,8 \text{ gL}^{-1}$  de N, ou  $1,71 \text{ gL}^{-1}$  de uréia, objetivando a limitação deste nutriente no meio, induzindo a produção de PHB. O melaço foi adicionado nos meios de modo que a concentração inicial de ART atingisse cerca de  $20 \text{ gL}^{-1}$ . Nos cultivos com o uso da vinhaça, esta foi utilizada como o diluente do meio de cultivo, substituindo o uso da água destilada.

O **Quadro 5.1** apresenta um resumo da composição básica dos meios de cultivo utilizados nesta etapa.

**Quadro 5.1** Nomeclatura dos meios de cultivo utilizados na Etapa 3 deste trabalho.

<b>Substrato</b>	<b>Denominação do cultivo</b>
Melaço	PMel
Vinhaça e melaço	PVinMel

### 5.1.2 Condições de cultivo

As condições de cultivo utilizadas nesta etapa foram similares às utilizadas na Etapa 2 deste trabalho (secção 6.1.5). Alternativamente, foi utilizada a estratégia de alimentação por pulsos de melaço em ambos os cultivos. Foram realizados 2 pulsos para cada cultivo, aplicados quando a concentração de ART se aproximou do valor de  $10 \text{ gL}^{-1}$ . Evitou-se que valores superiores a 40 ou inferiores a  $5 \text{ gL}^{-1}$  fossem atingidos, evitando-se efeitos de inibição ou limitação pelo substrato. Cada pulso foi dosado para aumentar o teor de ART do meio em aproximadamente  $20 \text{ gL}^{-1}$ , totalizando uma disponibilidade de aproximadamente  $60 \text{ gL}^{-1}$  de ART por cultivo.

### 5.1.3 Determinações analíticas

A amostragem e as determinações de concentração de biomassa, ART e N total foram realizadas conforme o item 4.1.6.

#### 5.1.3.1 Determinação de glicose, frutose, glicerol, ácido láctico e ácido acético.

Os sobrenadantes das culturas foram filtrados em membrana de seringa de celulose regenerada (diâmetro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ ) e analisados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), em um equipamento Perkin Elmer series 200, para a determinação de glicose, frutose, glicerol, ácido láctico e ácido acético. O método foi baseado no apresentado por Fiorese (2008). Foi utilizado detector de índice de refração e coluna Aminex-87H. A fase móvel usada foi  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mM com vazão de 0,6  $\text{mL min}^{-1}$  e temperatura de 55°C. As curvas de calibração foram construídas pela formulação de uma solução contendo todos as fontes de carbono (em  $\text{g L}^{-1}$ : 20,0 de glicose, 20,0 de frutose, 6,0 de glicerol, 8,5 de ácido láctico e 6,0 de ácido acético), e os pontos correspondem às diluições desta em 1, 10, 50 e 250 vezes.

#### 5.1.3.2 Determinação da concentração de PHB

A determinação do teor de PHB a partir da biomassa seca foi realizada por HPLC (Perkin Elmer series 200), segundo método modificado de Karr, Waters e Emerich (1983). Os precipitados do meio de cultura secos, relativos a 2 mL de meio, foram ressuspensos em 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98% e transferidos para tubos de vidro com tampa, sendo mantidos a 100°C por 30 minutos em banho maria para a dissolução da membrana celular e hidrólise do PHB a ácido crotonico, que será detectado por detector UV. Os tubos, em seguida, foram resfriados e o conteúdo diluído em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5mM para que o teor de PHB ficasse dentro da faixa de leitura do equipamento. As amostras, já diluídas, foram filtradas (0,22  $\mu\text{m}$ ) e levadas para análise em HPLC. As corridas foram realizadas a 60°C e vazão de 0,7  $\text{mL min}^{-1}$ , com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mM como fase móvel. A curva de calibração foi construída com PHB comercial (Sigma-Aldrich) na faixa de 0,001 a 0,500 g/L.

#### 5.1.3.3 Determinação de N total no melão

A determinação de N total no melão foi realizada pelo método de Kjendhal (ISO, 2009) pelo Laboratório LABCAL, do Departamento

de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### 5.1.4 Tratamento de dados

##### 5.1.4.1 Correções das concentrações

A correção das concentrações dos constituintes do meio foi calculada por método similar à calculada na Etapa 2, adaptado de Rocha Filho e Vitolo (2017) (secção 4.1.7). Entretanto, além do volume adicionado relativo ao controle de pH, os volumes adicionados pelos pulsos de melaço também foram somados ao valor de  $V_{ad}$  na **Equação 5.1**, conforme a **Equação 5.2**.

$$F_{cor,t} = \frac{V_{ad} + V_o}{V_o} \quad (5.1)$$

$$V_{ad} = V_{pH} + V_p \quad (5.2)$$

Onde  $F_{cor,t}$  corresponde ao fator de correção adimensional do ponto relativo ao tempo de cultivo  $t$  (h),  $V_{ad}$  é o volume total adicionado no meio de cultivo (mL) até o instante  $t$ ,  $V_o$  é o volume do meio de cultivo logo após o inóculo,  $V_{pH}$  é o volume total (mL) de soluções de controle de pH adicionadas até o instante  $t$  e  $V_p$  é o volume (mL) total dos pulsos de melaço adicionados no meio até o instante  $t$ .

##### 5.1.4.2 Cálculo da concentração de biomassa residual ( $X_r$ )

A concentração de biomassa residual corresponde à concentração de biomassa total, medida pelo método gravimétrico, menos a concentração de PHB, determinada por HPLC. Assim, a **Equação 5.3** foi utilizada para o cálculo da biomassa residual.

$$X_r = X_t - PHB \quad (5.3)$$

onde  $X_r$  é a concentração de biomassa residual,  $X_t$  é a concentração de biomassa total e PHB é a concentração de biopolímero. Todos os termos foram calculados na unidade  $g L^{-1}$ .

##### 5.1.4.3 Cálculo da concentração de substrato total

A concentração total de substrato (S) foi calculada pela soma das concentrações de glicose, frutose, glicerol, ácido láctico e ácido acético medidas por HPLC.

### 5.1.5 Ajustes polinomiais

Aos dados experimentais de  $X_t$ , concentração de substratos e PHB foram realizados ajustes polinomiais com auxílio do *software* Lissage (desenvolvido por Simões, Arroyo e Uribelarrea, *Institut National des Sciences Appliquées* – Toulouse, França) e do Microsoft Excel 2007. Esse ajuste foi utilizado para determinar as velocidades específicas de crescimento celular ( $\mu_{Xr}$ ) e formação de produto ( $\mu_P$ ).

#### 5.1.5.1 Velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{max}$ )

A velocidade específica máxima de crescimento, relativa à fase de crescimento exponencial, foi calculada a partir dos dados de  $X_r$  ajustados à **Equação 5.4**, que é resultado da integração da **Equação 3.3** do tempo 0 até  $t$ . Diferentemente da Etapa 1 deste trabalho,  $\mu_{max}$  foi calculado com base nos dados de  $X_r$ , visto que foram realizadas análises de  $X_t$  e PHB em cada ponto da amostragem, nesta etapa.

$$\ln(X_r) = \ln(X_r) + \mu_{max} \cdot t \quad (5.4)$$

Onde  $X_r$  representa a concentração de biomassa residual ( $g \cdot L^{-1}$ ),  $\mu_{max}$  representa a velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ ) e  $t$  o tempo (h).

#### 5.1.5.2 Velocidades específica instantâneas de crescimento celular e produção de PHB

As velocidades específicas de crescimento celular, e produção de PHB foram calculadas segundo as **Equações 5.5, 5.6**, respectivamente:

$$\mu_{Xr} = \left(\frac{1}{X_r}\right) \cdot \left(\frac{dX_r}{dt}\right) \quad (5.5)$$

$$\mu_{PHB} = \left(\frac{1}{X_r}\right) \cdot \left(\frac{dPHB}{dt}\right) \quad (5.6)$$

onde  $\mu_{Xr}$  é a velocidade específica de crescimento celular (biomassa residual) ( $h^{-1}$ ),  $\mu_{PHB}$  é a velocidade específica de produção de PHB ( $g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ ),  $X_r$  é a biomassa residual ( $g \cdot L^{-1}$ ) e  $t$  é o tempo de cultivo (h).



### 5.1.5.3 Fatores de conversão

O fator de conversão de substrato em biomassa total ( $Y_{Xt/S}$ ) foi calculado a partir do coeficiente angular da reta obtida ao relacionar a concentração de biomassa total ( $X_t$ ) com a concentração de substrato consumido, ao longo do tempo de cultivo. O fator de conversão de substrato em biomassa residual ( $Y_{Xr/S}$ ) foi calculado a partir do coeficiente angular da reta obtida ao relacionar a concentração de biomassa residual ( $X_r$ ) com a concentração de substrato consumido, ao longo da fase de crescimento celular, ou seja, antes da concentração de nitrogênio atingir  $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , definida como a concentração limitante (ZANFONATO, 2016).

### 5.1.5.4 Produtividade global em PHB ( $Pr_{glob}$ )

A produtividade global em PHB  $Pr_{glob}$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), foi calculada pela **Equação 5.7**, onde PHB é a concentração de PHB ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) no instante  $t$  (h),  $PHB_0$  é a concentração de PHB ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) no instante 0 h, e  $t$  é o tempo de cultivo.

$$Pr_{glob} = \frac{PHB - PHB_0}{t} \quad (5.7)$$

### 5.1.5.5 Produtividade em PHB em fase de produção

Para fins de comparação de cultivos, foi utilizada a produtividade em PHB durante fase de produção. O cálculo utilizado consta apresentado na **Equação 5.8**:

$$Pr_{prod} = \frac{PHB - PHB_{prod}}{t - t_{prod}} \quad (5.8)$$

Onde  $Pr_{prod}$  é a produtividade em PHB em fase de produção ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), PHB é a concentração de PHB no instante  $t$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $t$  é o tempo de cultivo (h),  $PHB_{prod}$  é a concentração de PHB no instante em que a concentração de nitrogênio atinge o valor limitante de  $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) e a fase de produção é iniciada, e  $t_{prod}$  é o tempo (h) em que a concentração de nitrogênio atinge  $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### 5.1.5.6 Acúmulo de PHB

O acúmulo percentual de PHB na célula foi calculado pela divisão da concentração de PHB ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) pela concentração de biomassa total ( $X_t$ ) ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Para fins de comparação, os resultados foram

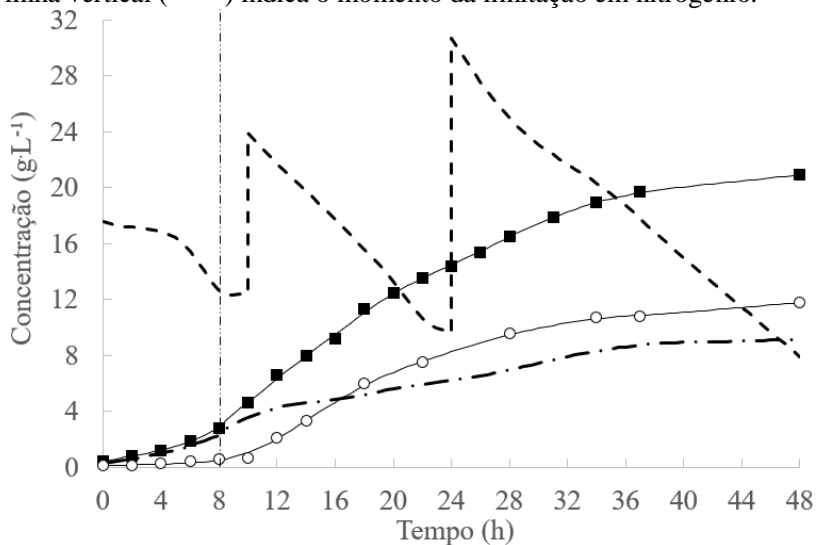
apresentados com referência à fase de produção, a qual inicia assim que a concentração de nitrogênio no meio atinge o valor limitante de  $0,2 \text{ g L}^{-1}$ .

## 5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ETAPA 3

### 5.2.1 Cultivo em biorreator com melão (PMel)

A **Figura 5.2** apresenta os resultados cinéticos para o cultivo de *C. necator* DSM 545 em biorreator usando melão como substrato. Os picos de S observados nos instantes 10 e 24 h correspondem aos momentos da adição dos pulsos de melão. Os momentos dos pulsos foram determinados de modo que S não atingisse valores inferiores a 5 e nem superiores a  $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  no meio, evitando efeitos de limitação ou inibição.

**Figura 5.2** Variação da concentração de S (---),  $X_t$  (■),  $X_r$  (— · ·) e PHB (○) para cultivo com melão e vinhaça (PMel) em biorreator. A linha vertical (---) indica o momento da limitação em nitrogênio.



Os valores de  $X_t$  e  $X_r$  máximos atingidos foram de, respectivamente,  $20,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $9,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ambos após 48 h de cultivo. Em cultivo com condições similares e com mistura de glicose e frutose como substrato, Schmidt (2011) obteve um valor próximo para  $X_t$ , de  $16,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , e  $7,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para  $X_r$ . A concentração máxima de biomassa residual, tanto para o cultivo de Schmidt (2011) quanto para PMel, foram limitadas pelo conteúdo de nitrogênio no meio, ambos dosados em  $0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Como o fator de conversão de nitrogênio em biomassa

residual é cerca de  $8 \text{ g g}^{-1}$  (ARAGÃO, 1996; IENCZAK, 2011; SCHMIDT 2011; ZANFONATO 2016) a biomassa residual para o presente cultivo deveria se limitar a cerca de  $6,4 \text{ g L}^{-1}$ .

Conforme já apresentado por outros autores desta linha de pesquisa (SCHMIDT, 2011; ZANFONATO, 2016; GOULARTE, 2018)  $X_r$  permanece aproximadamente constante ao longo da fase de produção, devido à carência de N para síntese proteica. Contudo, o cultivo PMel apresentou um comportamento diferente do esperado. Neste cultivo, o valor de  $X_r$  atingido foi superior ao estimado pelo fator de conversão, além disso, foi observado que  $X_r$  apresentou um aumento considerável mesmo após a exaustão do N adicionado na forma de uréia. Nesse caso, levantou-se a hipótese de que a concentração de N presente no melão fosse suficiente para aumentar levemente o crescimento celular durante a fase de produção. O método enzimático colorimétrico utilizado para a determinação de N é capaz de detectar apenas N na forma de uréia ou amônia, tendo demonstrado a ausência de N, nesta forma, na solução de melão. A análise também não detectou a presença de nitrogênio no meio de cultivo após a adição dos pulsos de melão. Portanto, foi realizada a análise de Kjeldahl para N total, que resultou na presença de 0,18% (m/m) de N, ou cerca de  $1,8 \text{ g L}^{-1}$ , na solução pulso de melão.

O valor de  $X_r$  atingido ( $9,15 \text{ g L}^{-1}$ ) corresponde a um teor de N no meio de  $1,14 \text{ g L}^{-1}$  (com base em valores típicos de  $Y_{X_r/N}$ ) e não o valor dosado,  $0,8 \text{ g L}^{-1}$ . A diferença entre esses valores,  $0,34 \text{ g L}^{-1}$  corresponderia ao N provindo do melão e utilizado para o crescimento de  $X_r$ . Com base na análise de N total realizada, a concentração de N provinda do melão foi cerca de  $0,37 \text{ g L}^{-1}$ , totalizando  $1,48 \text{ g}$  no biorreator com  $4 \text{ L}$ , divididos entre a concentração inicial ( $360 \text{ mL}$ ), de melão e os dois pulsos ( $230 \text{ mL}$  cada). Portanto, cerca de 92% do N total do melão foi utilizado para o crescimento de  $X_r$ . Estima-se, com base em valores típicos e  $Y_{X_r/N}$ , que, da quantidade de N total provinda do melão foi induzido o crescimento de  $X_r$  em  $2,72 \text{ g L}^{-1}$ . Portanto, cerca de 30% do valor máximo de  $X_r$  decorreu do consumo de N disponibilizado pelo melão.

Segundo Aragão *et al.* (1996) a produção de PHA é frequentemente estudada sob a limitação de N apesar do fato de que a adição de uma fonte de nitrogênio durante a fase de produção incrementa tanto  $P_{r_{\text{glob}}}$  quanto  $Y_{\text{PHB/S}}$ . Estudos verificaram que valores ótimos de  $\mu_{\text{PHB}}$  para *C. necator* podem ser atingidos quando  $\mu_{x_r}$  é próximo de  $0,05 \text{ h}^{-1}$  (IENCZAK, 2011; SCHMIDT, 2015). Lee *et al.* (2015) sugerem que a necessidade da manutenção de  $\mu_{x_r}$  é que altos

níveis de NADH e NADPH, produtos do ciclo TCA e via *Entner-Doudoroff*, respectivamente, causam inibição da citrato sintase e isocitrato desidrogenase em *C. necator*. Segundo os mesmos autores, a síntese de PHB por *C. necator* ocorre a altas velocidades quando altos níveis de NADH e NADPH estão presentes nas células. Assim, para que a síntese de PHB ocorra a altas velocidades é necessário manter o ciclo TCA em baixa velocidade e os níveis de NADH através da síntese de novas células (IENCZAK *et al.*, 2011). Isso pode ser obtido com a presença de N em níveis limitantes, baixos o suficiente para que não haja o crescimento celular, mas altos o suficiente para que não ocorra a sua exaustão e consequentemente a incapacidade da síntese proteica.

Alguns estudos demonstraram que a manutenção do crescimento limitado durante a fase de produção induzido pela alimentação de nitrogênio em concentrações inferiores a  $0,2 \text{ gL}^{-1}$ , durante a fase de produção de PHB pode favorecer a eficiência do processo (ARAGÃO, 1996; IENCKZAK, 2011; GROUSSEAU *et al.*, 2013). O comportamento do cultivo indica que o pulso de melaço foi capaz de atuar também como um pulso de nitrogênio, mantendo a concentração no meio próxima à concentração limitante e, assim, favorecendo o crescimento limitado em fase de produção.

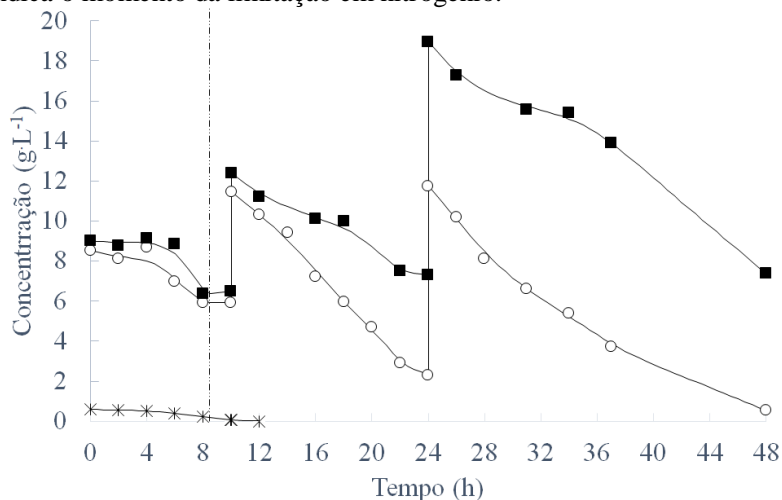
Ainda analisando a cinética do cultivo, foi observado o consumo de  $23,0 \text{ gL}^{-1}$  de glicose e  $19,3 \text{ gL}^{-1}$  de frutose, totalizando  $42,3 \text{ gL}^{-1}$  de substrato total. Quantidades residuais de  $0,5 \text{ gL}^{-1}$  de glicose e  $7,4 \text{ gL}^{-1}$  de frutose foram detectadas às 48 h, instante final do cultivo. Houve, portanto, praticamente a exaustão da glicose no meio de cultivo, mas não da frutose.

Na **Figura 5.3**, pode-se notar que apesar das concentrações iniciais próximas de glicose e frutose, o consumo de glicose apresenta variação mais pronunciada ao longo do cultivo, principalmente após o início da fase de produção. Tal comportamento suporta a hipótese de que *C. necator* utilizaria a via *Entner-Doudoroff* (GROUSSEAU, 2012). Nesta via metabólica a frutose precisa ser convertida glicose-6-fosfato antes de continuar sua conversão a piruvato, o que justificaria a diferença na variação de consumo de glicose e frutose. O sistema de transporte da glicose ainda não é conhecido e, segundo Raberg *et al.* (2011), este pode ocorrer passivamente, o que poderia influenciar na sua velocidade específica de consumo. Pela **Figura 5.2** pode-se notar que a variação na taxa de consumo de substrato total se mantém estável, o que indica que ainda há atividade celular no final do cultivo, apesar da variação da concentração de biomassa muito baixa. Segundo Aquarone *et al.* (1998), diminuições da velocidade de síntese são decorrentes de

perdas na capacidade biossintética, que podem ser decorrentes da diminuição da atividade específica de enzimas responsáveis pela síntese do polímero ou por atingir a capacidade máxima de acúmulo.

O cultivo PMel, conforme o esperado, não apresentou concentrações significativas das demais fontes de carbono analisadas: glicerol, ácido láctico e ácido acético.

**Figura 5.3** Cinética de consumo de glicose (○), frutose (■) e N (✱) para cultivo com melaço em biorreator (PMel). A linha vertical (---) indica o momento da limitação em nitrogênio.



O fator de conversão de substrato total em biomassa residual ( $Y_{Xr/S}$ ) foi de  $0,31 \text{ g g}^{-1}$ . Para condições similares, os cultivos CCon e CMel apresentaram valores de  $Y_{Xr/S}$  de  $0,50$  e  $0,46 \text{ g g}^{-1}$  respectivamente. Para tais cultivos foram utilizados dados de consumo de ART analisados pelo método DNS (MILLER, 1959), diferentemente dos realizados para o PMel, em que glicose e frutose foram analisadas por HPLC. As variações intrínsecas aos métodos podem tornar esses resultados não diretamente comparáveis. Schmidt (2011) atingiu  $0,34 \text{ g g}^{-1}$  para o fator de conversão de glicose e frutose em biomassa residual, também calculado sobre medidas de ART.

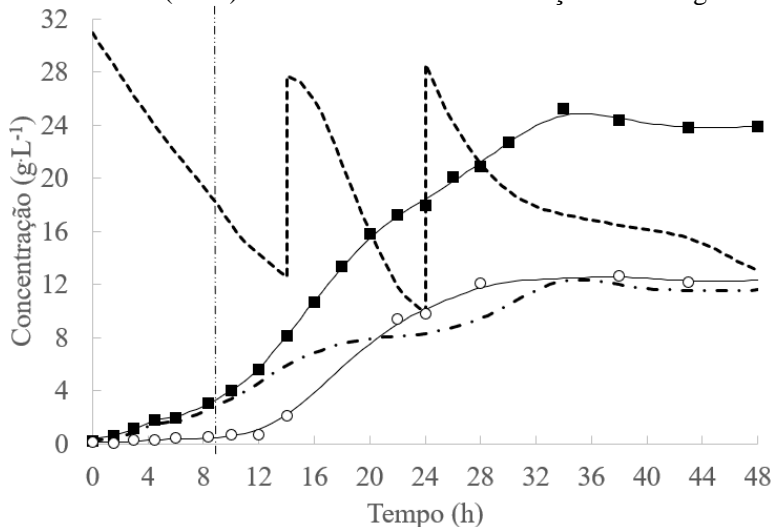
Em 48h de cultivo foi atingida a concentração máxima de PHB de  $11,8 \text{ g L}^{-1}$  com acúmulo de 58%, sendo esse valor atingido em 26,5 h. A produtividade global do processo foi de  $0,34 \text{ g h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ . Schmidt (2011) atingiu a concentração máxima de  $9,30 \text{ g L}^{-1}$  de PHB, e acúmulo de de

56%, em condições similares às do presente cultivo com o uso de glicose e frutose. Sen, Hussin e Baidurah (2019), em cultivo em *shaker* de *C. necator* em melão pré-tratado, hidrotermicamente com  $H_2SO_4$  em estufa, obtiveram  $0,78 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de PHB e 27,30% de acúmulo. Em estudo de otimização do acúmulo de PHB por *Alcaligenes* sp. NCIM 5085 em melão, Tripathi, Srivastava e Singh (2013) atingiram 76,80% de acúmulo.

### 5.2.2 Cultivo em biorreator com mistura de vinhaça e melão

Os resultados do estudo cinético do crescimento de *C. necator* em mistura de vinhaça e melão podem ser observados na **Figura 5.4**. A biomassa total máxima atingida foi  $24,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e a residual  $12,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ambas após 35 h de cultivo, valores superiores aos obtidos no cultivo PMel. Assim, o presente cultivo foi capaz de atingir maiores valores de  $X_t$  e  $X_r$  quando comparado com o cultivo PMel, o qual atingiu  $20,9$  e  $9,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Em cultivo com condições similares e vinhaça pura como substrato, Zanfonato (2016) obteve  $4,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $X_t$  e  $3,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $X_r$ , valores baixos em decorrência da utilização apenas da vinhaça, e não de uma combinação de substratos, como no presente trabalho.

**Figura 5.4** Variação da concentração de S (---), Xt (■), Xr (— · ·) e PHB (○) para cultivo com melão e vinhaça (PVinMel) em biorreator. A linha vertical (— · ·) indica o momento da limitação em nitrogênio.

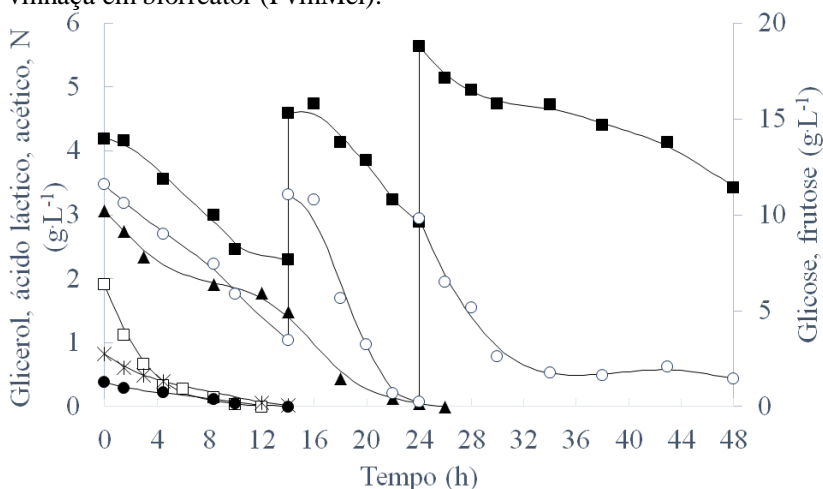


A **Figura 5.5**, apresenta a cinética de consumo das fontes de carbono. É possível observar que a concentração de ácido láctico e acético é praticamente nula após cerca de 5 h de do início do cultivo, momento a partir do qual há a queda em  $\mu_{\max}$  (**Apêndice VII**). O valor de nas primeiras horas de cultivo  $\mu_{\max}$  foi de  $0,37 \text{ h}^{-1}$ , caindo para  $0,19 \text{ h}^{-1}$  nas horas seguintes.

Ainda na **Figura 5.5**, é possível perceber que a presença do glicerol se manteve até cerca de 24 h, podendo ter influenciado para que o  $\mu_{\max}$  na segunda fase exponencial de crescimento,  $0,19 \text{ h}^{-1}$ , fosse inferior ao encontrado para o cultivo PMel, com melão puro,  $0,22 \text{ h}^{-1}$ .



**Figura 5.5** Cinética de consumo de glicose (○), frutose (■), glicerol (▲), ácido láctico (□), acético (●) e N (✱) para cultivo com melão e vinhaça em biorreator (PvinMel).



No cultivo PVinMel foram consumidos 27,4 gL<sup>-1</sup> de glicose, 20,1 gL<sup>-1</sup> de frutose, 1,9 gL<sup>-1</sup> de ácido láctico, 3,1 gL<sup>-1</sup> de glicerol e 0,4 gL<sup>-1</sup> de ácido acético, totalizando 50,0 gL<sup>-1</sup> de substrato total. Quantidades residuais de 1,5 gL<sup>-1</sup> de glicose e 11,5 gL<sup>-1</sup> de frutose foram detectadas em 48 h, instante final do cultivo. É possível observar que, durante a fase de crescimento, as variações da concentração de glicose e frutose são similares, apresentando um diferenciamento após o início da fase de produção. Durante esta fase, nota-se o consumo preferencial da glicose em relação à frutose, que acaba por gerar um acúmulo de frutose no meio. Pode-se observar que a glicose não é fator limitante para a produção de PHB ou de células devido à sua presença residual no cultivo PVinMel. Além disso, no cultivo PMel apresenta baixos valores de  $\mu_{xt}$  mesmo quando ainda exista glicose disponível no meio (32 h).

De modo similar ao observado no cultivo PMel, os pulsos de melão também atuaram como pulsos de N, como pode ser verificado pelo comportamento crescente da curva de  $X_r$  e de concentração de proteínas logo após o segundo pulso. Apesar disso, o crescimento limitado de  $X_r$  não pode ser mantido indefinidamente visto que a alimentação em N não é contínua e sua concentração logo se exaure. A

adição de mais pulsos de melação não seria suficiente para suprir a demanda de N para a manutenção de  $\mu_{xr}$  em fase de produção, o que resultaria no acúmulo de fontes de carbono no meio, principalmente de frutose. Portanto, apesar do uso do melação se destacar em relação a outros substratos pela presença de nitrogênio nos cultivos em batelada, a realização de cultivos com alimentação em N de modo a manter sua concentração constante pode gerar maiores benefícios em termos de produtividade e de  $Y_{xr/s}$ .

Nenhum dos estudos utilizados como referência para este trabalho estudou o crescimento de *C. necator* em meio natural complexo com mais de três fontes de carbono com análises específicas. Com o presente estudo foi, portanto, possível atingir conclusões complementares ao estudo de Zanfonato (2016). Uma das conclusões do citado estudo é de que *C. necator* não foi capaz de consumir glicerol após sua concentração no meio ter atingido cerca de  $3 \text{ gL}^{-1}$ . No cultivo PVinMel, que iniciou com concentração de  $3 \text{ gL}^{-1}$  de glicerol, foi observado consumo completo do mesmo em torno de 26 h, mas sua concentração variou mais lentamente quando comparada com as demais fontes de carbono. Outra informação que pode ser esclarecida é que *C. necator* consumiu todas as fontes de carbono simultaneamente, mas com diferentes velocidades de consumo.

Outro fato importante é que, ao se utilizar vinhaça pura no meio de cultivo a concentração inicial de ácido láctico e acético foram de 1,9 e  $0,4 \text{ gL}^{-1}$ , respectivamente. De acordo com Aragão (1996), experimentos com ácido láctico mostraram que uma concentração mínima de  $1,0 \text{ gL}^{-1}$  é necessária para o crescimento não limitado, enquanto uma concentração maior que  $5,0 \text{ gL}^{-1}$  seria inibitória. Para Wang e Yu (2000), a partir de  $1 \text{ gL}^{-1}$  o ácido acético apresentou efeito inibitório, impossibilitando totalmente o crescimento de *C. necator* H16 em concentrações acima de  $6 \text{ gL}^{-1}$ . Assim, a utilização de vinhaça concentrada, para que se atinja maior disponibilidade de fontes de carbono pode não ser uma boa opção, pois além de agregar custo pela necessidade de etapa adicional de pré-tratamento de matéria-prima, sua concentração máxima é limitada pela concentração inibitória dos ácidos graxos. Assim, para o uso na produção industrial de PHB, a utilização da vinhaça combinada com uma fonte de carbono de alta concentração é uma opção mais indicada. O cultivo de *C. necator* apenas com vinhaça como fonte de carbono possivelmente pode ser realizado com a estratégia de pulsos de vinhaça concentrada. Assim, seria possível manter concentrações não inibitórias de ácidos orgânicos, sendo esta uma estratégia que pode ser melhor avaliada em trabalhos posteriores.

O fator de conversão de substrato total em biomassa residual foi de  $0,21 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Valores encontrados na literatura para  $Y_{Xt/S}$  para cultivos utilizando fontes de carbono utilizadas neste estudo foram de: 0,43 para glicose (ARAGÃO, 1996); 0,34 para solução de glicose e frutose (SCHMIDT, 2011); 0,22 para glicerol (ZANFONATO, 2016); 0,16 para lactato (ARAGÃO, 1996); 0,20 para acetato (WANG; YU, 2000); 0,36 para ácido acético (GROUSSEAU, 2012). Portanto, apesar do ácido láctico ser consumido mais rapidamente que as demais fontes de carbono seu fator de conversão à biomassa total é menor do que a metade do encontrado para glicose e frutose. Tal fato pode explicar valor de  $Y_{Xt/S}$  inferior ao apresentado pelo cultivo PMel, sem adição de vinhaça ou o valor encontrado por Schmidt (2011) em glicose e frutose (**Tabela 5.1**).

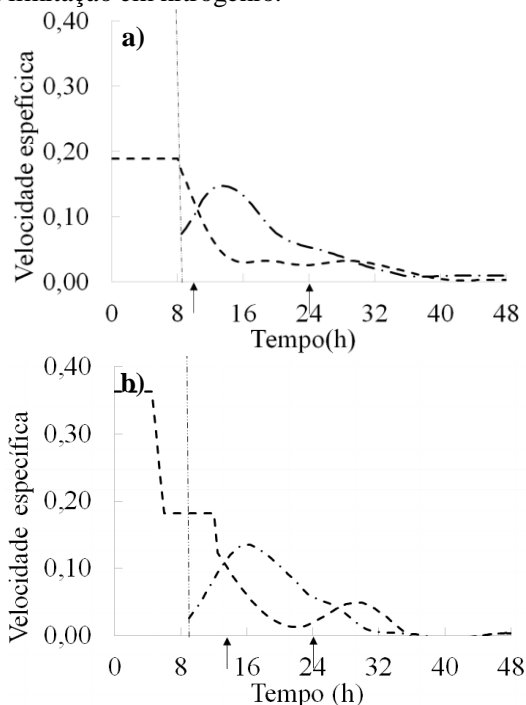
A quantidade máxima de PHB produzida foi de  $12,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  em 37 horas de cultivo. Na **Figura 5.4** é possível perceber que, após esse momento, não ocorre mais produção significativa de PHB. A hipótese para este comportamento é que a exaustão N no meio tenha impossibilitado a manutenção da atividade metabólica celular. Apesar disso, o cultivo PVinMel atingiu um valor superior ao obtido por PMel,  $11,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  em 48 h. Considerando que o acúmulo máximo atingido para o cultivo PVinMel foi de 56%, em 25,0 h, e para PMel de 58%, em 26,5 h, pode-se concluir que a concentração superior de biomassa foi a principal responsável pela maior concentração de PHB obtido em PVinMel. Como o limite de crescimento da biomassa residual é dado pela oferta de nitrogênio no meio, conclui-se que pequenas variações entre as dosagens de nitrogênio podem ter proporcionado diferenças nas concentrações das biomassas residuais e, conseqüentemente, no teor final de PHB.

### 5.2.3 Resultados comparativos

A **Figura 5.6** apresenta as velocidades específicas de crescimento da biomassa residual e de produção de PHB para os cultivos PMel e PVinMel. É possível notar que ambos os cultivos apresentaram perfis semelhantes de  $\mu_{\text{PHB}}$ . Após atingirem seus valores máximos, em 13 h para PMel e 16 h para PVinMel, os valores decrescem. A influência do conteúdo de N presente no pulso de melaço sobre  $\mu_{\text{xmax}}$  e  $\mu_{\text{PHB}}$  pode ser observada nos momentos de adição dos segundos pulsos de cada cultivo. Além disso, como já discutido por Schmidt *et al.* (2016), a alimentação com N assegura a manutenção dos valores de  $\mu_{\text{PHB}}$  durante a fase de produção, já que o nitrogênio adicionado permite a manutenção da

biomassa residual. Após 36 h de tempo de produção, o cultivo PMel apresentou valores de  $\mu_{\text{PHB}}$  próximos de zero. No cultivo PVinMel, após o mesmo período, a produção cessou completamente.

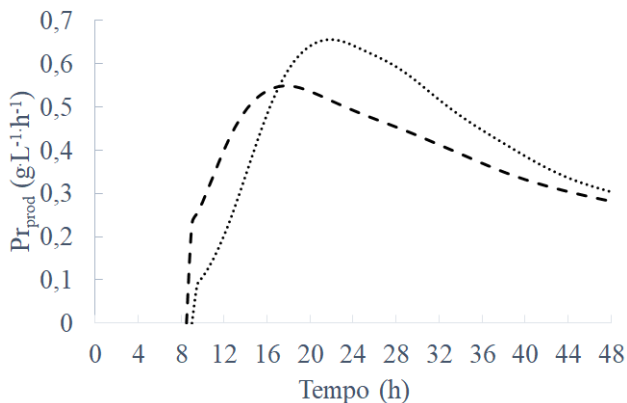
**Figura 5.6** Velocidades específicas de crescimento da biomassa residual ( $X_r$ ) ( $\text{h}^{-1}$ ) (---) e de produção de PHB ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) (-·-) para cultivo PMel (a) e PVinMel (b) em biorreator. A linha vertical (-·-·-) indica o momento da limitação em nitrogênio.



Na **Figura 5.7** é possível observar que, a partir de 8 h de fase de produção, o cultivo PVinMel apresentou valores de  $\text{Pr}_{\text{prod}}$  superiores aos do cultivo PMel. Os valores de  $\text{Pr}_{\text{prod}}$  máximos atingidos para o cultivo PVinMel e PMel foram, respectivamente, de 0,64 em 11,5 h e 0,54  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  em 6h, correspondentes aos valores 0,42 e 0,34  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  em termos de  $\text{Pr}_{\text{glob}}$ , apresentados na **Tabela 5.1**. Os resultados indicam que o segundo pulso de melaço não foi significativamente útil no aumento de produtividade. Os valores de produtividade global obtidos foram superiores aos obtidos em estudo prévio com o uso da vinhaça, com a mesma estratégia de cultivo e condições similares: 0,05  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  em

vinhaça e glicerol como substratos (ZANFONATO, 2016). Em meio sintético contendo glicose e frutose, Schmidt (2011) atingiu o valor próximo de  $0,44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Aragão (1996) obteve  $0,45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

**Figura 5.7** Produtividade em fase de produção para cultivo com melaço (PMel) (---) ou melaço e vinhaça (PvinMel) (••••) em biorreator.

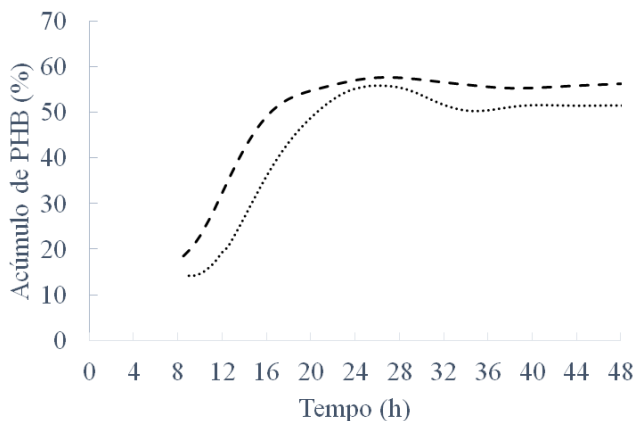


Sugere-se um estudo de otimização de  $\text{Pr}_{\text{glob}}$ , o qual é de grande importância quando se visa a produção industrial do PHB. As estratégias de alimentação de N utilizadas por Aragão (1996) e GROUSSEAU (2013) demonstraram ser capazes de potencializar a conversão de substrato em PHB bem como o acúmulo celular de PHB e, conseqüentemente, a produtividade, o que possibilitaria a produção de PHB mais competitiva com a produção de polímeros fósseis. Cultivos em alta densidade celular (IENCZACK, 2011; SCHMIDT *et al.*, 2016) também podem ser estudados visando o aumento de produtividade dos cultivos alimentados com vinhaça e melaço.

A **Figura 5.8** mostra que ao longo de toda a fase de produção, o cultivo PMel manteve um acúmulo de PHB levemente superior ao do cultivo PvinMel. Para ambos os cultivos este valor permaneceu com pouca variação após 16 horas de fase de produção. Os acúmulos máximos obtidos foram de 58% para o cultivo PMel e de 56% para PvinMel (**Tabela 5.2.1**). O segundo pulso, para ambos os cultivos, aparentemente não teve influência no acúmulo de PHB. Os resultados obtidos se aproximam dos obtidos por Schmidt (2011), que em glicose e frutose obteve 56%, e o de Aragão (1996), que atingiu 51% em glicose. Em cultivos utilizando vinhaça combinada com glicerol, Zanfonato

(2016) atingiu 15% de acúmulo. Martinhago (2014), ao combinar vinhaça com glicose, obteve 30% de acúmulo de PHB. Percebe-se portanto, que, dentre os estudos que utilizaram vinhaça para a produção de PHB publicados até então, o presente trabalho foi um dos que obteve os valores mais altos de acúmulo de PHB para a cepa *C. necator* DSM 545. Por se tratar de um subproduto do baixo valor, esses resultados comprovam que existe um grande potencial para sua utilização na produção de PHB quando comparado principalmente com os cultivos realizados como glicose e frutose.

**Figura 5.8** Acúmulo de PHB ao longo da fase de produção para cultivo com melaço (PMel) (---) ou melaço e vinhaça (PvinMel) (.....) em biorreator.



Na **Tabela 5.1** estão sumarizados os principais resultados obtidos neste trabalho e em comparação com trabalhos da literatura. A **Tabela 5.2** apresenta os fatores de conversão de substrato total em biomassa residual, total e PHB, e os fatores de conversão de nitrogênio em biomassa residual para os cultivos PvinMel, PMel bem como para cultivos encontrados na literatura.

**Tabela 5.1** Resumo dos parâmetros obtidos nos cultivos de *C. necator* DSM 545 utilizando melaço ou vinhaça e melaço como fontes de carbono e resultados da literatura. Os asteriscos (\*) indicam valores não determinados.

Substrato	Condições de cultivo	$\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )	Xt (g·L <sup>-1</sup> )	PHB (g·L <sup>-1</sup> )	Pr <sup>glob</sup> (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	PHB% (%)	Referência
Melaço de cana	Batelada alimentada com melaço em biorreator	0,19	20,9	11,8	0,34	58	Presente trabalho
Vinhaça e melaço de cana	Batelada alimentada com melaço em biorreator	0,36	24,9	12,6	0,42	56	Presente trabalho
Glicose	Batelada alimentada com glicose e limitação em nitrogênio em biorreator	0,25	16,0	8,0	0,45	51	ARAGÃO (1996)
Glicose	Batelada alimentada e alimentação exponencial em N limitante em biorreator	*	*	*	1,03	74	ARAGÃO (1996)
Glicose e frutose	Batelada com pulsos em biorreator	0,26	16,6	9,3	0,44	56	SCHMIDT (2011)
Açúcar invertido	Batelada em incubadora rotatória	0,21	9,4	4,6	0,20	48,9	APATI (2012)
Vinhaça de cana e glicose	Batelada alimentada em incubadora rotatória	0,20	14,0	4,0	*	30	MARTINHAGO (2014)
Vinhaça de cana e glicerol	Batelada alimentada em biorreator	0,19	14,0	2,2	0,05	15	ZANFONATO (2016)
Glicerol	Batelada alimentada em biorreator	0,10	11,3	4,8	0,15	42	ZANFONATO (2016)
Ácido láctico	Batelada alimentada em biorreator	0,40	9,5	6,5	*	70	ARAGÃO (1996)

A **Tabela 5.2** apresenta os resultados obtidos para os fatores de conversão calculados para os cultivos PMel e PVinMel e valores obtidos por estudos da literatura. O cultivo PVinMel apresentou um valor inferior para  $Y_{Xr/S}$ , o que pode ser justificado pelo consumo do ácido láctico, que apresenta valores inferiores de fator de conversão à Xr (ARAGÃO, 1996). Zanfonato (2016), por apenas medir o consumo de glicerol, não foi capaz de medir o fator de conversão de substrato total em Xr com exatidão, visto que a vinhaça apresentou uma série de fontes de carbono não contabilizadas.

**Tabela 5.2** Fatores de conversão obtidos nos cultivos realizados neste trabalho e em outros estudos. Os valores de  $Y_{Xr/S}$  foram calculados com dados da fase de crescimento celular,  $Y_{Xt/S}$  ao longo de todo o cultivo e  $Y_{PHB/S}$  com dados da fase de produção de PHB. Os asteriscos (\*) indicam valores não determinados.

Substrato	$Y_{Xr/S}$ ( $g \cdot g^{-1}$ )	$Y_{Xt/S}$ ( $g \cdot g^{-1}$ )	$Y_{PHB/S}$ ( $g \cdot g^{-1}$ )	$Y_{Xr/N}$ ( $g \cdot g^{-1}$ )	Referência
Melaço de cana	0,31	0,55	0,30	6,28	Presente trabalho
Vinhaça e melaço de cana	0,21	0,54	0,34	7,67	Presente trabalho
Glicose	0,43	*	0,27	7,3	ARAGÃO (1996)
Glicose e frutose	0,34	*	0,39	6,50	SCHMIDT (2011)
Lactato	0,16	0,26	0,25	*	ARAGÃO (1996)
Vinhaça de cana	*	*	*	10,5	ZANFONATO (2016)
Glicerol	0,22	*	*	*	ZANFONATO (2016)

Para PVinMel  $Y_{PHB/S}$  foi de  $0,30 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ , próximo ao observado em PMel,  $0,34 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ . Schmidt (2011) obteve o valor de  $0,39 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ . Como o discutido anteriormente, houve aporte de nitrogênio nos pulsos de melaço, o que manteve a biomassa em crescimento mesmo durante a fase de produção de biopolímero. Por este fato, parte do substrato está sendo convertido em biomassa residual, o que induz uma variação negativa ao valor de  $Y_{PHB/S}$ . Mesmo que o fator de conversão calculado



acabe por ser inferior ao proporcionado pelo meio sintético (SCHMIDT, 2011), o mesmo crescimento de  $X_r$  que acaba por reduzir o valor calculado de  $Y_{PHB/S}$  é responsável pela promoção de maiores produtividades, conforme o discutido anteriormente (ARAGÃO *et al.*, 1996; IENCZACK, 2011; GROUSSEAU *et al.*, 2013).

A diferença observada entre  $Y_{Xt/S}$  e  $Y_{Xr/S}$  na fase de crescimento celular indicam que parte do substrato que está sendo consumido não está sendo utilizado para o crescimento celular, mas possivelmente para a produção de biopolímero e manutenção celular. De modo similar, a diferença observada entre  $Y_{Xt/S}$  e  $Y_{PHB/S}$  ao longo da fase de produção de PHB indica que parte do substrato consumido está sendo convertido em  $X_r$  ou utilizado para a manutenção celular. Os valores obtidos, em lactato, por ARAGÃO (1996) de 0,26 e 0,25  $g \cdot g^{-1}$  para  $Y_{Xt/S}$  e  $Y_{PHB/S}$  respectivamente, indicam que uma fração praticamente todo o substrato está sendo consumido para a formação de PHB ao longo da fase de produção.

Os valores de  $Y_{Xr/N}$  se aproximam dos reportados na literatura, conforme o esperado (ARAGÃO, 1996; SCHMIDT, 2011). Os cálculos deste fator de conversão foram realizados com dados relativos à fase de crescimento, portanto não foram influenciados pela adição dos pulsos de melação.

Considerando a complexidade dos substratos utilizados neste trabalho, os fatores de conversão se tornam medidas menos confiáveis para a eficiência do processo. Assim, um parâmetro mais robusto para comparações de eficiência do processo, neste caso, é a produtividade em PHB.

### 5.3 CONCLUSÃO – ETAPA 3

Os resultados obtidos na Etapa 3 deste trabalho demonstram que a utilização da vinhaça promoveu um ganho em produtividade do cultivo, o que pode estar ligado ao alto valor de velocidade específica de crescimento promovida pelos ácidos orgânicos nas primeiras horas do cultivo.

A utilização da combinação dos substratos vinhaça e melação de cana-de-açúcar apresenta, portanto, potencial diferenciado para ser utilizado em processos industriais de produção de PHB.



## 6 CONCLUSÕES FINAIS

Na busca do ganho de competitividade para o PHB no mercado de polímeros, o uso de matérias-primas de baixo custo surge como uma importante estratégia. A vinhaça e o melaço se encaixam nessas características, sendo baratos e abundantes no Brasil. A cinética de produção de PHB por *C. necator* DSM 545 em melaço e mistura de vinhaça e melaço de cana-de-açúcar pôde ser realizada e avaliada.

Dentre os métodos testados, a hidrólise enzimática por invertase destacou-se pelo seu rendimento e por não proporcionar redução da velocidade específica de crescimento celular em relação ao meio sintético. A escolha de um bom método de hidrólise também é fundamental quando se busca a viabilidade e otimização econômica do processo de produção de PHB por *C. necator* DSM 545 e com o uso de substratos ricos em sacarose. Apesar disso, não foi realizada uma avaliação econômica considerando os custos totais de produção do PHB proporcionados pelos diferentes métodos de hidrólise, bem como as diferentes capacidades de produção atingidas. Este é um exercício importante a ser realizado antes da aplicação do processo de produção comercial.

A utilização da vinhaça auxiliou no aumento da produtividade do processo, quando comparada com cultivo apenas com melaço. Tal efeito está ligado com a presença de duas fases exponenciais de crescimento, caracterizada por altos valores de  $\mu_{\max}$  nas primeiras horas de fermentação, em decorrência da presença de ácidos orgânicos. A utilização do melaço juntamente com a vinhaça, quando comparado a outros substratos purificados tradicionais como a glicose ou o glicerol, pôde potencializar a produtividade, concentração de PHB e acúmulo de PHB dos cultivos. Isso pode ser atribuído à presença de N no melaço, capaz de manter o crescimento celular limitado durante a fase de produção celular, e conseqüentemente prolongando a atividade biossintética. Assim, a combinação desses substratos se destaca para aplicações industriais: tanto por seus benefícios em termos produtivos quanto pelo reduzido custo de suas matérias-primas.

Com os resultados deste trabalho, a vinhaça adicionada ao melaço apresenta-se como uma alternativa de substrato para a produção de PHB com potencial para aplicações industriais. A utilização desses substratos pode não só melhorar a competitividade do PHB no mercado de polímeros ao promover menores custos de produção e maiores produtividades, mas também valorizar a vinhaça, evitando que esta seja utilizada de modo inadequado, evitando danos ambientais graves.



## 7 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o crescimento de *C. necator* em mistura de vinhaça e melaço de cana-de-açúcar com a utilização de alimentação em nitrogênio, mantendo sua concentração em níveis limitantes, ao longo da fase de produção de PHB.
- Aplicar estratégias para a obtenção de alta concentração celular em cultivos de *C. necator* utilizando vinhaça e melaço de cana-de-açúcar como substratos.
- Estudar o cultivo de *C. necator* em regime contínuo em dois estágios alimentado com mistura de melaço e vinhaça.
- Caracterizar o biopolímero produzido pelo processo desenvolvido neste trabalho, visando futuras aplicações.
- Estudar o crescimento de *C. necator* em meio mineral e vinhaça como única fonte de carbono com o uso de pulsos de vinhaça concentrada, de modo a manter a concentração de ácidos orgânicos abaixo do limiar inibitório.
- Realizar análise de viabilidade econômica da produção de PHB com o uso de vinhaça e melaço de cana-de-açúcar.
- Estudar e otimizar o processo de hidrólise biológica para que possam ser atingidos altos graus de conversão em tempos mais curtos e reduzir o efeito inibitório no crescimento de *C. necator*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AI, H.; YU, M.; ZHANG, S.; SUO, Y.; LUO, P.; LI, S.; WANG, J. Improved welan gum production by *Alcaligenes sp.* ATCC31555 from pretreated cane molasses. **Cbohydrate Polymers**. Guangzhou, China, v. 129, p.35-43, 20 set. 2015.

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

ANJUM, A.; ZUBER, M.; ZIA, K. M.; NOREEN, A.; ANJUM, M. N.; TABASUN, S. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. **International Journal Of Biological Macromolecules**. [s. l.], p. 161-174. abr. 2016.

APATI, G. P. **Síntese, caracterização e degradação de P(3HB) por *Cupriavidus necator*, utilizando glicerol como substrato**. 212. 154 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Química, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. Biotecnologia industrial. 9 edição. Edgard Blucer Ltda., 1998.

ARAGÃO, G. M. F. **Production de poly-beta-hydroxyalkanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures**. 1996. 205 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Génie Biochimique Et Alimentaire, INSA, 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**. [s. l.], p. 937-942. ago. 1996.

ARAGÃO, V.; ARAGÃO, V. R.; VELOSO, V. H. S. Produção E Reciclagem Do Lixo Com Foco Em Resíduos Plásticos. **Revista Monografias Ambientais**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 3075–3081, 2014. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/remoa/article/view/11043>>.

ASEMI, Z.; DARZI, G. N.; BAEI, M. S. Media optimization for poly-(beta-hydroxybutyrate) production using *Azotobacter beijerikinckii*. **International Journal Of Polymeric Materials**. [s. l.]. p. 265-269. 07 maio 2012.

ASHTER, Syed Ali. **Introduction to bioplastics engineering**. [s.l.]: Elsevier, 2016. 286 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO PLÁSTICO (ABIPLAST) (Brasil). **Os plásticos**. Disponível em: <<http://abiplast.org.br/site/os-plasticos>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMBALAGEM (ABRE) (Brasil). **Relatórios de mercado e publicações**. Disponível em: <<http://www.abre.org.br/setor/documentos/>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

AVELLA, M.; MARTUSCELLI, E.; RAIMO, M. Properties of blends and composites based on poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHBV) copolymers. **Journal Of Materials Science**. [s. l.], p. 523-545. 2000.

AXE, D. D.; BAILEY, J. E. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **Biotechnology And Bioengineering**. [s. l.], p. 8-19. 1995.

AZIZI, N.; NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H. Acid pretreatment and enzymatic saccharification of brown seaweed for polyhydroxybutyrate (PHB) production using *Cupriavidus necator*. **International Journal Of Biological Macromolecules**. [s. l.], p. 1029-1040. 3 abr. 2017.

BAEI, M. S.; NAJAFPOUR, G. D.; YOUNESI, H.; TABANDEH, F.; ISSAZADEH, H.; KHODABANDEH, M. Growth kinetic parameters and biosynthesis of polyhydroxi-butyrato in *Cupriavidus necator* DSMZ 545 on selected substrates. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, [s. l.], v. 1, n. 17, p.1-8, jan. 2011.

BBC. **Natureza: Mais de 95% do lixo nas praias brasileiras é composto por plástico**. 2018. Disponível em: <<https://g1.globo.com/natureza/noticia/mais-de-95-do-lixo-nas-praias-brasileiras-e-composto-por-plastico-indica-estudo.ghtml>>. Acesso em: 23 jan. 2018.



BETTANI, S. R.; RAGAZZO, G. O.; SANTOS, N. L.; KIECKBUSCH, T. G. Sugarcane vinasse and microalgal biomass in the production of pectin particles as an alternative soil fertilizer. **Carbohydrate Polymers**. [s. l.], p. 322-330. jan. 2019.

BIOCYCLE (São Paulo). **EMPRESA**. Disponível em: <<http://www.biocycle.com.br/site.htm>>. Acesso em: 03 mar. 2018.

BOEIRA, C. Z. **Produção de PHB por *Cupriavidus necator* recombinante em glicerina e vinhaça**. 2018. Universidade Federal de Santa Catarina, [s. l.], 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Produção**. 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia/arquivos-precos/producao-brasileira-de-cana-de-acucar-acucar-e-etanol.pdf/view>>. Acesso em: 28 dez. 2018.

BRASILEIROS, Melãos. **Safra 2017/18 de cana de açúcar no Brasil**. 2017. Disponível em: <<https://melacos.com.br/noticias/safra-201718-de-cana-de-acucar-comeca-no-brasil>>. Acesso em: 17 out. 2018.

CALIL NETO, A.; GUIMARÃES, M. J. O. C.; FREIRE, E. Business models for commercial scale second-generation bioethanol production. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 184, p. 168–178, 2018.

CARRILHO, E. N. V. M.; LABUTO, G.; KAMOGAWA, M. Y. Destination of vinasse, a residue from alcohol industry: Resource recovery and prevention of pollution. In: PRASAD, M. N. V.; SHIH, Kaimin. **Environmental materials and waste: Resource recovery and pollution prevention**. [s.l.]: Academic Press, 2016. p. 21-43.

CAVALHEIRO, J. M. B. T.; 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, n. 5, p. 509–515, 2009.

CETREL. **Bioenergia**. 2011, Disponível em: <[www.cetrel.com.br/bioenergia.aspx](http://www.cetrel.com.br/bioenergia.aspx)>. Acesso em 11 fev. 2018.

CHAKRABORTY, P.; GIBBONS, W.; MUTHUKUMARAPPAN. Conversion of volatile fatty acids into polyhydroxyalkanoate by *Ralstonia eutropha*. **Journal Of Applied Microbiology**. [s. l.], p. 1996-2005. jan. 2009.

CHEN, Y. G.; YANG, H.; ZHOU, Q.; CHEN, J. Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by surfactant-chelate aqueous system. **Process Biochemistry**. [s. l.], v. 34, p. 153-157. fev. 1999.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; ESCHER, J. P.; CORREIA, J. E.; MARINO, J. F. U. Sugar vinasse: Enviromental implications of its use. **Waste Management**. [s. l.], p. 2752-2761. dez. 2013.

CHUA, H.; YU, P. H.; LO, W. Accumulation of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate in *Alcaligenes eutrophus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology** [s. l.], p. 929-935. 1998.

COELHO, J. R. R. (São Paulo). Abiplast. **Perfil 2015**. São Paulo, 2016. 78 p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Utilização de restilo como fertilizante em solos cultiváveis com cana-de-açúcar**: relatório final. São Paulo, SP, 1982.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Perfil do setor do açúcar e do álcool no Brasil: edição para a safra 2009-2010**. Disponível em <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em 04 fev. 2018.

DE OLIVEIRA, A. R.; BUZATO, J. B.; HAULY, M. C. O. Produção contínua de ácido lático por *Lactobacillus curvatus* a partir de melão de cana-de-açúcar suplementado. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, Pr, p. 53-59. jan. 2005.

DOI, Y.; KITAMURA, S.; ABE, H. Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Macromolecules**, [s. l.], v. 28, n. 14, p. 4822-4828, 1995.

DONG, W.; MA, P.; WANG, S.; CHEN, M. Effect of partial crosslinking on morphology and properties of the poly(beta-

hydroxybutyrate)/poly(D,L-lactic acid) blends. **Polymer Degradation And Stability**. [s. l.], p. 1549-1555. set. 2013.

DSMZ, Leibniz-institut. *Cupriavidus necator* DSM 545 **Catalogue**. Disponível em: <<https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-545.html>>. Acesso em: 17 out. 2018.

DURNIN, G.; COMBURG, J. M.; YEATES, Z.; ALVAREZ, P. J. J. Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 1, p. 148–161, 2009.

EMÍDIO, J. E. **Hidrólise enzimática na fabricação de melado de cana-de-açúcar**. 2016. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agroecologia e Desenvolvimento Rural, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2016.

ENZYME EDUCATION INSTITUTE (EED). **Enzyme technical data sheet: Invertase**. Disponível em: <<https://enzymeeducationinstitute.com/enzymes/invertase/>>. Acesso em: 18 out. 2018.

ENZYME. **Enzyme technical data sheet: invertase**. [2017]. Disponível em: <<https://enzymeeducationinstitute.com/enzymes/invertase/>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

FARIAS, D. **Produção e caracterização de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Cupriavidus necator* em melão de cítrico**. 2009. 195 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

FIORESE, N. L. **Estratégias de cultivo e recuperação e caracterização de poli (3-hidroxibutirato) produzido por *Ralstonia eutropha***. 2008. Universidade Federal de Santa Catarina, [s. l.], 2008.

FISCHER, J. J.; AOYAGI, Y.; ENOKI, M.; DOI, Y.; IWATA, T. Mechanical properties and enzymatic degradation of poly([R]-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) uniaxially cold-drawn

films. **Polymer Degradation And Stability**, [s. l.], v. 83, p.453-460, 2004.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L.; ZAIAT, M. Seasonal characterization of sugarcane vinasse: Assessing enviromental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion. **Science Of The Total Enviroment**. [s. l.], p. 29-40. set. 2018.

GARCIA, M. C. F. **Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* e seu efeito sobre as características do polímero**. 2006. 158 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

GARCIA-GARCIA, D.; FERRI, J. M.; LOPEZ-MARTINEZ, J.; BALART, R. Processing and characterization of binary poly(hydroxybutyrate (PHB) and poly(caprolactone) (PCL) blends with improved impact properties. **Polymer Bulletin**. S. L., p. 3333-3350. dez. 2016.

GOMES, G. R.; RAMPON, D. S.; RAMOS, L. P. Production of 5-(hydroxymethyl)-furfural from water-soluble carbohydrates and sugarcane molasses. **Applied Catalysis A: General**, [s.l.], v. 545, p.127-133, 05 set. 2017.

GOTTSCHALK, G.; EBERDARDT, U.; SCHLEGEL, H. G.. Verwertung von fructose durch *Hydrogenomonas* H16 (I). **Archiv fur Mikrobiologie**, p. 95-108. 1964.

GOULARTE, P. G. **Comparação da produção de poli-hidroxibutirato por *Cupriavidus necator* parental e recombinante a partir de glicerol e glicose combinados**. 2018. Universidade Federal de Santa Catarina, [s. l.], 2018.

GROUSSEAU, E. **Potentialités de production de Poly-Hydroxy-Alcanoates chez *Cupriavidus necator* sur substrats de type acides gras volatils: études cinétiques et métaboliques**. 2012. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse), [s. l.], 2012.

GUIMARÃES, T. R. . **Caracterização de poli(3-hidroxi-bu-tirato) produzido por *Cupriavidus necator* a partir de glicerol e glicose.** 2017. 63 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

HAFUKA, A.; SAKAIDA, K.; SATOH, H.; TAKAHASHI, M.; WATANABLE, Y.; OKABE, S. Effect of feeding regimens on polyhydroxybutyrate production from food wastes by *Cupriavidus necator*. **Bioresource Technology**. [s. l.], p. 3551-3553. fev. 2011.

HASS, C.; STEINWANDTER, V.; APODACA, E. D.; MADURGA, B. M.; SMERILLI, M., DIETRICH, T.; NEUREITER, M. Production of PHB from chicory roots: comparison of three *Cupriavidus necator* strains. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, [s. l.], v. 2, n. 29, p.99-112, 2015.

HAULY, M. C. O.; OLIVEIRA, A. R.; OLIVEIRA, A. S. Lactic acid production by *L. curvatus* in sugarcane molasses. **Seina: Ciências Agrárias**, Londrina, Pr, v. 24, n. 1, p.133-142, jan. 2003.

HOLT, J. G.; BERGEY, D. H.; **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 9 edição. Williams and Wilkins, 1994.

HOTTLE, T. A.; BILEC, M. M.; LANDIS, A. E. Sustainability assessments of bio-based polymers. **Polymer Degradation And Stability**. [s. l.], p. 1898-1907. jun. 2013.

HUH, M.; JUNG, M. H.; PARK, Y. S.; KIM, B.; KANG, M. S.; HOLDEN, P. J.; YUN, S. I. Effect of carbon nanotube functionalization on the structure and properties of poli(3-hydroxybutyrate)/MWCNTs biocomposites. **Macromolecular Research**. [s. l.], p. 765-772. jul. 2014.

IENCZAK, J. L. **Estratégia de cultivo em alta concentração celular para a produção de poli(3-hidroxi-bu-tirato) em substratos com moderada concentração da fonte de carbono.** 2011. Universidade Federal de Santa Catarina, [s. l.], 2011.

IENCZAK, J. L.; SCHMIDELL, W.; DE ARAGÃO, G. M. F. High-cell-density culture strategies for polyhydroxyalkanoate production: A

review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 40, n. 3–4, p. 275–286, 2013.

IENCZAK, J. L.; SCHMIDT, M.; QUINES, L. K.; 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 mMedium with low carbon source concentration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. [s. l.], p. 408-417. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS (IPT) (Brasil). Celso Lellis Bueno Netto; Américo Martins Craveiro; José Geraldo da Cruz Pradella. **Processo para produzir polihidroxicanoatos a partir de açúcares extraídas da cana de açúcar**. BR nº PI 9103116 A, 16 jul. 91, 24 fev. 1993.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA (IPEA). **Diagnóstico dos Resíduos Sólidos Urbanos: Relatório de Pesquisa**. Brasília: IPEA, 2012.

ISO 1871. **Food and feed products: General guidelines for the determination of nitrogen by the Keldhal method**. 2. ed. Geneva: Is, 2009.

IWATA, T.; FUGITA, M.; AOYAGI, Y.; DOI, Y.; FUJISAWA, T. Time-resolved x-ray diffraction study on poly[(R)-3-hydroxybutyrate] films during two-step-drawing: Generation mechanism of planar zigzag structure. **Biomacromolecules**. [s. l.], p. 1803-1809. abr. 2005.

JUNG, M. Y.; PARK, B. S.; LEE, J.; OH, M. K. Engineered *Enterobacter aerogenes* for efficient utilization of sugarcane molasses in 2,3-butanediol production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 139, p. 21–27, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.003>>.

KAWAGUCHI, H.; OGINO, C.; KONDO, A. Microbial conversion of biomass into bio-based polymers. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 245, p. 1664–1673, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.135>>.

KE XU, P. X. Efficient production of l-lactic acid using co-feeding strategy base on cane molasses/glucose carbon sources. **Bioresource Technology**. [s.l.], p. 23-29. fev. 2014.

KELLEY, A. S.; SRIENC, F. Production of two phase polyhydroxyalkanoic acid granules in *Ralstonia eutropha*. **International Journal Of Biological Macromolecules**. [s. l.], p. 61-67. jun. 1999.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K.. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, 20, 609-619. 2005.

KHATIWADA, D.; VENKATA, B. K.; SILVEIRA, S.; JOHNSON, F. X. Energy and GHG balances of ethanol production from cane molasses. **Applied Energy**, [s.l.], v. 164, p.756-768, 15 fev. 2016.

KOLLER, M.; BRAUNEGG, G. Advanced approaches to produce polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable and economic fashion. **The EuroBiotech Journal**, [s. l.], 14 abr. 2018. 2, p. 89.

KOLLER, M.; MARSÁLEK, L.; DIAS, M. M. S.; BRAUNEGG, G. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolymers in a sustainable manner. **New Biotechnology**. [s. l.], p. 27-38. 2017.

KOLLER, M.; SALERNO, A.; DIAS, M. M. S.; REITERER, A. Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review. **Food Technology and Biotechnology** [s. l.], p. 255-269. maio 2010.

KONIG, C.; SAMMLER, I.; WILDE, E.; SCHLEGEL, H. G.. Konstitutive glucose-6-phosphat-dehydrogenase bei glucose verwertenden mutaten von einem kryptischen wildstamm", [s. l.] **Archives of Microbiology**. 1969.

KOYAMA, Mirian Harumi et al. Kinetics of thermophilic acidogenesis of typical Brazilian sugarcane vinasse. **Energy**. S. L., p. 1097-1103. dez. 2016.

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**. [s. l.], p. 240-245. mar. 2009.

KULSHRESTHA, S.; TYAGI, P.; VINITA, S.; YADAVILLI, K. S. Invertase and its applications: A brief review. **Journal of Pharmacy Research**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 792–797, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0974694313002934>>.

LAIME, E. M. O.; FERNANDES, P. D.; OLIVEIRA, D. C. S.; FREIRE, E. A. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Eduardo Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. [s. l.], p. 16-29. jan. 2011.

LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D. Effects of pH and acetic-acid on glucose and xylose metabolism by a genetically-engineered ethanologenic *Escherichia coli*, **Applied Biochemistry And Biotechnology**, p. 301-322. 1993.

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

LYKIDIS, A.; PÉRES-PANTOJA, D.; LEDGER, T.; MAVROMATIS, K. ANDERSON, I. J.; IVANOVA, N.; HOOPER, S. D.; PALIDUS, A.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ, B.; KYRPIDES, N. C. The complete multipartite genome sequence of *Cupriavidus necator* JMO134, a versatile pollutant degrader. **Plos one**, v. 5. 22 mar.2010.

MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substratos de baixo custo e ácido propiônico**. 2000. 220 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

MARANGONI, C.; FURIGO, A.; 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**, [s. l.], v. 38, p.137-141, 17 out. 2001.



MARTINHAGO, F. M.; STEFFEN, W. F.; SANTOS, E. C.; ZANFONATO, K.; QUINES, L. K. M.; SCHMIDT, M.; GAI, C. S.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F. Utilização de vinhaça para a produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator*. **Blucher Chemical Engineering Procedures**. São Paulo, p. 1-6. dez. 2014.

MELO, F. A. D. **Contribuição ao estudo cinético da produção de polissacarídeos extracelulares por *Zoogloea sp.* em Melaço de cana-de-açúcar**. 2003. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Química, Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

MIRZAEI, M.; MIRDAMADI, S.; EHSANI, M. R.; AMINLARI, M.; HOSEINI, S. E. Characterization of Yeast Protein Enzymatic Hydrolysis and Autolysis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of FoOd Biosciences and Technology**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 19–30, 2015.

MOREIRA, J. R; GOLDEMBERG, J. The alcohol program. **Energy Policy**, [s.l.], v. 27, n. 4, p.229-245, abr. 1999. Elsevier BV.oie

MORINAGA, Y.; YAMANAKA, S.; ISHIZAKI, A.; HIROSE, Y. Growth characteristics and cell composition of *Alcaligenes eutrophus* in chemostat culture. **Agric. Biol. Chem.** [s. l.], p. 439-444. jan. 1978.

NAJAFPOUR, G. D.; SHAN, C. P. Enzymatic hydrolysis of molasses. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 86, p.91-94, jan. 2003.

NAKATA, H.; TAMURA, M.; SHINTANI, T.; GOMI, K. Evaluation of baker's yeast strains exhibiting significant growth on Japanese beet molasses and compound analysis of molasses types. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**. Japão, p. 715-719. jun. 2014.

NEVES, A. L. p. **Uso de enzimas na extração de polihidroxialcanoatos sintetizados por *Cupriavidus necator***. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

OLIVEIRA, A. r.; BUZATO, J. B.; HAULY, M. C. O.. Utilization of supplemented sugarcane molasses for continuous production of lactic

acid by *Lactobacillus curvatus*. **Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 53–60, 2005.

OLIVEIRA, F. C.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by solid-state fermentation with *Ralstonia eutropha*. **Biotechnol. Lett.** S. L., p. 1851-1855. 2004.

OLIVEIRA, F. C.; DIAS, M. L.; CASTILHO, L. F.; FREIRE, D. M. Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**. [s. l.], p. 633-638. jan. 2007.

OLIVEIRA, R. F. O.; SOUSDALEFF, M.; LIMA, M. V. S.; LIMA, H. O. S. Produção fermentativa de ácido láctico a partir de melão de cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. **Brazilian Journal Of Food Technology**. São Paulo, p.34-40, 2009.

PAKALAPATI, H.; CHANG, C.; SHOW, P. L.; ARUMUGASAMY, S. K.; LAN, J. C. Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 126, n. 3, p. 282–292, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.016>>

PANDEY, A.; SINGHANIA, R. Production and application of industrial enzymes. **Chemical Industry Digest**. [s. l.]. v. 21, p. 81-98. jan. 2008.

PAVAN, F. A. **Análise de viabilidade econômica da produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* a partir de melão cítrico**. 2015. 187 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

PHILLIP, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polihydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. **Journal Of Chemical Technology And Biotechnology**. [s. l.], p. 233-247. 7 mar. 2007.

PINTO, R. O. **Produção de poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)) por *Ralstonia eutropha* em substratos de baixo custo: estudo de diferentes estratégias de limitação de crescimento**. 1999. 128 f. Dissertação

(Mestrado) - Curso de Engenharia de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.

PLASTICS NZ (Nova Zelândia). **Bioplastics & Degradables**. 201. Disponível em: <<http://www.plastics.org.nz/environment/bioplastics-degradables>>. Acesso em: 10 out. 2018.

PLASTIVIDA (Brasil). **Artigos e publicações**. Disponível em: <<http://www.plastivida.org.br/index.php/conhecimento/artigos-e-publicacoes?lang=pt>>. Acesso em: 23 jan. 2018b.

PLASTIVIDA. **Mitos e fatos sobre os plásticos oxidobiodegradáveis**. 2008. Disponível em: <<http://www.plastivida.org.br/images/temas/mitos-e-fatos-sobre-os-plasticos-oxi-degradaveis.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

POHLMANN, A.; FRICKE, W. F.; REINECKE, F.; KUSIAN, B.; LIESEGANG, H.; CRAMM, R.; EITINGER, T.; EWERING, C.; POTTER, M.; SCHWARTZ, E.; STRITTMATTER, A.; GOTTSCHALK, G.; STEINBUHEL, A.; FRIEDRICH, B.; BOWIEN, B. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1257–1262, 2006.

POSSIGNOLO, N. V.; ALVES, K. A. S.; BARRETO, T. M.; VITTI, A. C. Caracterização da vinhaça in natura e concentrada para viabilização da mistura de fontes nitrogenadas. **Ciência e Inovação - Fam**, Americana, SP, v. 2, n. 1, p.29-39, dez. 2015.

PRADELLA, J. G. C. Cengro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. São Paulo: CGEE, 2006. 120 p.

PRADO, J. M.; PEREZ, D. L.; FORSTER-CARNEIRO, TANIA.; ROSTAGNO, M. Sub- A and supercritical water hydrolysis of agricultural and food industry residues for the production of fermentable sugars: A review. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 98, p. 95–123, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2015.11.004>>.

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 polydihydroxybutyrate by *Haloarcula marismortui*. **Folia Microbiol.** [s. L.], p. 71-79. jan. 2012.

QUINES, L. K. M. **Extração de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* DSM 545 com 1,2-carbonato de propileno.** 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

QUINES, L. K. M. **Extração de poli(3-hidroxibutirato), produzido por *Cupriavidus necator*, utilizando carbonato de propileno combinado com métodos mecânicos.** 2015. 239 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

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

RAMSAY, B. A. Physiological factor affecting PHA production. Physiology, kinetics production and use of biopolymers. **Proceedings**, 9-7, Austria, 1994.

ROBERTIELLO, A. Upgrading of agricultural and agro-industrial wastes: The treatment of distillery effluents (vinasses) in Italy. **Agricultural Wastes**. S. L., p. 387-395. set. 1982.

ROCHA FILHO, J. A.; VITOLO, M. **Guia para aulas práticas de biotecnologia de enzimas e fermentação.** São Paulo: Blucher, 2017.

RODRIGUES, R. C. **Condições de cultura para a produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de indústrias de alimentos.** 2005. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

RODRIGUEZ-PEREZ, S.; SERRANO, A.; PANTIÓN, A. ; ALONSO-FARINAS, B. Challenges of scalin-up PHA production from waste streams: A review. **Journal Of Enviromental Manegement**. [s. l.]. p. 215-230. jan. 2018.

ROMÃO, B. B.; SILVA, F. B.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. Ethanol production from hydrolized soybean molasses. **Energy Fuels**. [s. l.], p. 2310-2316. mar. 2012.

ROMÃO, B. B. **Produção De Etanol Por Hidrólise Ácida De Melaço De Soja**. 2011. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

RUAN, W.; CHEN, J.; LUN, S. Production of biodegradable polymer by *A. etrophus* using volatile fatty acids from acidified wastewater. **Process Biochemistry**. [s. L.], p. 295-299. nov. 2003.

SAHU, O. Assessment of sugarcane industry: Suitability for production, consumption, and utilization. **Annals of Agrarian Science**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 389–395, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S151218871830068X>>.

SALMOND, C. V.; KROLL, R. G.; BOOTH I. R.. The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**. p. 2845-2850. nov. 1984.

SANTIAGO, P. A. **Contribuição ao estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação e Engenharia Química, Uberlândia, 2002.

SANTOS, D. P. **Produção de Poli(hidroxialcanoatos) a partir de glicerol**. 2009. Universidade Federal do Rio de Janeiro, [s. l.], 2009.

SCHLEGEL, H. G.; EBERHARDT, U. Regulatory phenomena in the metabolism of *Knallgasbacteria*. **Advances in Microbial Physiology**. [s. l.], v. 7, p. 205-242. 1972.

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. Q.; ZANFONATO, K. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production in a system with external cell recycle and limited nitrogen feeding during the production phase. **Biochemical Engineering Journal**. [s. l.], p. 130-135. 15 jul. 2016.

SCHMIDT, M.; QUINES, L. K. M.; ZANFONATO, K.; STEFFEN, W. F.; GUIMARÃES, T. R.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F. **Predição da concentração celular a partir da velocidade de respiração e validação em cultivos visando a produção de Poli (3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator***. In: XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS 2015, Fortaleza. **Anais**. Fortaleza

SCHMIDT, M. **Produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* DSM 545 em meio suplementado com óleo de soja mintemulsionado**. 2011. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

SCHNEIDER, A.; PARIZE, D. D. S.; GARCIA, M. C. F.; GRIGULL, V. H. Biodegradation of Poly(3-Hydroxybutyrate) Produced from *Cupriavidus necator* with Different Concentrations of Oleic Acid as Nutritional Supplement. **Journal of Polymers and the Environment**. [s. l.], p. 401-406. Set. 2010.

SEN, Khok Y.; HUSSIN, M. H.; BAIDURAH, S.. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**. [s. l.], p. 51-59. jan. 2019.

SEOANE, I.; FORTUNATI, E.; PUGLIA, D.; CYRAS, V. P. Development and characterization of bionanocomposites based on poly(3-hydroxybutyrate) and cellulose nanocrystals for packaging applications. **Polymer International**. [s. l.], p. 1046-1053. maio 2016.

SHARMA, M.; PATEL, S. N.; LATA, K.; SINGH, U.; KRISHANIA, M.; SANGWAN, R. S.; SINGH, S. P. A novel approach of integrated

bioprocessing of cane molasses for production of prebiotic and functional bioproducts. **Bioresource Technology**. [s.l.], p. 311-318. nov. 2016.

SHI, H. D.; SHIRAIISHI, M.; SHIMIZU. Metabolic flux analysis of poly(beta-hydroxybutyric acid) in *Alcanigenes eutrophus* from various carbon sources. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. [s. l.], p. 579-587. 1997.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Quim. Nova**. [s. l.], p. 1732-1743. ago. 2007.

SILVA, P. F. **Produção de biopolímero por *Bacillus sp.* utilizando substrato não convencional**. 2016. 52 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

SINDHU, R.; GNANSOUNOU, E.; BINOD, P.; PANDEY, A. Bioconversion of sugarcane crop residues for value added products: An overview. **Renewable Energy**. [s. l.] p. 203-215. dez. 2016.

SIVAKUMAR, K.; SHREE, C. G.; PALANI, P. Polyhydroxybutyrate by *Streptomyces sp.*: Production and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 104, p. 1165–1171, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.028>>.

SOLAIMAN, D. K.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly-hydroxialkanoates. **Appl Microbiol Biotechnol**, Springer-verlag, n. 71, p.783-789, 18 maio 2006.

SOMIARI, R. I.; BIELECKI, S. Effect of fructose and glucose supplementation on invertase mediated synthesis of oligosaccharides from sucrose. **Biotechnology Letters**. [s. l.], p. 519-524. maio 1995.

SOUKOULIS, C.; TZIA, C. Grape, raisin and sugarcane molasses as potential partial sucrose substitutes in chocolate ice cream: A feasibility study. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 76, p. 18–29, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.08.004>>.

STEINBUCHER, A.; PIEPER, U. Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of *Alcaligenes eutrophus*. **Applied Microbiological Biotechnology**, [s. l.], v. 37, p.1-6, 1992.

STOLZ, H. N. P. **Invert Sugar from Sugar Cane Molasses - A Pilot Plant Study**. 2005. Dissertação (Mestrado) - University of Stellenbosch, 2005.

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, p. 2808-2818, 2012.

TECLU, D.; TIVCHEV, G.; LAING, M.; WALLIS, M. Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 161, n. 2-3, p. 1157-1165, 2009.

TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. Inverted sugar syrup attained from sucrose hydrolysis using a membrane reactor. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 46, 2010.

TRIGUEIROS, D. E. G.; HINTERHOLZ.; FIORESE, M. L.; ARAGÃO, G. M. F. Statistical evaluation and discrimination of competing kinetic models and hypothesis for the mathematical description of poly-3(hydroxybutyrate) synthesis by *Cupriavidus necator* DSM 545. **Chemical Engineering Science**. [s. l.], p. 20-33. 16 mar. 2017.

TRIPATHI, A. D.; SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, R. P. Statistical optimization of physical process variables for bio-plastic (PHB) production by *Alcaligenes* sp. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 55, p. 243-250, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.02.017>>.

UFSC, CITROSUCO (Brasil). Gláucia Maria Falcão de Aragão; Willibaldo Schmidell; Jaciane Lutz Ienczak. **Processo de obtenção de PHB a partir de resíduo cítrico**. BR nº PI 0801845-6, 09 jun. 2008, 23 fev. 2010.



UNIÃO DOS PRODUTORES DE BIOENERGIA (UDOP) (São Paulo). **Fluxogramas de Produção de Açúcar e Álcool**. Disponível em: <<http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=29960>>. Acesso em: 15 dez. 2018.

UNICA. **ETHANOL SUMMIT 2017**: Novas diretivas do protocolo agroambiental do setor socioenergético são lançadas. 2017. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/3986412592033266204/ethanol-summit-2017-por-cento3A-novas-diretivas-do-protocolo-agroambiental-do-setor-sucroenergetico-sao-lancadas/>>. Acesso em: 05 jan. 2018.

USP, Jornal da. **Resíduo da produção do etanol é matéria-prima para biogás**: Estudo avalia a utilização da vinhaça concentrada como matéria-prima para a produção de biogás. 2017. Disponível em: <<https://jornal.usp.br/ciencias/ciencias-ambientais/residuo-da-producao-de-etanol-e-materia-prima-para-biogas/>>. Acesso em: 17 out. 2018.

VERGARA-PORRAS, B.; GRACIDA-RODRÍGUES, J. N.; PÉREZ-GUEVARA, F. Thermal processing influence on mechanical, thermal, and biodegradation behavior in poly(b-hydroxybutyrate)/(poly( $\epsilon$ -caprolactona) blends: a descriptive model. **Journal Of Applied Polymer Science**. [s. l.]. maio 2016.

VOEGELE, R. T.; SWEET, G. D.; BOOS, W.. Glycerol kinase of *Eschericia coli* is activated by interaction with the glyceril facilitator. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 4, p. 1087-1094, 1993.

VRANA ŠPOLJARIĆ, I.; LOPAR, M.; KOLLER, M.; MUHR, A. 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.

WALDMAN, M. Lixo: Acertando na Cesta. **Ambiente Urbano**, Santo André, n. 38, p. 19, 01 set. 2009.

WANG, J.; YU, J. Kinetic analysis on inhibited growth and poly(3-hydroxybutyrate) formation of *Alcaligenes eutrophus* on acetate under nutrient-rich conditions. **Process Biochemistry**. [s. l.], p. 201-207. out. 2000.

WANG, Y.; SCHULTEN, K.; TAJKHORSHID, E. What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF. **Structure**, v. 13, n. 8, p. 1107–1118, 2005.

WANG, Y.; MO, W.; YAO, H.; WU, Q. Biodegradation studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Polymer Degradation And Stability**. [s. l.], p. 815-821. fev. 2004.

WANG, Y.; YIN, J.; CHEN, G. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. **Current Opinion In Biotechnology**. [s. L.], p. 59-65. dez. 2014.

WEISSENBORN, D. L.; WITTEKINDTN, N.; LARSONSII, T. J. Structure and Regulation of the glpFK Operon Encoding Glycerol. **Biochemistry**, v. 267, n. 9, p. 6122–6131, 1992.

YEO, J. C. C. et al. Recent advances in the development of biodegradable PHB-based toughening materials: Approaches, advantages and applications. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], n. October, p. 1–25, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.11.006>>

YU, J.; SI, Y. T.; WONG, W. K. T.. Kinetics modeling of inhibition and utilization of mixed volatile fatty acids in the formation of polyhydroxyalkanoates by *Ralstonia eutropha*. **Process Biochemistry**, p. 731-738.

ZANFONATO, K.; IENCZAK.; J. L.; SCHMIDT, M.; SCHMIDELL, W.; URIBELARREA, J. L.; ARAGÃO, G. M. F. Modelagem do acúmulo de poli(3-hidroxibutirato) em cultivo com *Cupriavidus necator*. In: XVIII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS 2011, Caxias do Sul. **Anais**.

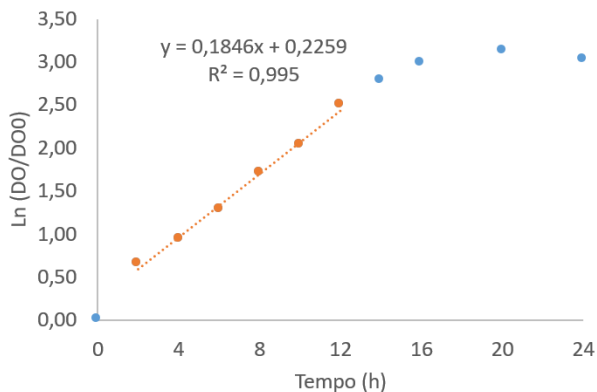
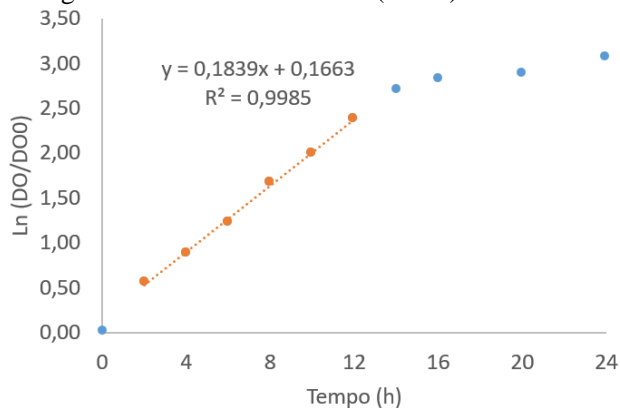
ZANFONATO, K. **Aproveitamento de subprodutos da indústria de biocombustíveis para produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha***. 2016. 149 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

ZHANG, M.; THOMAS, N. L. Blending polylactic acid with polyhydroxybutyrate: The effect on thermal, mechanical, and biodegradation properties. **Advances In Polymer Technology**. [s. L.], p. 67-79. abr. 2011.

## APÊNDICE I

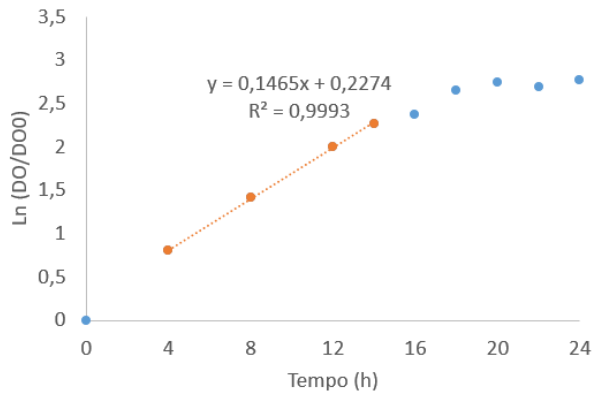
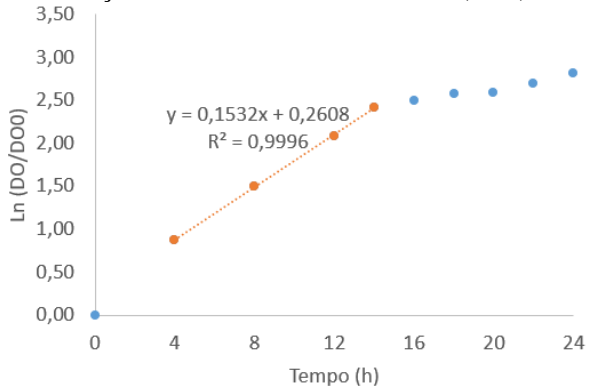
Gráficos do logaritmo neperiano da concentração de biomassa, representada pela densidade óptica a 600 nm, ao longo do tempo de cultivo utilizado para o cálculo das velocidades específicas máximas de crescimento da Etapa 1.

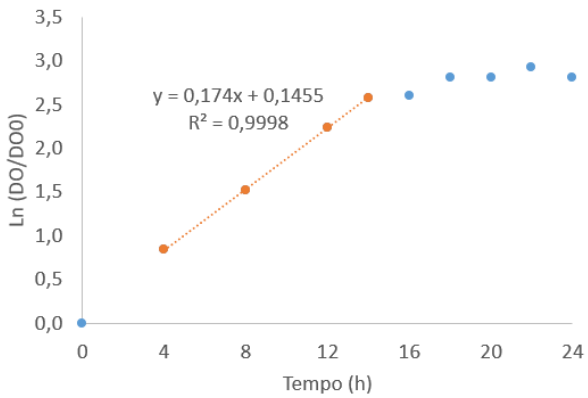
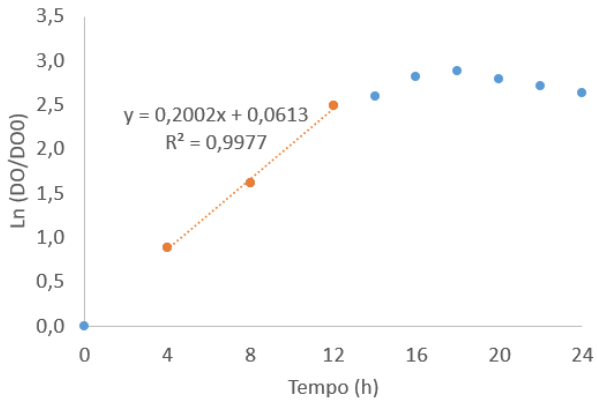
Cultivos com glicose e frutose em *shaker* (CCon).



## APÊNDICE I (continuação)

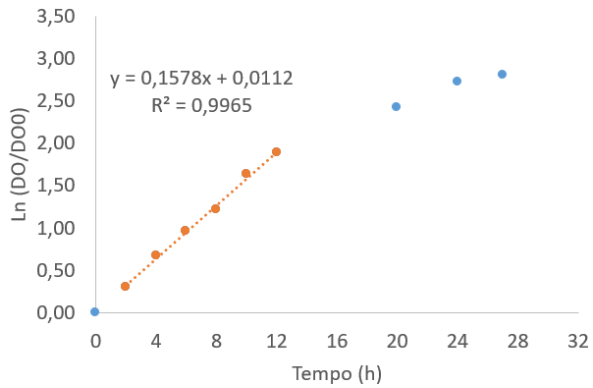
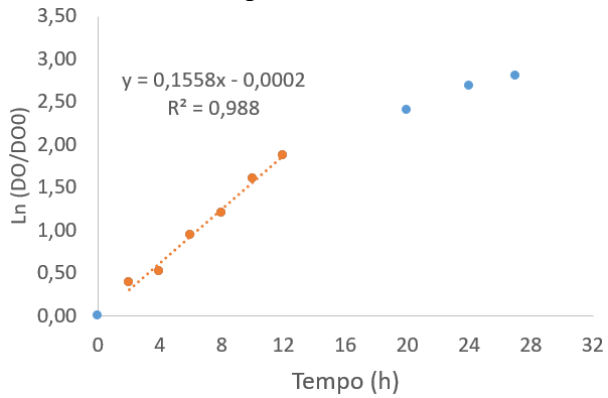
Cultivos com melão hidrolisado ácido em *shaker* (CAc).



**APÊNDICE I (continuação)**Cultivos com melão hidrolizado enzimático em *shaker* (CEnz).

## APÊNDICE I (continuação)

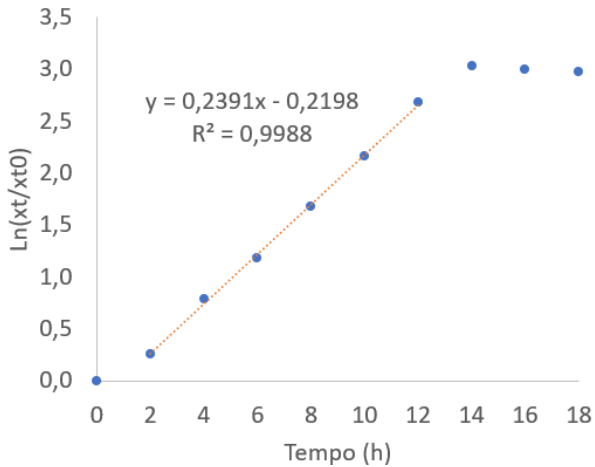
Cultivos com hidrolisado biológico em *shaker* (CBio).



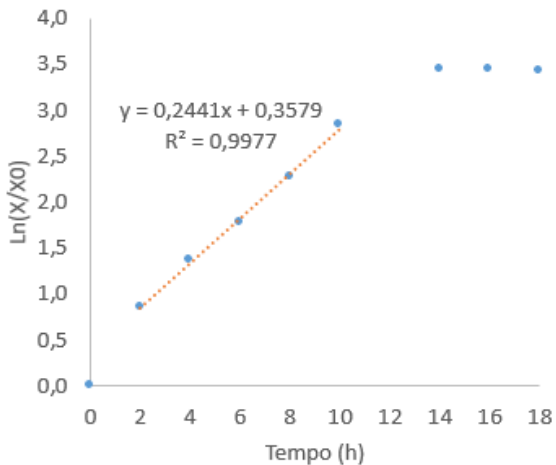
## APÊNDICE II

Gráficos do logaritmo neperiano da concentração de biomassa total ao longo do tempo de cultivo utilizado para o cálculo das velocidades específicas máximas de crescimento da Etapa 2.

Cultivo controle em biorreator (CCon)



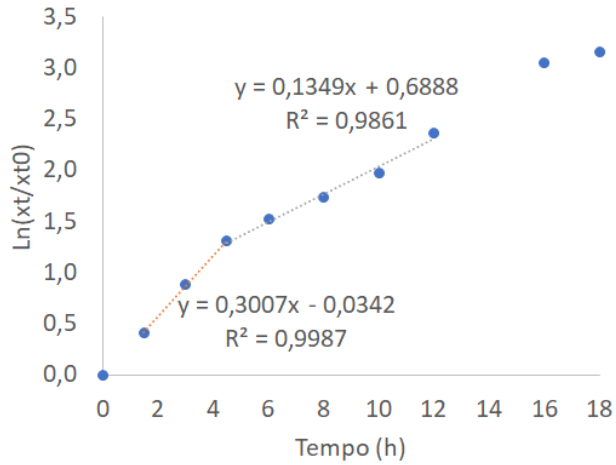
Cultivo com melão em biorreator (Cmel)





## APÊNDICE II (continuação)

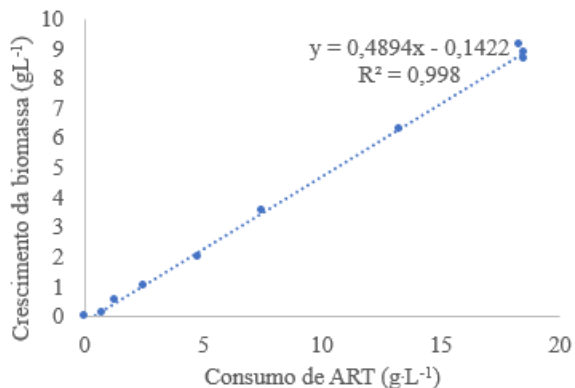
Cultivo com vinhaça e melaço em biorreator (CVinMel)



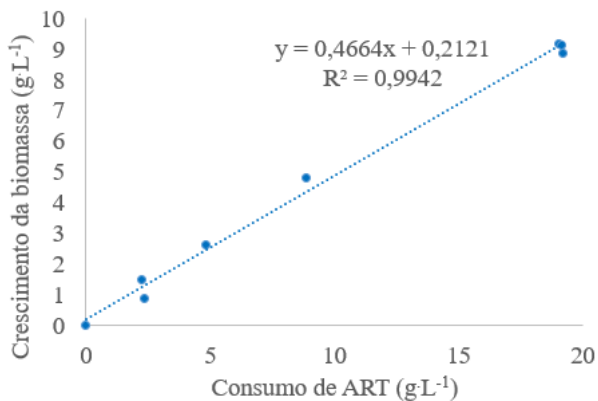
### APÊNDICE III

Gráficos de consumo de ART pelo crescimento da biomassa utilizados para o cálculo dos fatores de conversão de ART em biomassa da Etapa II.

Cultivo controle em biorreator (CCon)

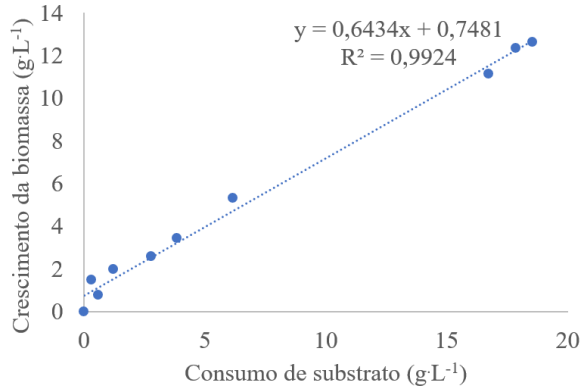


Cultivo com melão em biorreator (CMel)



### APÊNDICE III (continuação)

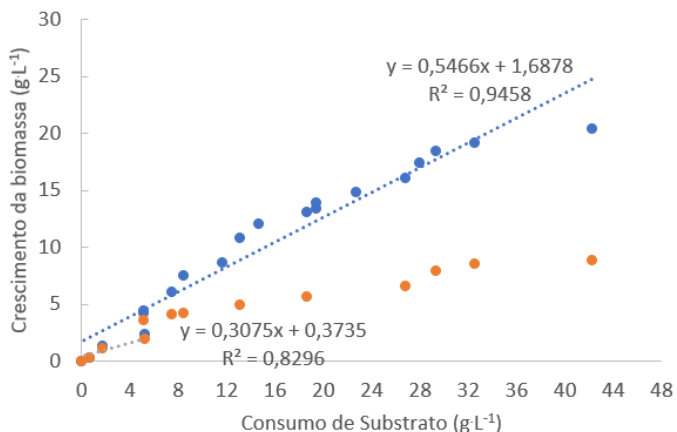
Cultivo com vinhaça e melaço em biorreator (CVinMel)



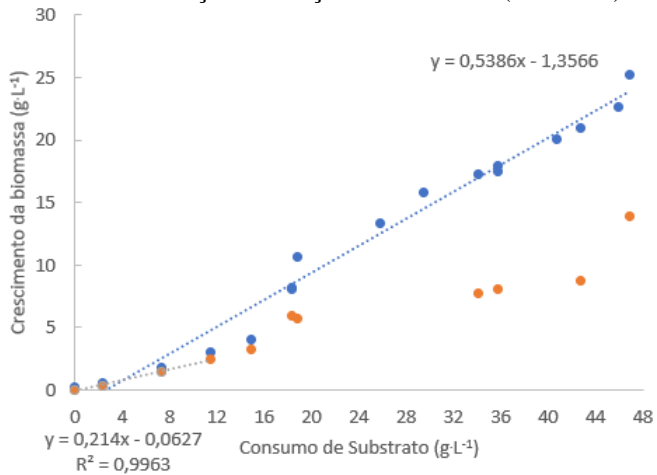
## APÊNDICE IV

Gráficos do crescimento da biomassa total (●) e residual (●) pelo consumo de substrato utilizados para o cálculo dos fatores de conversão de substrato em biomassa na Etapa III.

### Cultivo com melão em biorreator (PMel)



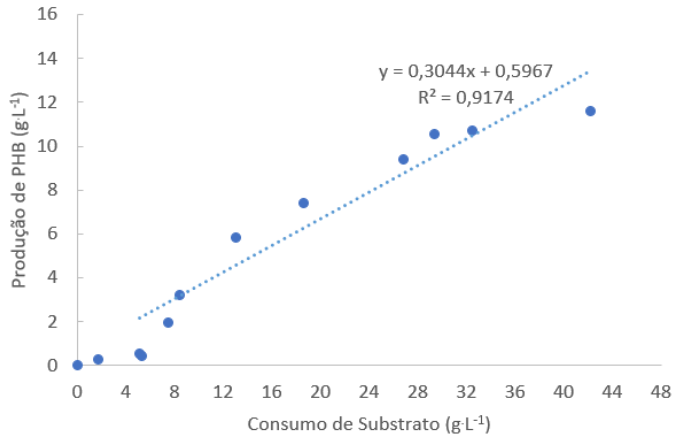
### Cultivo com melão e vinhaça em biorreator (PVinMel)



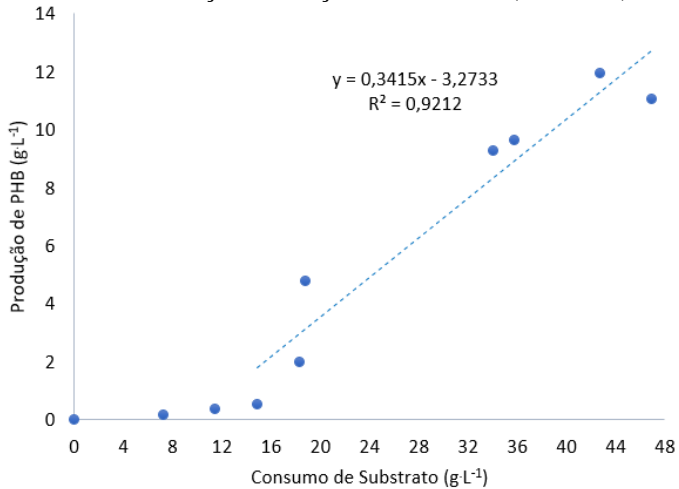
## APÊNDICE V

Gráficos da produção de PHB pelo consumo de substrato utilizados para o cálculo dos fatores de conversão de substrato em biomassa da Etapa III

Cultivo com melão em biorreator (PMel)



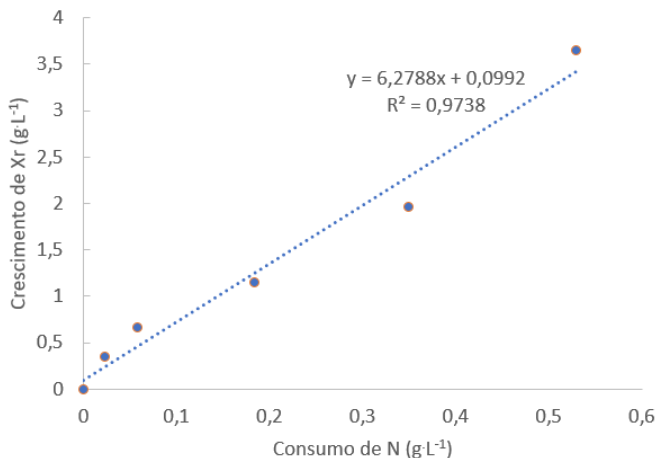
Cultivo com melão e vinhaça em biorreator (PVinMel)



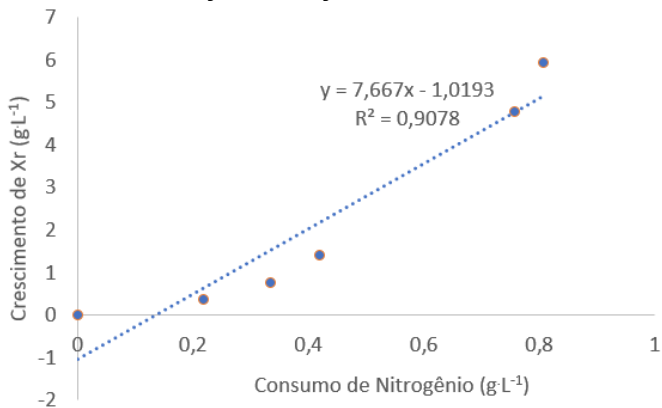
## APÊNDICE VI

Gráficos do crescimento da biomassa pelo consumo de nitrogênio utilizados para o cálculo dos fatores de conversão de substrato em biomassa da Etapa III.

Cultivo com melão em biorreator (PMel)



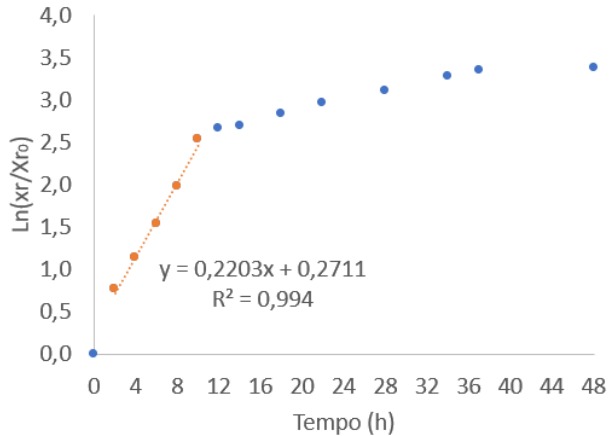
Cultivo com melão e vinhaça em biorreator (PVinMel)



## APÊNDICE VII

Gráficos do logaritmo neperiano da biomassa residual pelo tempo de cultivo, utilizados para o cálculo das velocidades específicas de crescimento máximas na Etapa III.

Cultivo com melão em biorreator (PMel)



Cultivo com melão e vinhaça em biorreator (PVinMel)

