

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO TECNOLÓGICO**  
**Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos**

**LEANDRO FINKLER**

**UTILIZAÇÃO DO POTENCIAL DE ÓXIDO-REDUÇÃO PARA O  
MONITORAMENTO DE CULTURAS DE *RALSTONIA EUTROPHA* VISANDO A  
PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO**

**FLORIANÓPOLIS – SC**  
**FEVEREIRO DE 2002.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO TECNOLÓGICO**  
**Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos**

**UTILIZAÇÃO DO POTENCIAL DE ÓXIDO-REDUÇÃO PARA O  
MONITORAMENTO DE CULTURAS DE *RALSTONIA EUTROPHA* VISANDO A  
PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos como requisito parcial para obtenção  
do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.  
Área de Concentração:

**LEANDRO FINKLER**  
**Engenheiro de Alimentos**

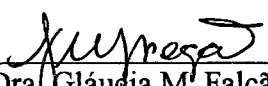
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Maria Falcão de Aragão  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Vasconcelos Antonio

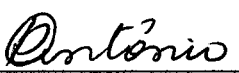
**FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2002.**

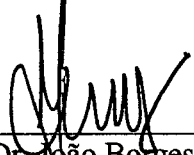
**"Utilização do Potencial de Óxido-Redução para o Monitoramento de Culturas de *Ralstonia eutropha* Visando a Produção de Polihidroxitirato"**

**Leandro Finkler**


Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área 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.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Gláucia M. Falcão de Aragão  
Orientadora

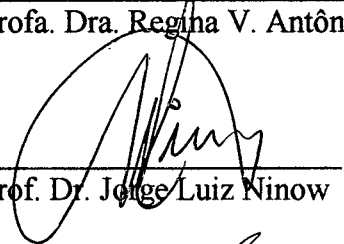
  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Regina V. Antônio  
Co-orientadora


  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Borges Laurindo  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Engenharia de Alimentos

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Gláucia M. Falcão de Aragão

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Regina V. Antônio

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior

**Florianópolis, 27 de Fevereiro de 2002**

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC

**"O destino não é uma questão de  
sorte, é uma questão de escolha;  
não é algo a se esperar, é algo a se  
conquistar."**

*William Jennings Bryan*

*"As grandes coisas não se  
realizam sem grandes  
dificuldades"*

*Voltaire*

*Aos meus pais Elio e Isolde,  
a meu irmão Cristiano e a minha irmã Francieli,  
com todo o meu amor e carinho.*

# Agradecimentos

Agradeço à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Maria Falcão de Aragão e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Vasconcelos Antonio, a orientação, amizade e apoio durante a realização deste trabalho.

Minha gratidão à Cintia Marangoni, quem me ensinou os primeiros passos nos trabalhos de laboratório e foi sempre uma presença amiga.

Minha especial e sincera gratidão àquela que sempre recordarei com bastante carinho, minha bolsista Cinthia S. De Vecchi pela ajuda e contribuição no dia a dia do laboratório, que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus colegas de turma de mestrado 2000 (Angelina, Sarita, Beatriz, Juliana, Elaine, Cleonice, Valéria, Fábio, Juan, Luis, Leandro, Fernando, Martinho, Silmar)

À todos os colegas de laboratório, aos professores e aos funcionários do DEQA que me acolheram, conviveram e contribuíram para tornar meus projetos realidade.

Aos amigos que neste curto período de minha vida tive o privilégio de conhecer.

Àqueles que sempre serão o motivo de minha andança e exemplos de vida e persistência em meus ideais, MEUS PAIS.

# Sumário

<b>Lista de Figuras</b> .....	i
<b>Lista de Tabelas</b> .....	iv
<b>Nomenclatura</b> .....	v
<b>Resumo</b> .....	vii
<b>Abstract</b> .....	viii
<b>CAPÍTULO 1. Introdução</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 2. Revisão Bibliográfica</b> .....	3
<b>2. Polihidroxicarboxilatos (PHAs)</b> .....	3
2.1. <i>Considerações gerais</i> .....	3
2.2. <i>Características e Propriedades</i> .....	5
2.3. <i>Microrganismos produtores de PHAs</i> .....	7
2.4. <i>Substratos utilizados para produção de PHAs</i> .....	7
2.5. <i>Síntese de PHAs</i> .....	8
2.5.1. <i>Síntese biotecnológica de PHAs por R. eutropha</i> .....	9
2.5.2. <i>Via metabólica para produção de PHAs</i> .....	9
2.5.3. <i>Cofatores enzimáticos e a síntese de PHAs</i> .....	10
2.6. <i>Regulação</i> .....	14
2.8. <i>Custos de Produção</i> .....	15
2.8.1. <i>Considerações Gerais</i> .....	15
2.8.2. <i>Fontes de Carbono</i> .....	16
2.8.3. <i>Desenvolvimento de novas linhagens</i> .....	16
2.8.4. <i>Técnicas de recuperação do PHA intracelular</i> .....	17
2.8.5. <i>Percentual de PHA acumulado</i> .....	17
2.9. <i>Estratégias de produção de PHAs</i> .....	18
2.9.1. <i>Produção de PHAs</i> .....	18
2.9.2. <i>Considerações gerais</i> .....	18
2.9.3. <i>Estratégias convencionais</i> .....	19
2.9.4. <i>Estratégias não convencionais</i> .....	20



2.10. <i>Perspectivas para a produção de PHAs</i> .....	20
2.11. <i>Aplicação de PHAs</i> .....	21
2.12. <i>Biodegradação dos PHAs</i> .....	22
2.13. <i>Uso do Eh para monitoramento de processos biotecnológicos</i> .....	23
2.13.1. <i>Considerações Gerais</i> .....	23
2.13.2. <i>Importância do Potencial Redox</i> .....	23
2.13.3. <i>Características do Potencial Redox</i> .....	23
2.13.4. <i>Potencial Redox e o Monitoramento do Meio de Cultura</i> .....	24
2.13.5. <i>Controle do Potencial Redox</i> .....	27
2.13.6. <i>Potencial redox e o estado fisiológico microbiano</i> .....	28
2.13.7. <i>Aplicações atuais do potencial redox</i> .....	29
<b>CAPÍTULO 3. Material e Métodos</b> .....	<b>30</b>
3.1. <i>Microrganismo</i> .....	30
3.2. <i>Meios de Cultura</i> .....	30
3.2.1. <i>Caldo Nutriente (Nutrient Broth – NB): utilizado na primeira pré-cultura que possui a seguinte composição: peptona de carne, 5,0 g/L; extrato de carne 3,0 g/L.</i> .....	30
3.2.2. <i>Meio Mineral (MM): utilizado na segunda pré-cultura (MM1) e como meio final (MM2). Está baseado em RAMSAY <i>et al.</i>(1990), modificado por ARAGÃO <i>et al.</i> (1996) cuja a composição é dada na Tabela 3.1.</i> .....	30
3.4. <i>Culturas em Frascos Agitados</i> .....	32
3.4.1. <i>Preparo das soluções das fontes de carbono</i> .....	32
3.4.4.1. <i>Glicose, Açúcar Invertido</i> .....	32
3.5. <i>Culturas em Biorreator</i> .....	32
3.5.1. <i>Preparo do meio de cultura</i> .....	32
3.5.1.1. <i>Solução de açúcar invertido</i> .....	32
3.5.1.2. <i>Solução de Fosfato</i> .....	33
3.5.2. <i>Preparo do Inóculo</i> .....	33
3.5.3. <i>Condições de Operação</i> .....	33
3.5.4. <i>Estratégias de Alimentação</i> .....	33
3.5.4.1. <i>Alimentação em Açúcar invertido</i> .....	33
3.6. <i>Métodos Analíticos</i> .....	34
3.6.1. <i>Amostragem</i> .....	34
3.6.2. <i>Determinação da Concentração da Biomassa</i> .....	34

3.6.2.1. Medida espectrofotométrica .....	34
3.6.2.2. Medida gravimétrica .....	34
3.6.3. Dosagem de Substratos .....	35
3.6.3.1. Açúcar Invertido .....	35
3.6.3.2. Proteínas.....	35
3.6.3.3. Dosagem de Fosfato.....	36
3.6.3.4. Dosagem de NADPH.....	37
3.6.3.5. Dosagem de P(3HB) .....	38
3.7. Tratamento de Dados.....	38
3.7.1. Ajuste dos Dados Experimentais .....	38
3.7.2. Análise Cinética.....	39
3.7.2.1. Velocidades Específicas de Crescimento .....	39
3.7.3. Produtividade Média de P(3HB).....	39
3.7.4. Produtividade Instantânea de P(3HB).....	40
<b>CAPÍTULO 4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>41</b>
4.1. Experimentos realizados.....	41
4.2. Culturas em Frascos Erlenmeyer .....	42
4.2.1. Evolução do Eh ao longo da cultura de <i>R. eutropha</i> DSM 545 utilizando glicose como substrato. ....	42
4.2.2. Evolução do Eh ao longo da cultura de <i>R. eutropha</i> DSM 545 utilizando açúcar invertido como substrato.....	44
4.2.3. Evolução do Eh ao longo das culturas para o crescimento de <i>Ralstonia eutropha</i> DSM 545 e de <i>Ralstonia eutropha</i> SAC+ utilizando açúcar invertido e suplemento de sacarose como fonte de carbono. ....	46
4.2.4. Evolução do Eh ao longo das culturas de <i>R. eutropha</i> DSM 545 utilizando resíduo do processamento de chucrute como fonte de carbono. ....	48
4.3. Avaliação do comportamento do Eh em culturas em fermentador .....	50
4.3.1. Evolução do Eh ao longo da cultura, em batelada alimentada, de <i>R. eutropha</i> DSM 545, utilizando açúcar invertido como substrato .....	50
4.3.2. Evolução do Eh ao longo da cultura, em batelada alimentada, de <i>R. eutropha</i> DSM 545, utilizando glicose como substrato.....	52
4.4. Evolução da condição óxido-redutora intracelular a partir da avaliação da coenzima NADPH em cultivos de <i>R. eutropha</i> DSM 545, sob limitação de fosfato.....	55

4.4.1. Ensaio realizado em Erlenmeyer.....	55
4.4.2. Ensaio realizado em Fermentador .....	56
4.4.3. Evolução do Eh ao longo da cultura em batelada alimentada de <i>R. eutropha</i> <i>DSM 545</i> , utilizando açúcar invertido como substrato e adição de ditioneitol (DTT) como agente redutor do meio. ....	57
<b>CAPÍTULO 5. Conclusões.....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO 6. Sugestões .....</b>	<b>62</b>
<b>CAPÍTULO 7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO 1. Teoria do Potencial Redox (Eh) .....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO 2. Curva de calibração de determinação da concentração de açúcares redutores pelo métodos do ácido 3-5-dinitrosalicílico (DNS).....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO 3. Curva de calibração de determinação da concentração de proteínas pelo método de Biureto.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO 4. Curva de calibração do poli-3-hidroxi-butirato (P(3HB)) .....</b>	<b>78</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 2.1.</b> Fluxo esquemático da via metabólica para produção de P(3HB) .....	9
<b>Figura 2.2.</b> Rede metabólica de <i>R. eutropha</i> a partir de diferentes substratos .....	11
<b>Figura 2.3.</b> NADPH produzido e consumido em diferentes fases da cultura de <i>R. eutropha</i> ( <i>A. eutrophus</i> ) H16, em batelada alimentada .....	12
<b>Figura 2.4.</b> Biossíntese de P(3HB), em <i>R. eutropha</i> , a partir de glicose, pela via Entner-Duodoroff .....	13
<b>Figura 2.5.</b> Regulação da biossíntese e degradação de P(3HB). Em condições de excesso de energia, o nível de NADH inibe a despolimerização de P(3HB) e o ciclo de Krebs (TCA). A diminuição da concentração em Co-A-sh permite que a $\beta$ -cetotiolase (acetil-CoA aciltransferase) possa catalisar a condensação de acetil-CoA em acetoacetil-CoA e assim levar à síntese de P(3HB). Em deficiência de energia, o controle move-se no outro sentido .....	15
<b>Figura 2.6.</b> Degradação de P(3HB-co-3HV) em lodo ativado aeróbico.....	22
<b>Figura 2.7.</b> Medida simultânea de diferentes parâmetros durante o crescimento da cultura de <i>Proteus vultaris</i> SG2.....	26
<b>Figura 2.8.</b> Medida simultânea de diferentes parâmetros durante o crescimento da cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> SG 511.....	26
<b>Figura 2.9.</b> Perfis de concentração de células, glicose e L-ornitina e potencial redox a 10% de concenconcentração de oxigênio dissolvido .....	29
<b>Figura 4.1.</b> Evolução do Eh (—), (ln (abs)) (●), absorvância (600 nm) (▲), P(3HB) (Δ) e pH (○), durante a cultura de <i>R. eutropha</i> DSM545, em erlenmeyer, sob limitação de nitrogênio.....	43
<b>Figura 4.2.</b> Evolução do Eh (—), produtividade instantânea (---) durante a cultura de <i>R. eutropha</i> DSM545, em erlenmeyer, sob limitação de nitrogênio.....	44
<b>Figura 4.3.</b> Evolução do Eh (—), ln (abs) (●), absorvância (600 nm) (▲) e pH (○), durante a cultura de <i>R. eutropha</i> DSM545, em erlenmeyer, sob limitação de fósforo, com açúcar invertido como fonte de carbono.....	45
<b>Figura 4.4.</b> Evolução do Eh (—), (ln (abs)) (●), absorvância (600 nm) (▲), açúcar redutor (▽) e pH (○), durante a cultura de <i>R. eutropha</i> DSM545, em Erlenmeyer, sob limitação de fosfato, com açúcar invertido e sacarose como fonte de carbono.....	47

- Figura 4.5.** Evolução do Eh (—),  $\ln(\text{abs})$  (●), absorvância (600 nm) (▲), açúcar redutor (▽) e pH (○), durante a cultura de *R. eutropha* SAC+, em Erlenmeyer, sob limitação de fosfato, com açúcar invertido e sacarose como fonte de carbono.....47
- Figura 4.6.** Evolução do Eh (—),  $\ln(\text{abs})$  (●), absorvância (600 nm) (▲), açúcar redutor (▽) e pH (○), durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em Erlenmeyer, sem condição limitante, em salmoura do processamento de chucrute. ....49
- Figura 4.7.** Evolução do Eh (—),  $\ln(X_r)$  (●), massa de fosfato (▽),  $X_t$  (▲), massa de P(3HB) (△),  $X_r$  (---), massa proteica (□), massa de açúcar redutor (▽), durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com alimentação de açúcar invertido.....51
- Figura 4.8.** Evolução do Eh (—), produtividade instantânea (---) durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com alimentação de açúcar invertido. ....52
- Figura 4.9.** Evolução de  $X_t$  (▲), massa de P(3HB) (△),  $X_r$  (—), durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com alimentação de glicose. ....53
- Figura 4.10.** Evolução do Eh (—),  $\ln(X_t)$  (●), massa de fosfato (▽) durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com glicose como fonte de carbono.....54
- Figura 4.11.** Evolução do Eh (—), produtividade instantânea de  $d(P(3HB))/dt$  (····) durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com alimentação de glicose. ....54
- Figura 4.12.** Evolução do Eh (—),  $\ln(\text{abs})$  (●) e NADPH (◊) durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em Erlenmeyer, sob carência de fósforo, com glicose como fonte de carbono. ....55
- Figura 4.13.** Evolução do Eh (—),  $\ln(X_t)$  (●), massa de fosfato (▽) e concentração de NADPH (●) durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com alimentação de açúcar invertido.....56
- Figura 4.14.** Evolução do Eh (—),  $\ln(\text{absorbância (600 nm)})$  (●), massa de fosfato ( $\text{PO}_4$ ) (▽), biomassa total ( $X_t$ ) (▲), biomassa residual (—) e massa de P(3HB) (△), durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com alimentação de açúcar invertido e adição de DTT.....58

**Figura 4.15.** Evolução da absorbância (600 nm) ( ), da concentração de NADPH ( $\diamond$ ) e da produtividade média ( $\circ$ ), durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com alimentação de açúcar invertido e adição de DTT. ....59

**Figura 4.16.** Evolução do Eh em função do tempo, sinalizando os instantes de incremento da aeração e agitação, em cultura de *R. eutropha* DSM 545, , em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com alimentação de açúcar invertido e adição de DTT. ....60

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Lista de compostos limitantes à formação de PHA .....	4
<b>Tabela 2.</b> Crescimento de <i>R. eutropha</i> e produção de P(3HB) em vários meios (24h/30°C)..	18
<b>Tabela 3.1.</b> Composição das soluções dos meios minerais (MM1 e MM2).....	31
<b>Tabela 3.2.</b> Composição da solução concentrada de oligo-elementos .....	31
<b>Tabela 3.4.</b> Seqüência para a dosagem de fosfato.....	36
<b>Tabela 4.1.</b> Alimentações realizadas durante a cultura de <i>R. eutropha</i> DSM545 em açúcar invertido.....	51
<b>Tabela 4.2.</b> Alimentação realizada durante a cultura de <i>R. eutropha</i> DSM545 em glicose....	53
<b>Tabela 4.3.</b> Alimentações realizadas durante a cultura de <i>R. eutropha</i> DSM545 em açúcar invertido.....	59

## Nomenclatura

$\mu_{\max}$ , u	velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\text{h}^{-1}$ )
abs	absorbância
Eh	potencial óxido-redutor, potencial de óxido-redução
DSM	<i>Deutsche Sammlung vor Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
PHA	polihidroxiálcanoato
P(3HB)	poli-3-hidroxi-butirato
P(3HB-co-3HV)	poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato
$Y_{S/P}$	fator de conversão substrato em produto
ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
3HV	3-hidroxi-valerato
3HB	3-hidroxi-butirato
PLA	polímeros de ácido láctico
DTT	ditiotreitól
$P_r$	produtividade média de P(3HB) ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
Q	componente que pode ser biomassa, biomassa residual ou P(3HB) (g)
rpm	rotações por minuto
S	substrato utilizado (g)
t	tempo (h)
vvm	volume de ar por volume de meio por minuto
$X_r$	biomassa residual (g)
$X_t$	biomassa total (g)
fosf	fosfato
xt	biomassa total
xr	biomassa residual
prot	proteína
subst	substrato
$\text{NAD}^+$	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)



NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NADP <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
DNS	Dinitrosalicílico

## Resumo

O homopolímero polihidroxibutirato (P(3HB)) é um poliéster acumulado no interior de células bacterianas como reserva de energia e carbono. Industrialmente, pode ser utilizado como substituto de plásticos derivados de petróleo por apresentar propriedades muito semelhantes a estes. Outra característica relevante é a sua biodegradabilidade, isto é, pode ser completamente degradado a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , uma vez que é constituído apenas por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio. A síntese de P(3HB) por *Ralstonia eutropha* ocorre a partir da via Entner-Doudoroff que gera acetil-CoA, o qual, em condições de limitação de algum nutriente (nitrogênio, fósforo, magnésio, entre outros) é conduzido à via de síntese de P(3HB) sofrendo, sequencialmente, a ação de três enzimas. Entre estas está uma redutase que é dependente da coenzima reduzida NADPH. Dessa forma é possível observar que a condição óxido-redutora interna à célula, na fase de produção, pode influenciar a quantidade de biopolímero acumulado. Sabe-se que a condição óxido-redutora da célula é um reflexo das condições ambientais nas quais está inserida, ou seja, temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido, composição química do meio. Com o objetivo de avaliar as variações do potencial óxido-redutor (Eh) e a possibilidade de utilizá-lo para o controle, foram realizadas culturas para produção de P(3HB). Estas culturas foram realizadas em frascos agitados (1L) e biorreator (5L) em meio sintético com diferentes fontes de carbono. Os agentes limitantes do crescimento foram o nitrogênio ou fósforo e o Eh foi monitorado ao longo de todas as culturas. Os resultados obtidos em frascos Erlenmeyer mostraram que o monitoramento do Eh permite sinalizar o momento da limitação do crescimento em meio sintético ou em substrato complexo. Nos ensaios realizados em fermentador a correlação entre esses parâmetros ficou mais visível. Quando o Eh atinge um valor mínimo, logo observa-se uma tendência a elevar o valor do potencial o que indica a exaustão do nutriente. O mesmo comportamento foi observado para exaustão de fonte de carbono, em ensaios realizados em Erlenmeyer. Além dessas correlações também foi possível verificar que a máxima concentração de NADPH ocorre no instante em que é atingido o valor mínimo de Eh do meio. Em contrapartida, pode-se dizer que o Eh pode ser utilizado para mostrar a fase de crescimento da cultura pois no instante do valor mínimo de Eh a cultura sempre esteve na condição de desaceleração do crescimento. A sinalização desta fase é fundamental para realizar as intervenções (alimentação de fosfato, adição de propionato) em processo envolvendo produção de PHAs. As mesmas conclusões foram observadas em cultura de *R. eutropha* DSM 545 em meio complexo, no caso, um efluente da indústria de processamento de repolho. A fim de verificar a ação do meio sobre a condição óxido-redutora intracelular, o agente redutor ditioneitol (DTT) foi adicionado na forma de pulso e observou-se que o mesmo interferiu na condição redutora do cofator NADPH, bem como, no crescimento celular.

## Abstract

Polyhydroxybutyrate (P(3HB)) is a polyester accumulated in the inside of bacterial cells as energy and carbon source. Industrially, it can be used as substitute of petrochemicals plastics for presenting similar properties. Another excellent feature is its biodegradability, that is, its possibility to be degraded to CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O. The synthesis of P(3HB) by *Ralstonia eutropha* occurs from the pathway Entner-Doudoroff that generates acetyl-CoA, which in nutrient limitation (nitrogen, phosphorus, magnesium....) is lead to P(3HB) biosynthesis throught the action of three enzymes. One of then, is a reductase dependent on coenzyme NADPH. So internal cell oxide-reducing condition, in the production phase, can influence the amount of biopolymer accumulated. Is know that the oxide-reducing condition of the cell is a consequence of environmental conditions to which is inserted, for example, temperature, pH, oxygen dissolved concentration and chemical composition. In order to evaluate the variations of redox potential (Eh) during *Ralstonia eutropha* (DSM 545) cultivation and the possibility of its usage for the cultures control for P(3HB) production, cultures had been carried out in agitated flask (1L) and bioreactor (5L) in synthetic medium with different carbon sources. The nutrient exhaustion of the growth had been the nitrogen or phosphorus and the Eh was monitored throughout all cultivation. The results obtained in Erlenmeyer flasks cultivation has shown that the monitoring of the Eh allows to signal the limitation of the growth moment in synthetic medium or complex substrate. In the assays carried out in bioreactor the correlation between these parameters was more visible. When limitation occurs Eh reaches a minimum value, and a trend to regenerate its value is observed. The same behavior was observed for exhaustion of carbon source, in assays carried through in Erlenmeyer. Beyond these correlations also it was possible to verify that the maximum NADPH concentration occurs when the minimum Eh value is reached. On the other hand, it can be said that the Eh can be used to show to the phase of growth of the culture once in the instant of the minimum Eh value the culture always was in the growth deceleration condition. Signaling of deceleration phase is basic to carry through the interventions, like phosphate or propionate addition, to improve polyhydroxyalkanoates (PHAs) production. The same behavior was observed in *R. eutropha* DSM 545 cultivation in a complex culture medium, composed of cabbage processing industry wastewater. Also, in order to verify the action of the culture medium oxide-reducing condition, the reducing agent dithiothreitol (DTT) was added in pulse form and it was observed that the reducing agent increase the concentration of the NADPH cofactor and slow down the cellular growth.

# CAPÍTULO 1.

## Introdução

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) constituem um grupo de poliésteres acumulados por inúmeras bactérias na forma de grânulos intracelulares, que podem representar até 80% da massa seca celular (ANDERSON e DAWES, 1990). Dentre os PHAs, destacam-se o poli-3-hidroxi-butirato (P(3HB)) e seu copolímero poli-(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (P(3HB-co-3HV)), pois são termoplásticos biodegradáveis e podem ser sintetizados por via bacteriana, a partir de matérias-primas renováveis.

A produção de PHA, por *R. eutropha*, é conduzida em duas fases. Uma fase de crescimento, sem condição limitante, objetivando a geração de biomassa e outra, com limitação de algum nutriente, favorecendo o acúmulo de polímero de acordo com a fonte de carbono oferecida (SCHLEGEL *et al.*, 1961; DU *et al.*, 2001a; MARANGONI *et al.*, 2001).

A síntese de P(3HB) e de P(3HB-co-3HV) normalmente ocorre quando há excesso de fonte de carbono e energia disponível e limitação de pelo menos um nutriente necessário à multiplicação das células bacterianas (N, P, Mg, Fe, etc) (BRANDL *et al.*, 1990)

As produções, em escala industrial, são realizadas predominantemente como operações em batelada e batelada alimentada devido ao longo período de duração do processo. Culturas em contínuo são raras, pois apresentam produtividade e densidade celular menores além de serem susceptíveis à contaminação e degeneração das linhagens (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998; GROTHE *et al.*, 1999).

A produção de polímeros ambientalmente corretos (PHAs) esbarra em seu elevado custo de produção quando comparado ao dos polímeros derivados de petroquímicos. Porém, estudos têm sido realizados para tentar minimizar os custos de produção através da utilização de fontes de carbono de baixo custo, desenvolvimento de novas linhagens e técnicas mais eficientes para recuperação de polímeros (MARANGONI *et al.*, 2001; DU *et al.*, 2001a).

Alguns estudos indicam que o potencial óxido-redutor (Eh), apesar de sua natureza complicada, que depende de uma diversidade de parâmetros ambientais e celulares, é útil para monitoramento das alterações no estado metabólico de culturas aeróbias (KWONG e RAO, 1991) e para otimização do rendimento de produtos de fermentações aeróbias e anaeróbias

(KWONG e RAO., 1992). O Eh de uma cultura é uma das variáveis mais facilmente mensuráveis em um processo biotecnológico, uma vez que eletrodos esterilizáveis, de baixo custo e estáveis para uma medida "in situ" estão disponíveis (HIGAREDA *et al.*, 1997).

O objetivo principal deste trabalho é avaliar a evolução do potencial óxido-redutor (Eh) durante a cultura de *R. eutropha* visando produção de PHAs.

Os objetivos específicos são:

a. Monitorar a condição óxido-redutora intracelular a partir de análises da coenzima NADPH, e correlacioná-la com o potencial redox extracelular.

b. Verificar o crescimento de *Ralstonia eutropha* DSM 545 em meio complexo monitorando o Eh do meio extracelular.

c. Verificar a consequência da adição de um agente redutor na condição óxido-redutora intra e extracelular, bem como, seu efeito sobre a produtividade do biopolímero.

# CAPÍTULO 2.

## Revisão Bibliográfica

### 2. Polihidroxicanoatos (PHAs)

#### 2.1. Considerações gerais

As inclusões celulares procariotas consistem de uma ampla variedade de estruturas. Podem apresentar-se cristalizadas, amorfas ou fluidas, não sendo separadas do citoplasma por uma bicamada lipoproteica. Existem três categorias gerais de inclusões procariotas:

- estruturas da maquinaria metabólica;
- ajustadores do ambiente;
- geradores de produtos metabólicos, como materiais de reserva (polifosfatos, glóbulos de enxofre, inclusões de polihidroxicanoatos (PHAs) (FULLER, 1999).

Os PHAs são materiais de reserva de energia e carbono (BYROM, 1987; LEE *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 1996; LEE e CHOI 1999; SUDESH *et al.*, 2000; KESSLER e WITHOLT, 2001; DU *et al.*, 2001a; DU *et al.*, 2001b) acumulados como inclusões de poliésteres insolúveis (hidrofóbicos) no citoplasma (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998). Uma ampla variedade de microrganismos acumula PHAs para realização de sínteses metabólicas e crescimento (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998; GROTHE *et al.*, 1999; YU, 2001; FULLER, 1999). Isto ocorre quando há condições desfavoráveis de crescimento (DU *et al.*, 2001a), na presença de excesso de carbono (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998; DU *et al.*, 2001b). A condição desfavorável ao crescimento é gerada pela exaustão de algum nutriente, tal como, nitrogênio, fósforo, enxofre, oxigênio (LEE *et al.*, 1996; STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998), magnésio (LEE *et al.*, 1996; LEE e CHOI 1999), potássio ou ferro (LEE *et al.*, 1996; KESSLER e WITHOLT, 2001).

Em 1925, Lemoigne, pela primeira vez, verificou a presença de poli-3-hidroxi-butarato P(3HB) em bactéria (FULLER, 1999).

A Tabela 1 apresenta alguns compostos cuja limitação leva à produção de PHA por diferentes microrganismos (BRANDL *et al.*, 1990).

**Tabela 1.** Lista de compostos limitantes à formação de PHA (BRANDL *et al.*, 1990).

<b>Composto</b>	<b>Organismo</b>
Amônia	<i>Alcaligenes eutrophus</i> <i>Alcaligenes latus</i> <i>Azospirillum brasiliense Cd</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Pseudomonas sp. K</i> <i>Methylocystis parvus</i> <i>Thiosphaera pantotropha</i> <i>Rhizobium ORS571</i>
Carbono	<i>Spirillum sp.</i> <i>Azospirillum brasiliense Cd</i>
Ferro	<i>Pseudomonas sp. K</i>
Magnésio	<i>Pseudomonas sp. K</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Rhizobium ORS571</i>
Manganês	<i>Pseudomonas sp. K</i>
Oxigênio	<i>Azospirillum brasiliense Cd</i> <i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Azotobacter beijerinckii</i> <i>Rhizobium ORS571</i>
Fosfato	<i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodobacter crescentus</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i>
Potássio	<i>Bacillus thurgiensis</i>
Sulfato	<i>Pseudomonas sp. K</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i>

## 2.2. Características e Propriedades

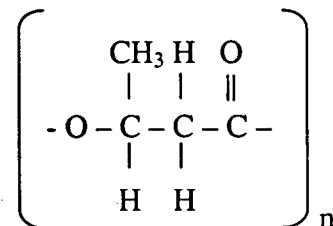
O PHA é um material ideal de estocagem de carbono e energia devido a sua baixa solubilidade e alto peso molecular que exerce desprezível pressão osmótica à célula bacteriana (DAWES e SENIOR, 1973).

Os PHAs produzidos por via biológica são compostos apenas de monômeros com configuração (R) quiralmemente puros. Esses podem ser divididos em dois grupos dependendo do número de átomos de carbono nas unidades monoméricas. Um grupo refere-se aos PHAs de cadeia curta, consistindo de 3 a 5 átomos de carbono. Ao outro grupo pertencem os PHAs de cadeia média consistindo de 6 a 14 átomos de carbono (LEE e CHOI, 1999). Apresentam solubilidade em clorofórmio, insolubilidade em éter etílico e éter de petróleo e resistência à solução de hipoclorito de potássio (SCHLEGEL *et al.*, 1961).

A repetição das unidades na estrutura dos PHAs depende das espécies bacterianas e o comprimento da cadeia da fonte de carbono alimentada durante a síntese. Contudo, muitos dos precursores usados para crescimento celular e síntese do polímero podem conter uma ampla variedade de grupos funcionais que, quando inseridos à cadeia polimérica, geram um polímero quimicamente funcional, permitindo modificar as propriedades do material (FULLER, 1999).

Dependendo da fonte de carbono, os PHAs produzidos por *R. eutropha* podem ter forma homopolimérica ou heteropolimérica, tais como poli-3-hidroxi-butirato (P(3HB)) ou poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato P(3HB-co-3HV) (DU *et al.*, 2001a; SUDESH, *et al.*, 2000).

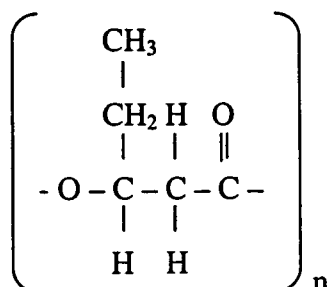
O P(3HB) é um homopolímero com unidades repetidas de ácido-3-hidroxi-butírico. A fórmula pode ser apresentada como:



Onde n pode variar de 23 000 a 25 000 (BYROM *et al.*, 1987).



P(3HB-co-3HV) é sintetizado por *R. eutropha* em glicose e cosubstratos, tal como ácido propiônico, apresentando além do butirato, unidades de valerato com a seguinte estrutura:



A facilidade de purificação e preparo, sem a presença e contaminação por resíduos de metal que funcionam como catalizadores, caracteriza o P(3HB) como um potencial substituto de materiais como gelatina, proteínas e polímeros de ácido lático nos processos de microencapsulação (LU *et al.*, 2001).

A resistência à água, à radiação ultravioleta e a impermeabilidade ao oxigênio tornam o P(3HB) adequado para ser usado na confecção de embalagens alimentícias (WEINER, 1997; GROTHE *et al.*, 1999).

O PHA é um tipo promissor de material termoplástico que pode substituir polímeros sintéticos tais como policarbonato, polipropileno, polietileno e poliestireno para aplicações em materiais com vida curta devido às suas propriedades mecânicas muito similares, e à real biodegradabilidade do PHA no ambiente (WEINER, 1997; YU, 2001) e as suas propriedades podem ser alteradas e aumentadas pela manipulação ou modificação de sua composição química (WEINER, 1997; SIM *et al.*, 1997).

O P(3HB) apresenta propriedades que, em alguns aspectos, assemelham-se àquelas do polipropileno, ou seja, a boa processabilidade em equipamentos comumente usados para processamento de poliolefinas e outros plásticos sintéticos, tornando-se adequado para moldagem por injeção, extrusão, indicando que PHAs podem ser adequados para aplicações em várias áreas como um substituto parcial dos plásticos sintéticos não biodegradáveis (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998). Contudo, o P(3HB-co-3HV) apresenta maior utilidade que o P(3HB) devido às suas propriedades termomecânicas. As unidades repetidas de 3HV na cadeia polimérica reduzem a dureza, a cristalinidade e o ponto de fusão do polímero, aumentando, dessa forma, a flexibilidade e elasticidade e, conseqüentemente, sua

resistência ao impacto e melhorando sua processabilidade (BYROM, 1987; WEINER, 1997; DU *et al.*, 2001a).

P(3HB) e outros PHAs podem ser completamente degradados a dióxido de carbono e água (e metano sob condições anaeróbicas) pelos microrganismos no ambiente (DU *et al.*, 2001b), sendo facilmente degradado no solo (GROTHER *et al.*, 1999). A degradação enzimática de P(3HB) é afetada por sua estereocomposição e tacticidade. Os P(3HB)s com conformação R sofrem degradação enquanto que aqueles com unidades repetidas da conformação S não são degradáveis (GRODZINSKI, 1999).

### 2.3. Microrganismos produtores de PHAs

Culturas de alta densidade celular empregam *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas* linhagem K, *Azotobacter vinelandii* e *Pseudomonas oleovorans* que produzem abundantes e variados PHAs de vários substratos (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

A *Ralstonia eutropha* é uma das bactérias produtoras com maior potencial para produção desses biopolímeros devido ao alto conteúdo de polímero acumulado em suas células (DU *et al.*, 2001a).

Outros microrganismos que apresentam ocorrência de P(3HB) são: *Actinomycetes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Chlorogloea*, *Chromatium*, *Derxia*, *Ferrobacillus*, *Hyphomicrobium*, *Lamproaedia*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Sphaerotilus*, *Spirillum*, *Streptomyces*, *Vibrio* e *Zoogloea* (BYROM, 1987).

### 2.4. Substratos utilizados para produção de PHAs

Entre os fatores que são determinantes na produção econômica de PHAs, em escala industrial, está o custo da matéria-prima. Entre os substratos requeridos, a fonte de carbono assume primordial significância uma vez que os PHAs são compostos apenas de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio (SHI *et al.*, 1997; YAMANE, 1993). Além disso, o fator de conversão substrato em produto ( $Y_{S/P}$ ) é determinante na seleção da linhagem para o processo de produção.

Alguns substratos relevantes para a produção de PHAs são: dióxido de carbono, recursos fósseis (metano, óleo mineral, lignita), recursos renováveis (amido, soro de queijo,

glicerol) e algumas substâncias químicas (ácido propiônico, ácido 4-hidroxitubírico) (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

Visando reduzir os custos de produção de PHAs, a utilização de alguns substratos alternativos faz-se importante. Entre estes, destaca-se o uso de açúcar invertido, um produto da indústria açucareira, com o qual tem sido obtidos bons resultados a partir do seu emprego como fonte de carbono (GOMEZ et al, 1996). Resíduos orgânicos, tais como resíduos amiláceos, outra fonte de carbono, também podem reduzir significativamente o custo de produção devido ao custo negativo da matéria-prima (YU, 2001). Resíduo da indústria de leite, o soro de queijo, surge como uma alternativa de substrato de baixo custo que pode ser usado como fonte de de carbono a partir da hidrólise da lactose (WONG e LEE, 1998; MARANGONI *et al.*, 2001). SUDESH, *et al.* (2000) citam trabalhos que utilizam fontes de carbono baratas como caldos de cana e beterraba, óleo plantas e seus ácidos graxos, bem como carboidratos simples.

Em lodo ativado, foi possível produzir P(3HB) e P(3HB-co-3HV) embora com uma concentração final de 1 g/L (HU *et al.*, 1997). No efluente de criação de suínos, rico em compostos orgânicos e inorgânicos, foi possível verificar o crescimento de *A. vinelandii* UWD, hábil em produzir PHA sem limitação de nutriente (CHO *et al.*, 1997). Efluentes de destilaria contêm açúcares e compostos nitrogenados que possibilitam o crescimento de *Actinobacillus* sp EL-9 e obter um acúmulo de 42% de P(3HB) em peso seco celular (SON *et al.*, 1996).

Além das alternativas à fonte de carbono, a milhocina é um resíduo industrial com potencial para ser usado como fonte de nitrogênio (HOCH, 1997).

Contudo, as fontes de carbono conhecidas para *R. eutropha* são frutose, glicose, ácido láctico (SEO *et al.*, 1998), etanol e hidrogênio/gás carbônico/ar (BYROM, 1987).

## 2.5. Síntese de PHAs

Os poliésteres podem ser obtidos por quatro diferentes métodos: a) produção química; b) produção biotecnológica (culturas com vários tipos de bactérias e Archae; culturas com linhagens de bactérias mutantes; culturas com bactérias e leveduras recombinantes; plantas transgênicas; síntese “in vitro” com enzimas isoladas); c) combinação da produção biotecnológica e química (polimerização química de ácido láctico produzido por fermentação) e, d) isolamento de fontes naturais como, por exemplo, isolar cutina de plantas.

(STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998). No presente trabalho, será observado apenas a síntese biotecnológica.

### 2.5.1. Síntese biotecnológica de PHAs por *R. eutropha*

A *R. eutropha* cataboliza os carboidratos pela via Entner-Doudoroff a piruvato, que pode então ser convertido através de desidrogenação a acetil-CoA (BRAUNEGG *et al.*, 1998), que segue para via de produção de PHA, gerando tanto homopolímeros (P(3HB)) quanto heteropolímeros (P(3HB-co-3HV)) (HOLMES, 1985).

### 2.5.2. Via metabólica para produção de PHAs

As bactérias apresentam várias vias metabólicas para a síntese e decomposição de PHAs (LEE e CHOI, 1999). Estas estão ligadas ao estado metabólico da célula e ao fluxo de carbono através do metabolismo intermediário (BYROM *et al.*, 1987).

A *R. eutropha* sintetiza o P(3HB) a partir de acetil coenzima-A por três reações sequenciais catalizadas por 3-cetotiolase (acetil-CoA-acetiltransferase; EC 2.3.1.9); acetoacetil-CoA redutase (hidroxibutiril-CoA desidrogenase; EC 1.1.1.36) e poli(D-(-)-3-hidroxibutiril-CoA) sintase (PHB polimerase) (DAWES e SENIOR, 1973), conforme fluxo esquemático apresentado na Figura 2.1.

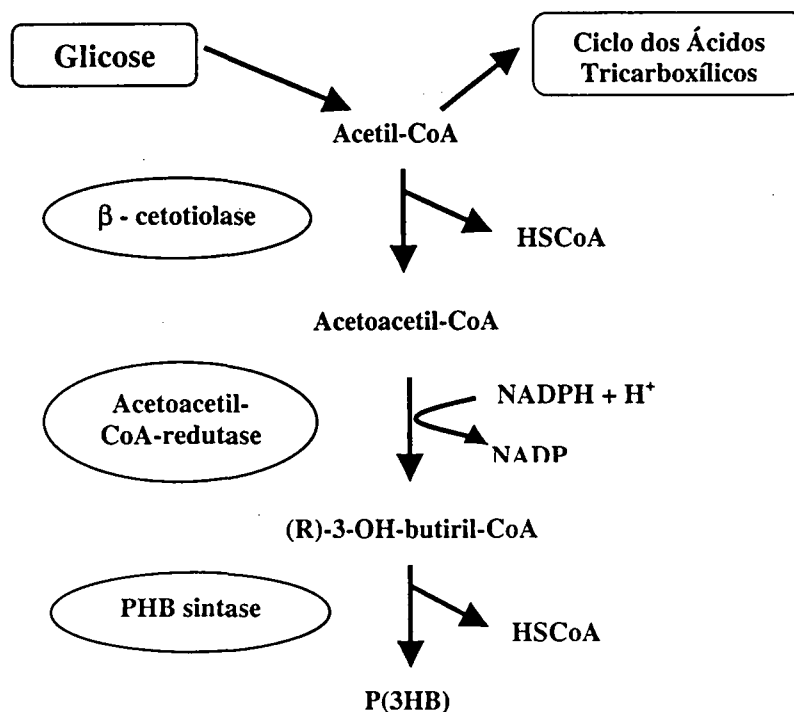


Figura 2.1. Fluxo esquemático da via metabólica para produção de P(3HB) (KESSLER e WITHOLT, 2001).

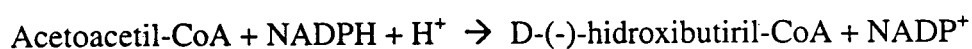
A primeira enzima na via de biossíntese de P(3HB), a  $\beta$ -cetotiolase, compete por acetil-CoA com várias outras vias metabólicas incluindo formação de acetato, formação de citrato e síntese de ácidos graxos. Essa enzima é inibida por moléculas de CoASH livres. Acetoacetil-CoA redutase, a segunda enzima na via de síntese de P(3HB), requer NADPH como cofator. Então, a atividade de acetoacetil-CoA redutase, bem como a quantidade e a razão de nicotinamida nucleotídeo, oxidada e reduzida, parece ser importante na regulação da síntese de P(3HB). Citrato sintase, a primeira enzima no ciclo dos ácidos tricarbóxicos, não somente compete com  $\beta$ -cetotiolase por acetil-CoA mas também libera moléculas de CoA livres, o que afeta negativamente a síntese de P(3HB) (LEE *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 1995).

Sob condições balanceadas de crescimento, os níveis de CoASH são elevados. Em limitação de nutriente mas excesso de carbono, a formação de NADH inibe a citrato sintase, e níveis de acetil-CoA sobem ao ponto em que a inibição pela CoASH é superada. A reação de condensação a acetoacetil-CoA é possível e P(3HB) é sintetizado. A degradação do polímero é controlada através da oxidação de monômeros de 3-hidroxi-butirato pela enzima 3-hidroxi-butirato desidrogenase. Esta enzima está sujeita a inibição pelo acetato e NADH (BYROM, 1987).

### 2.5.3. Cofatores enzimáticos e a síntese de PHAs

O cofator  $\text{NAD}^+$  é usado para oxidações catabólicas que geram energia, enquanto que NADPH serve como fonte de poder redutor para biossíntese (FOSTER e MOAT, 1980).

Na via de produção de P(3HB), a acetoacetil-CoA-redutase é NADPH dependente, isto é, necessita de um agente redutor (NADPH) para catalizar a seguinte reação:



Visto que o metabolismo de carboidratos em *R. eutropha* ocorre pela via Entner-Doudoroff, o NADPH será derivado, principalmente, da ação de glicose-6-fosfato-desidrogenase (HAYWOOD *et al.*, 1998).

Embora  $\text{NAD}^+$  e ATP não sejam requeridos nas três reações sequenciais, é necessário considerar as regenerações de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  e  $\text{ATP}/\text{ADP}$  nas vias incluídas na biossíntese de P(3HB). Em condições aeróbicas, a reciclagem de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  é obtida, principalmente, pela cadeia respiratória, que é acompanhada pela produção de vários moles ATP/mol NADH oxidados (SHI *et al.*, 1997; YAMANE, 1993).

LEE *et al.* (1995) mostraram que as razões  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  e  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  sob condições de limitação de nitrogênio foram superiores àquelas sob condições suficientes de nitrogênio. Isso pode ser explicado pela análise da via metabólica de *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) na Figura 2.2. Um fluxo aproximadamente constante para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e o bloqueio na via biossintética de aminoácidos, especialmente a reação de  $\alpha$ -cetoglutarato a glutamato (reação 21) que assimila o íon amônio no interior da célula, resultando em maior produção de NADPH. A maior concentração de NADPH acelera a biossíntese de P(3HB) uma vez que P(3HB) pode fornecer uma diminuição do excesso de equivalentes redutores (Figura 2.3).

Em cultura de *R. eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*), o nível de NADPH, bem como a razão  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  são maiores em condição de síntese de P(3HB) (LEE e CHANG, 1995).

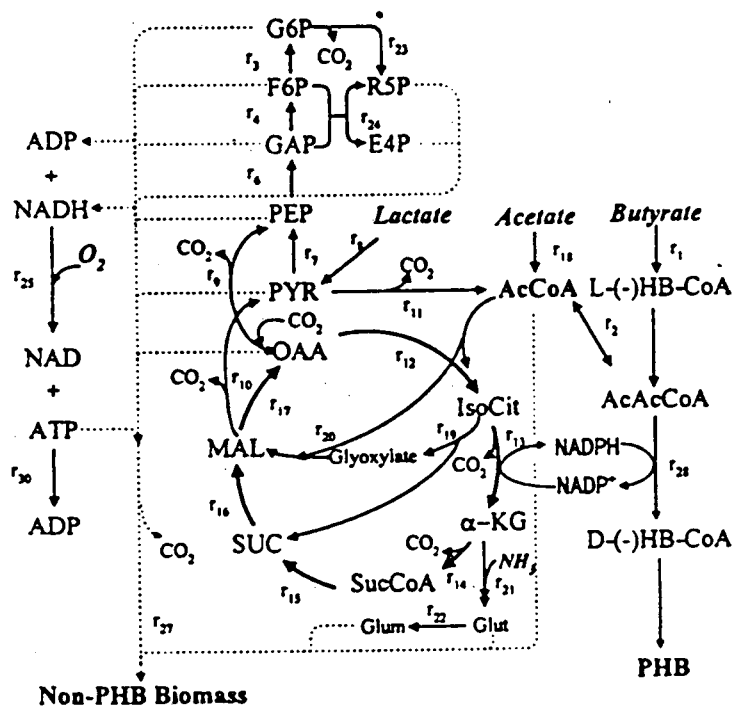
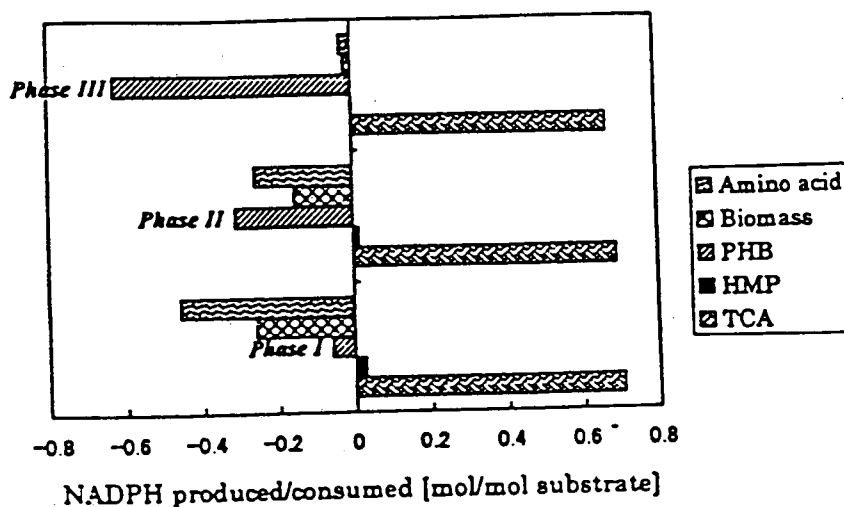


Figura 2.2. Via metabólica de *R. eutropha* a partir de diferentes substratos (LEE *et al.*, 1995)



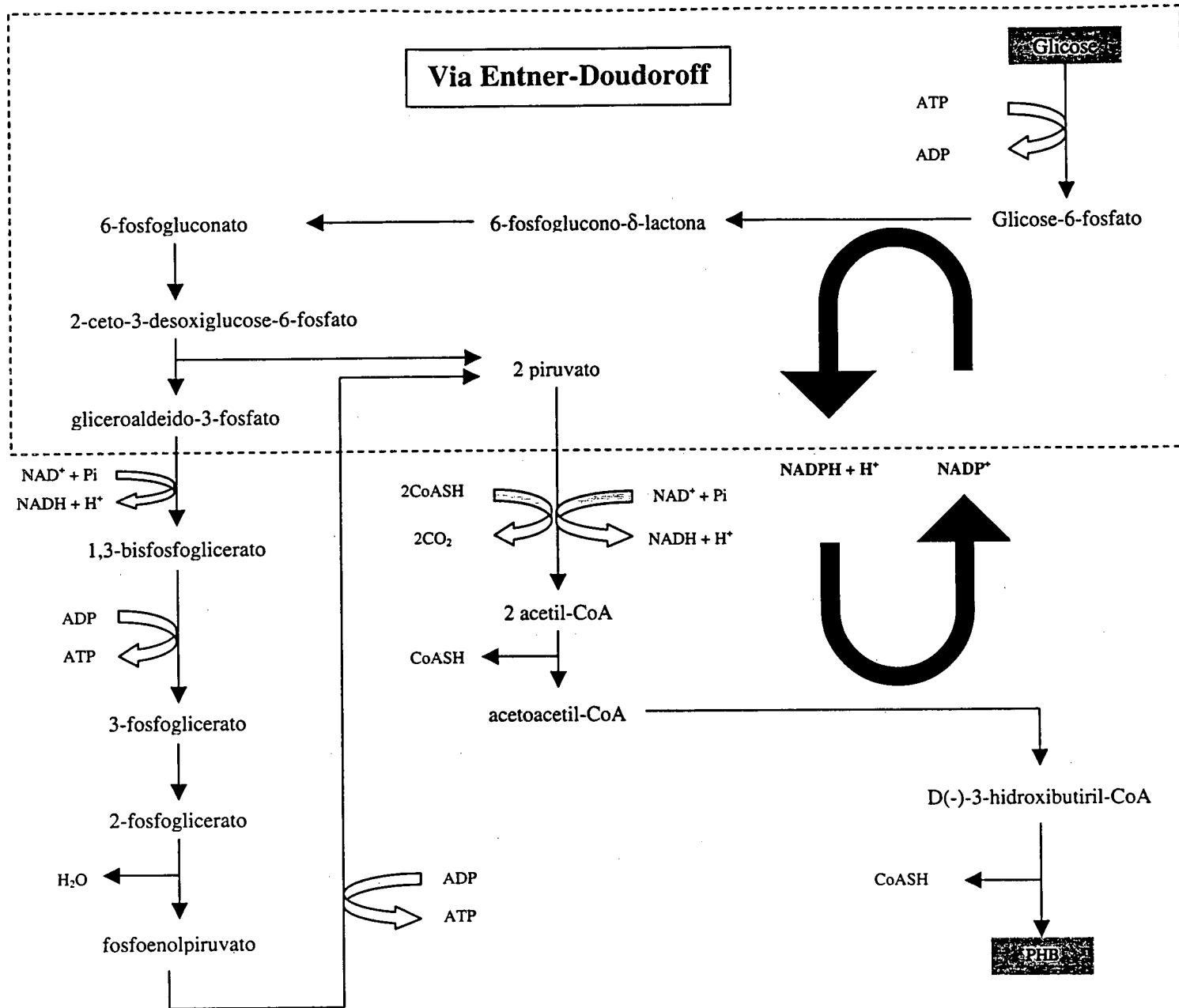
**Figura 2.3.** NADPH produzido e consumido em diferentes fases da cultura de *R. eutropha* (*A. eutrophus*) H16, em batelada alimentada (SHI *et al.*, 1997).

Fase I: fase batelada: crescimento e baixa percentagem de P(3HB)

Fase II: fase transiente: nitrogênio torna-se limitado

Fase III: fase de produção: ocorre exaustão do íon amônio

A glicose é convertida a acetil-CoA pela via Entner-Doudoroff em *Pseudomonas* sp.; *Azobacter* sp. e *Ralstonia eutropha*. A via biossintética de P(3HB) a partir da glicose incluindo as formações de ATP e  $\text{NAD}^+$  e regeneração de  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  é apresentada na Figura 2.4 (YAMANE, 1993).



**Figura 2.4** - Biossíntese de P(3HB), em *R. eutropha*, a partir de glicose, pela via Entner-Duodoroff (YAMANE, 1993)



## 2.6. Regulação

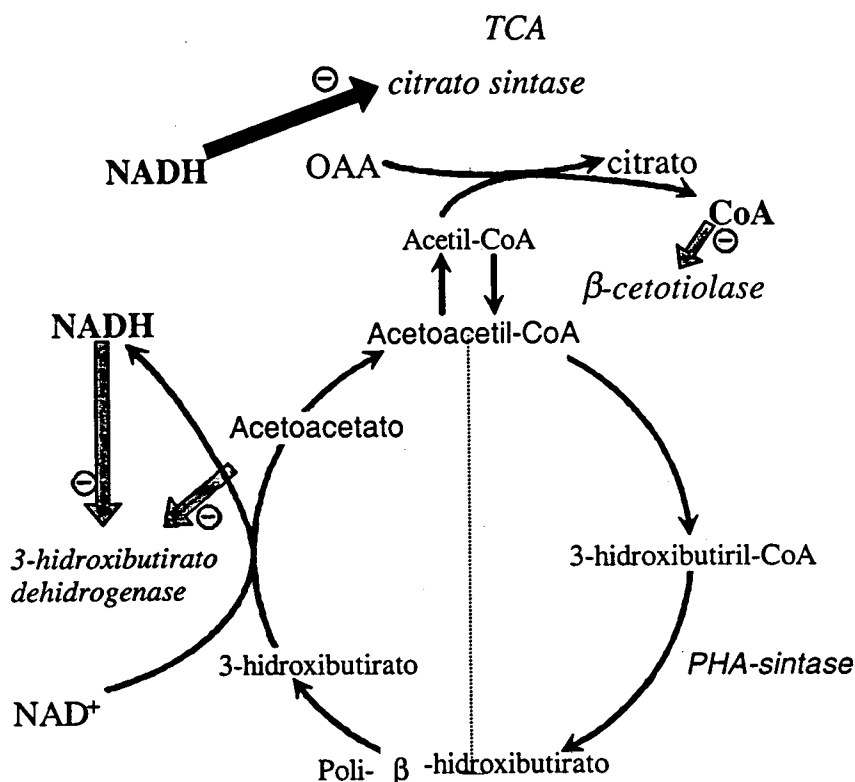
Segundo KESSLER e WITHOLT (2001), a regulação do metabolismo de PHA pode ocorrer de formas diferentes:

1. por ativação da expressão do gene *pha* devido ao sinal específico do ambiente, tal como limitação de nutriente;
2. por ativação das enzimas para síntese de PHA por componentes específicos da célula ou intermediários metabólicos;
3. por inibição de enzimas metabólicas das vias competitivas e aumento de intermediários requeridos para a síntese de PHA;
4. por combinação dos anteriores.

A regulação da biossíntese de PHA tem sido estudada em detalhes em diferentes bactérias. A síntese de PHA em *Ralstonia eutropha* é promovida quando o crescimento celular é restringido pela limitação, ou carência, de N, P ou O<sub>2</sub>. OEDING e SCHLEGEL (1973), mostraram que acetil-CoA é o metabólito regulador chave neste organismo, uma vez que esse pode participar do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) ou pode servir como um substrato para biossíntese de PHA. Estes autores mostraram também que a razão NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> é importante na regulação metabólica da biossíntese de PHA. Quando a razão NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> aumenta, sob limitação de nitrogênio, as enzimas citrato sintase e isocitrato desidrogenase são inibidas por NADH. Dessa forma, o fluxo de acetil-CoA dentro do ciclo TCA é diminuído e mais acetil-CoA é convertido a acetoacetil-CoA pela  $\beta$ -cetotiolase. Quando a concentração de nitrogênio é suficiente, a concentração de CoA, que é liberada como acetil-CoA dentro do TCA, é alta. A  $\beta$ -cetotiolase é inibida pela alta concentração de CoA, e, subsequentemente, a biossíntese de PHA é inibida.

A síntese e a degradação de PHAs são reguladas pelos intermediários do ciclo dos PHAs (Figura 2.5) e através do estado redox da célula.

SENIOR e DAWES (1971) propuseram que a síntese de P(3HB) não funciona apenas como reserva de carbono e energia, mas também para a diminuição do poder redutor, podendo ser considerado como regulador do poder de óxido-redução da célula. DAWES e SENIOR (1973) observaram que a síntese de P(3HB) foi acompanhada por um pronunciado aumento no poder redutor da cultura com concomitante queda nas taxas de utilização de oxigênio e evolução do gás carbônico concluindo, com isto que, durante a limitação de oxigênio, as células ajustam-se ao novo meio pela reoxidação do poder redutor, através da síntese de P(3HB).



**Figura 2.5.** Regulação da biossíntese e degradação de P(3HB). Em condições de excesso de energia, o nível de NADH inibe a despolimerização de P(3HB) e o ciclo de Krebs (TCA). A diminuição da concentração em Co-A-sh permite que a β-cetotilase (acetil-CoA aciltransferase) possa catalisar a condensação de acetil-CoA em acetoacetil-CoA e assim levar à síntese de P(3HB). Em deficiência de energia, o controle move-se no outro sentido (BYROM, 1987).

## 2.8. Custos de Produção

### 2.8.1. Considerações Gerais

O P(3HB) de grau comercial apresenta um preço muito alto, aproximadamente 15 vezes maior que plásticos sintéticos similares, o que limita seu uso a nichos específicos. Por exemplo, Biopol<sup>R</sup>, um copolímero do ácido β-hidroxiacetato e ácido β-hidroxiacetato produzido por *Ralstonia eutropha*, é vendido por aproximadamente 17 vezes o preço de um plástico sintético (DU *et al.*, 2001b; MARANGONI *et al.*, 2001; GROTHE *et al.*, 1999).

Estudos têm sido realizados para tentar minimizar os custos de produção através da utilização de fontes de carbono de baixo custo, desenvolvimento de novas linhagens e técnicas mais eficientes para recuperação de polímeros (MARANGONI *et al.*, 2001; DU *et*

*al.*, 2001a; DU *et al.*, 2001b), a fim de alcançar melhores valores de velocidade específica de produção e produtividade (SIM, *et al* 1997) e percentual de P(3HB) na célula (ARAGÃO *et al.*, 1996).

O uso de PHAs como substituto de plásticos derivados de petróleo depende da capacidade de produzir poliésteres a custos competitivos (SIM, *et al* 1997)

### 2.8.2. Fontes de Carbono

Um dos fatores econômicos importantes na produção do P(3HB), em escala industrial, é o custo da matéria-prima. Entre os substratos requeridos, a fonte de carbono é de primordial significância no caso da produção de P(3HB), uma vez que P(3HB) é composto apenas de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio (SHI *et al.*, 1997; YAMANE, 1993 ).

O alto custo do ácido propiônico (aproximadamente US\$ 1 por Kg), baixo conteúdo de polímero (50 a 75% de peso em massa celular seca) e baixa produtividade tem sido indentificados como os maiores fatores no alto custo de produção do copolímero P(3HB-co-3HV) (DU *et al.*, 2001a).

O ácido propiônico é, contudo, muito tóxico às células, particularmente a altas concentrações. O baixo conteúdo de P(3HB-co-3HV) e produtividade são atribuídos ao efeito tóxico do ácido devido a uma estratégia imprópria de alimentação de ácido propiônico (DU *et al.*, 2001b).

### 2.8.3. Desenvolvimento de novas linhagens

A regulação da produção de PHA é muito complexa, uma vez que ocorre a nível fisiológico, através da inibição de cofatores das enzimas e disponibilidade de metabólitos; a nível genético através de  $\sigma$ -cofatores alternativos, dois componentes do sistema regulatório; e autoindução molecular. Um outro nível de regulação diz respeito ao controle do tamanho granular e peso molecular por níveis de PHA polimerase e “phasins”.

A partir do conhecimento da regulação da produção de PHAs, surgem linhagens mutantes com características específicas. *Azotobacter vinelandii* UWD é uma linhagem mutante que sintetiza P(3HB) durante o crescimento (PAGE e KNOSP, 1989). Em *Acinetobacter spp.* a síntese de P(3HB) é estimulada pela baixa concentração de fosfato (SCHEMBRI, 1995). ZHANG *et al.* (1994) utilizaram linhagens recombinantes de *Escherichia coli* e *Klebsiella* a fim de conseguir a produção de PHA a partir de sacarose como única fonte de carbono, uma vez que essa, sendo assimilada por estas linhagens não

necessitaria ser hidrolizada. Estes são alguns exemplos dos estudos que estão sendo realizados a fim de reduzir os custos de produção.

#### **2.8.4. Técnicas de recuperação do PHA intracelular**

Os PHAs são geralmente recuperados das células produtoras por meio de solventes ou misturas destes (BRAUNEGG *et al.*, 1998).

Os processos de separação de PHA da biomassa podem ser divididos em duas categorias: (a) solubilização seletiva de PHA em solvente orgânico, deixando a biomassa restante em suspensão e (b) destruição (solubilização) dos componentes celulares outros que não o PHA, deixando os grânulos de PHA em suspensão (RAMSAY, 1994).

A maioria dos processos de recuperação utilizam solventes orgânicos (RAMSAY, 1994). Embora a extração por solvente seja amplamente usada para recuperar P(3HB) com elevada pureza, este método requer grandes quantidades de solventes tóxicos e/ou voláteis, o que não apenas aumenta o custo total de produção, como também causa danos ao meio ambiente (CHOI e LEE, 1997).

Recentemente, CHOI e LEE (1999) desenvolveram um método simples de digestão alcalina para recuperar P(3HB) a partir de *E. coli* recombinante. Quando as células de *E. coli* recombinante contendo 77% de P(3HB) foram tratadas com NaOH 0,2 M a 30°C durante 1 hora, o P(3HB) foi recuperado com uma pureza de 98,5%. Empregando o método de digestão alcalina, o custo de produção de P(3HB) foi 25% menor que o obtido empregando o método de digestão por surfactante-hipoclorito.

BYROM (1987) e RAMSAY (1994) citam que o método empregado industrialmente para a recuperação de PHA's é o enzimático pois esta extração é mais atrativa economicamente por tornar mais eficiente a recuperação.

#### **2.8.5. Percentual de PHA acumulado**

Sob condições normais de crescimento, o conteúdo de P(3HB) nas células não é, geralmente, muito alto. Dependendo das linhagens bacterianas, pode alcançar 2 a 10% da massa do peso seco celular. Contudo, o conteúdo de P(3HB) pode alcançar mais de 80% da massa seca celular se o crescimento é limitado pela exaustão de um composto nutricional, conforme já mencionado (DU *et al.*, 2001b).

LEE *et al.* (1996) apresentam valores de produção de P(3HB) para culturas de *R. eutropha* em meio complexo (LB) e meio simples (glicose) com diferentes condições de limitação do meio (Tabela 2). Nesse estudo, estes autores registraram que a maior

concentração de P(3HB) ocorreu em meio simples com glicose como fonte de carbono, quando o agente limitante foi o nitrogênio.

**Tabela 2.** Crescimento de *R. eutropha* e produção de P(3HB) em vários meios (24h/30°C)  
(LEE *et al.* 1996)

Meio de Cultura	Agente limitante	Peso seco celular (g/L)	P(3HB) (g/L)	P(3HB) (%)
LB*	-	3,21	0,16	5,1
LB* + Glicose	-	5,60	2,27	40,5
Glicose	-	1,60	0,36	22,5
Glicose	Nitrogênio	2,34	1,65	70,5
Glicose	Fósforo	1,45	0,71	54,5
Glicose	Potássio	2,22	1,21	49,0
Glicose	Magnésio	1,38	0,67	48,6

\* LB = Luria Bertani

## 2.9. Estratégias de produção de PHAs

### 2.9.1. Produção de PHAs

A produção de PHA, por *R. eutropha*, é conduzida em duas fases. Uma fase de crescimento, sem condição limitante, objetivando a geração de biomassa e outra, com limitação de algum nutriente, favorecendo o acúmulo de polímero de acordo com a fonte de carbono oferecida (SCHLEGEL *et al.*, 1961).

As produções, em escala industrial, são realizadas predominantemente como operações em batelada e batelada alimentada devido ao longo período de duração do processo. Culturas em contínuo são raras, pois apresentam produtividade e densidade celular menores além de serem susceptíveis à contaminação e degeneração das linhagens (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998; GROTHE *et al.*, 1999).

### 2.9.2. Considerações gerais

O crescimento e a multiplicação celular representam a avançada estratégia de sobrevivência das populações microbianas. Em casos de suplemento desbalanceado de substrato e alterações temporárias em fontes de nutrientes, um “overflow metabolism” é induzido, o que representa uma estratégia de sobrevivência. Um exemplo é a síntese de P(3HB). O acúmulo deste composto aumenta a continuação do ciclo de vida bacteriano, uma vez que pode ser disponibilizado num estágio de carência no meio. MULLER *et al.* (1999),

mostraram que a cultura de *R. eutropha* JMP134 responde com sucesso a situações de vida contrastantes de várias formas, ou seja, estratégias de multiplicação e estocagem. A multiplicação é favorecida em condições balanceadas, enquanto que em condições desbalanceadas os organismos respondem com um “overflow metabolism”, especialmente o acúmulo de P(3HB). “Overflow metabolism” é essencialmente um mecanismo de estocagem de energia e sobrevivência (MULLER *et al.*, 1999).

Há numerosas condições ambientais que podem influenciar o crescimento celular, o metabolismo e a velocidade de formação de produto. Como exemplos, podem ser citados a concentração de nutrientes e produtos residuais, níveis de oxigênio dissolvido e pH. O exame dos fluxos intracelulares sob diferentes condições ambientais pode resultar em uma melhor compreensão do metabolismo fundamental das células em culturas, o que é essencial para a melhor projeção de bioreatores, composições de meio e estratégias de controle (SHI *et al.*, 1997).

A produtividade do polímero pode ser melhorada pelo aumento da concentração celular, do conteúdo de polímero nas células e pela redução do tempo de cultivo (tempo para a célula crescer e acumular o polímero) (DU *et al.*, 2001b).

### 2.9.3. Estratégias convencionais

O copolímero P(3HB-co-3HV) tem sido produzido em larga escala por cultura em batelada alimentada de *R. eutropha* em glicose e ácido propiônico. O conteúdo de ácido hidroxivalérico do polímero é controlado pela variação da razão glicose/propionato na alimentação. Um bom controle da taxa de alimentação de propionato é essencial, uma vez que uma concentração de sobrenadante em excesso de 0,1% é tóxica e impede a síntese do polímero (BYROM, 1987; DU *et al.*, 2001a).

BYROM (1987) realizou cultivo de *R. eutropha* em meio glicose/sais em reator tipo batelada alimentada. O meio foi limitado em conteúdo de fosfato estando os demais nutrientes em excesso. Após exaustão do nutriente, glicose é adicionada à cultura e o peso seco da biomassa varia consideravelmente devido ao acúmulo de P(3HB) pela célula.

A limitação em nitrogênio é a estratégia mais adotada para produção de P(3HB) por várias bactérias, inclusive *R. eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*). A síntese de P(3HB) pode ser significativamente aumentada pelo suprimento do meio com pequenas quantidades de várias fontes complexas de nitrogênio, aminoácidos ou ácido oleico (LEE *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 1996; SHI *et al.*, 1997).

RAMSAY *et al.* (1990), obtiveram 17 g/L de P(3HB-co-3HV) com 5 mol% de fração de HV usando uma alimentação constante de ácido propiônico durante a fase de acúmulo do polímero.

KIM *et al.* (1994), observaram que P(3HB-co-3HV) será produzido a diferentes concentrações de polímero, de conteúdo de polímero e de fração molar de HV usando soluções de alimentação de diferentes razões fósforo/glicose.

#### 2.9.4. Estratégias não convencionais

Várias estratégias de alimentação têm sido registradas para o acúmulo de polímero, mas poucas a respeito da estratégia de alimentação na fase de crescimento. A forma de cultivo em batelada alimentada exponencial é usada para máximo crescimento celular, em que a vazão de alimentação é exponencialmente aumentada, acompanhando o aumento exponencial de biomassa. Dessa forma, o crescimento celular não é limitado pelo substrato, enquanto que a concentração de substrato no meio é mantido constante. No estágio de acúmulo de P(3HB-co-3HV) o ácido propiônico é adicionado para iniciar a síntese de unidades de 3HV (DU *et al.*, 2001a).

KELLEY e SRIENC (1999), a partir do controle do substrato disponível no meio, geraram blendas de PHAs no interior das células demonstrando que diferentes polímeros podem ser sequencialmente formados dentro de um mesmo grânulo.

KIM *et al.* (1996) mostraram que a adição de piruvato ou leucina, em cultura de *R. eutropha* NCIMB 11599, é altamente eficiente para o aumento dos níveis celulares dos cofatores necessários para a biossíntese de P(3HB).

#### 2.10. Perspectivas para a produção de PHAs

Os polímeros hidrobiodegradáveis, como PHAs, podem ser obtidos pela fermentação de açúcar, mas este processo é ineficiente e por isso caro. Assim, atualmente, trabalhos estão sendo desenvolvidos para modificar geneticamente, por exemplo, sementes de óleo (*Brassica napus*) a produzir sementes contendo PHAs.

A produção de PHAs em plantas é possível mas ainda é necessário muita pesquisa para produzir rendimentos econômicos de polímeros por este meio. O maior problema é a síntese de copolímeros (P(3HB-co-3HV)) com conteúdo controlado de unidades de HV, neste sistema de produção (BYROM, 1992).

A biossíntese de PHA “in vitro” a partir de ácidos hidroxialcanóicos empregando enzimas isoladas revelam importantes características da formação do grânulo de PHA e contribui para o conhecimento dos mecanismos catalíticos das PHA sintases, bem como produção de poliésteres inéditos. A produção de PHAs em plantas transgênicas torna-se realidade devido a disponibilidade de genes bacterianos para biossíntese de PHAs e conhecimento de suas estruturas, bem como a disponibilidade de sofisticados métodos de biotecnologia molecular de plantas tem possibilitado a produção de PHAs em plantas transgênicas (batata, soja, milho) (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

### 2.11. Aplicação de PHAs

Duas aplicações têm surgido, há duas décadas, para os polímeros degradáveis. A primeira reside onde a biodegradabilidade é parte da função do produto. Por exemplo, suturas temporárias no corpo ou em liberação controlada de drogas. A segunda aplicação de polímeros biodegradáveis está na confecção de embalagens (filmes e fibras) e garrafas (BYROM, 1987; STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998; SCOTT, 2000).

Além disso, uma cobertura de PHAs pode ser aplicada a papel ou papelão para formar uma camada resistente a água e produzir um componente completamente biodegradável que requer relativamente baixas quantidades de PHA.

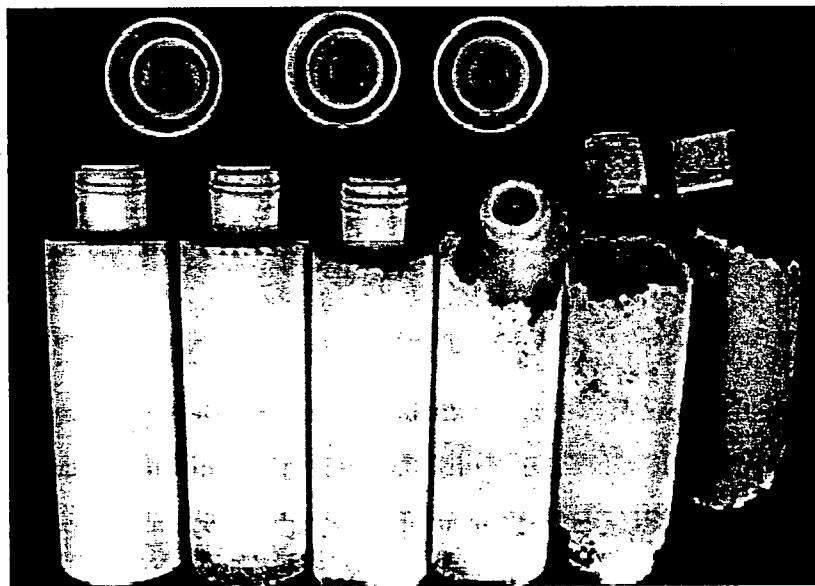
P(3HB)s são biomateriais, ou seja, materiais de origem natural ou sintéticos, que podem ser usados de forma direta, como suplemento, ou de modo a substituir as funções dos tecidos vivos do corpo humano, uma vez determinada a sua biocompatibilidade com o hospedeiro. Combinado a outros biomateriais pode ser utilizado em enxerto de ossos para preencher os defeitos ou substituir os ossos fraturados (RAMAKRISHNA *et al.*, 2001). Também pode ser usado como material osteossintético, em placas de ligação (GROTHER *et al.*, 1999; LU *et al.*, 2001) e outros materiais médicos. Podem ainda ser aplicados como matriz em materiais retardantes para a liberação de drogas, hormônios, herbicidas, inseticidas, “flavors” e fragrâncias na medicina, agricultura, indústria farmacêutica e indústria de alimentos.

Os PHAs apresentam potencial para aplicações terapêuticas. Polímeros contendo monômeros na forma 4-hidroxibutirato são empregados na forma de sais de sódio como anestésico (SUDESH, *et al.*, 2000).



## 2.12. Biodegradação dos PHAs

Uma importante característica dos PHAs é sua biodegradabilidade. Na natureza, vários microrganismos são hábeis para degradar PHAs pelo uso de PHA hidrolases e PHA depolimerases. As atividades destas enzimas podem variar e dependem da composição do polímero, sua forma física (amorfa ou cristalina), as dimensões das amostras e das condições ambientais. O tempo de degradação do produto formado por P(3HB) é da ordem de poucos meses (digestão anaeróbica, Figura 2.6 ), a anos (água do mar) (MADISON e HUISMAN, 1999)



**Figura 2.6.** Degradação de P(3HB-co-3HV) em lodo ativado aeróbico. Progresso da degradação de garrafas para este tratamento por 0, 2, 4, 6, 8 e 10 semanas (MADISON e HUISMAN, 1999).

A biodegradação dos polímeros ocorre por dois mecanismos distintos, dependendo da natureza do polímero e do ambiente. O primeiro é a hidrólise biótica ou abiótica seguida por bioassimilação (hidrobiodegradação) que é o processo primário envolvido na biodegradação das heterocadeias poliméricas tais como celulose, amido e polímeros alifáticos, dos quais polímeros de ácido láctico (PLA) e polihidroxialcanoatos (PHAs) são típicos. O segundo é a peroxidação seguida por bioassimilação de produtos de baixa massa molar (oxobiodegradação) e é aplicada particularmente à cadeia de carbono dos polímeros (SCOTT, 2000).

## 2.13. Uso do Eh para monitoramento de processos biotecnológicos

### 2.13.1. Considerações Gerais

O potencial redox é um parâmetro global que representa o potencial para reação de óxido-redução de uma variedade de compostos. O valor do potencial redox depende, em princípio, do potencial padrão ( $Eh^{\circ}$ ) das meias reações e da concentração dos reagentes. O potencial redox ( $Eh$ ) pode apenas ser calculado pelo uso da Equação de Nernst, se existir um equilíbrio termodinâmico. Na prática, entretanto, a medida do potencial redox é, principalmente, determinada pelo composto com maior densidade de carga para troca, isto é, a capacidade para trocar elétrons com a superfície da platina (JANSSEN *et al.*, 1998).

### 2.13.2. Importância do Potencial Redox

O potencial redox tem um papel importante na assimilação de nutrientes e biossíntese, assim, cabe aqui analisar mais detalhadamente seus conceitos e correlações com a fisiologia bacteriana.

As reações redox são importantes por três razões:

- a. Muitas das reações de conversão de energia, em biologia, envolvem reações redox;
- b. A termodinâmica pode ser estudada através de células eletroquímicas;
- c. As reações podem ser separadas em dois distintos componentes:
  - I. Meia-célula da extração de elétrons do doador;
  - II. Meia-célula da adição de elétrons ao acceptor.

### 2.13.3. Características do Potencial Redox

O potencial redox de um par de compostos que sofre, reversivelmente, oxidação e redução está relacionado a um equilíbrio entre as formas oxidadas e reduzidas e o número de elétrons envolvidos na reação.



onde,

ox: componente na forma oxidada;

$n\text{e}^-$ : número de elétrons envolvidos na reação;

red: componente na forma reduzida.

O potencial redox desta reação é determinado pela equação de Nernst:

$$E_h = E_o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{forma oxidada}]}{[\text{forma reduzida}]}$$

onde,

$E_h$  é o potencial redox referente ao eletrodo normal de hidrogênio;

$E_o$  é o potencial padrão do sistema a 25°C quando todas as atividades de alguns reagentes são unitárias;

R é a constante universal dos gases;

T é a temperatura (K);

$n$  é o número de elétrons envolvidos na reação;

F é a constante de Faraday;

ox é o componente na forma oxidada e

red é o componente na forma reduzida.

Mais detalhes sobre características do potencial redox, relacionado a culturas celulares, estão apresentados no Anexo 1.

#### 2.13.4. Potencial Redox e o Monitoramento do Meio de Cultura

O potencial redox de uma cultura é uma das variáveis mais facilmente mensuráveis em um processo biotecnológico, uma vez que eletrodos esterilizáveis, baratos e estáveis para uma medida “in situ” estão disponíveis. Apesar de sua natureza complicada, que depende de uma diversidade de parâmetros ambientais e celulares, o monitoramento do potencial de óxido-redução do meio tem sido aplicado com sucesso para a identificação de estados fisiológicos, otimização da performance dos processos e para propostas de controle e de monitoramento (HIGAREDA *et al.*, 1997; JANSSEN *et al.*, 1998).

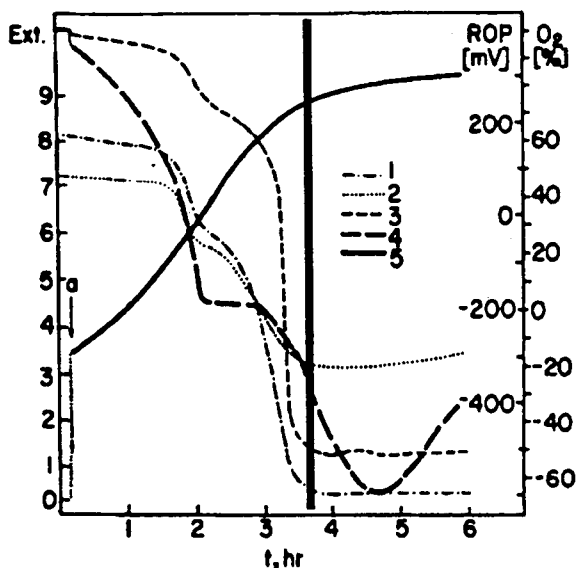
O potencial redox ( $E_h$ ) indica a concentração relativa de agentes oxidantes e redutores no meio, logo, ele é o indicador que representa a possibilidade de ligações redox agirem como doadores e aceptores de elétrons (LEE *et al.*, 1998).

A oxidação e redução de um composto é controlada pelo potencial óxido-redutor de seu ambiente. Assim, a direção e a intensidade da síntese microbiana dependem consideravelmente das condições de oxidorredução na cultura (BALAKIREVA *et al.*, 1974), pois, o potencial redox do ambiente que circunda o microrganismo pode ser um importante determinante de sua atividade metabólica (THOMPSON e GERSON, 1985).

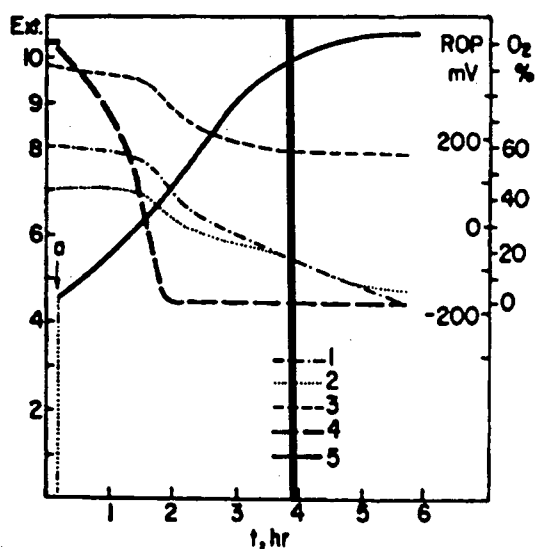
O potencial óxido-redutor é uma medida útil e sensível para monitorar as alterações do estado metabólico que ocorrem enquanto a concentração de oxigênio dissolvido é zero (KWONG e RAO, 1991), bem como um fator determinante no crescimento microbiano que pode agir como um agente seletivo e como um fator que interfere na produção de metabólitos. O eletrodo redox pode fornecer uma sensível indicação do baixo nível de concentração de oxigênio dissolvido (PREEZ *et al.*, 1988). O limite de detecção de oxigênio é aproximadamente 0,1 mg/L para sensores específicos correntemente disponíveis. (JANSSEN *et al.*, 1998).

As culturas de microrganismos apresentam um potencial redox que é gerado pela existência de pares que realizam trocas óxido-redução reversíveis, de redutores irreversíveis e da ação do oxigênio dissolvido e do hidrogênio livre (JACOB, 1974), temperatura e a presença de outros compostos capazes de serem oxidados ou reduzidos (THOMPSON e GERSON, 1985). A ação dos pares que realizam trocas redox reversíveis e redutores irreversíveis pode ser demonstrada para cada caso onde o potencial de óxido-redução de uma solução dependa de seus componentes. Contudo, a medida das alterações (trocas) da quantidade destes componentes durante o cultivo é muito difícil e apenas em alguns casos é conhecido o efeito dos produtos sobre o metabolismo; geralmente as concentrações são muito pequenas. Por outro lado, a ação do oxigênio e hidrogênio sobre o potencial de óxido-redução pode ser facilmente acompanhada (JACOB, 1974), uma vez que o par redox  $O_2/H_2O$  e o pH determinam a magnitude do potencial redox da cultura em fermentações aeróbicas (HIGAREDA *et al.*, 1997).

JACOB (1974), nas Figuras 2.7 e 2.8, apresenta os dados da variação do potencial óxido-redutor, da concentração de oxigênio e da absorvância do meio, em uma cultura de *Proteus vulgaris* SG2 e *Staphylococcus aureus* SG 511, respectivamente, utilizando eletrodos redox limpos mecanicamente, através de polimento, ou limpos por imersão em ácido, bem como, coberto por membrana. O pesquisador observou que a primeira parte da negatificação do potencial de óxido-redução é mais ou menos a mesma em ambos os casos e isto pode ser considerado como o resultado do consumo de oxigênio pela bactéria. No final da fase logarítmica de crescimento, sinalizada pela linha paralela às ordenadas, houve um ligeiro aumento da taxa de negatificação do potencial óxido-redutor.



**Figura 2.7.** Medida simultânea de diferentes parâmetros durante o crescimento da cultura de *Proteus vulgaris* SG2. Medida do potencial óxido-redutor utilizando: (1) eletrodo limpo mecanicamente (polimento); (2) eletrodo limpo com ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) e (3) eletrodo coberto por membrana (Clark type); (4) concentração de oxigênio dissolvido; (5) absorvância (JACOB, 1974).



**Figura 2.8.** Medida simultânea de diferentes parâmetros durante o crescimento da cultura de *Staphylococcus aureus* SG 511. Medida do potencial óxido-redutor utilizando: (1) eletrodo limpo mecanicamente (polimento); (2) eletrodo limpo com ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) e (3) eletrodo coberto por membrana (Clark type); (4) concentração de oxigênio dissolvido; (5) absorvância (JACOB, 1974).

### 2.13.5. Controle do Potencial Redox

Toda célula, ainda que grosseiramente, pode ser considerada como um compartimento com uma solução aquosa. Tal compartimento separa-se de um outro compartimento (extracelular), por meio de uma membrana plasmática semi-permeável. Tal membrana permite a passagem de alguns elementos livremente ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , etc) e impede a passagem de outros elementos (proteínas). A diferença de concentração dos diversos elementos intra e extracelulares existe devido a um complicado sistema que os mantém aparentemente desequilibrados. Esse desequilíbrio gera um potencial elétrico. Na verdade, tal potencial só existe por que há uma diferença relativa de cargas elétricas entre o meio intracelular e o meio extracelular, sendo o intracelular, negativo e o extracelular, positivo.

Existem duas maneiras de controlar o potencial redox da cultura a fim de controlar o metabolismo no interior das células. Uma forma é pela adição de agentes redutores em um sistema anaeróbio, e a outra é pelo controle da concentração de oxigênio dissolvido em sistemas aeróbios. Ainda, outro meio não amplamente usado é por via eletroquímica. A adição de agentes redutores pode também alterar a quantidade de oxigênio dissolvido. Este inconveniente pode ser resolvido pelo posicionamento da cultura a elevados níveis de oxigênio dissolvido e adição de um agente redutor que não consegue se oxidar rapidamente (KWONG e RAO., 1992; THOMPSON e GERSON, 1985).

Além da eliminação de oxigênio, a adição de agentes redutores pode também alterar o potencial redox da cultura da fermentação. Este fenômeno foi estudado em culturas anaeróbicas, e os resultados indicaram que alguns agentes redutores podem alterar a velocidade de crescimento específica e as rotas de fluxo de elétrons.

Diferentes autores utilizaram diferentes agentes redutores em seus ensaios. RIONDET *et al.* (2000) utilizaram DTT e boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ); BESPALOV *et al.* (1996) empregaram 2-mercaptoetanol, DTT e  $\text{NaBH}_4$ ; THOMPSON e GERSON (1985) usaram tioglicolato de sódio ou cisteína. SMITH e PIERSON (1979) usaram 2-mercaptoetanol, hidrocloreto de cisteína, tioglicolato de sódio e ácido ascórbico, sendo o meio continuamente misturado com um agitador magnético submerso.

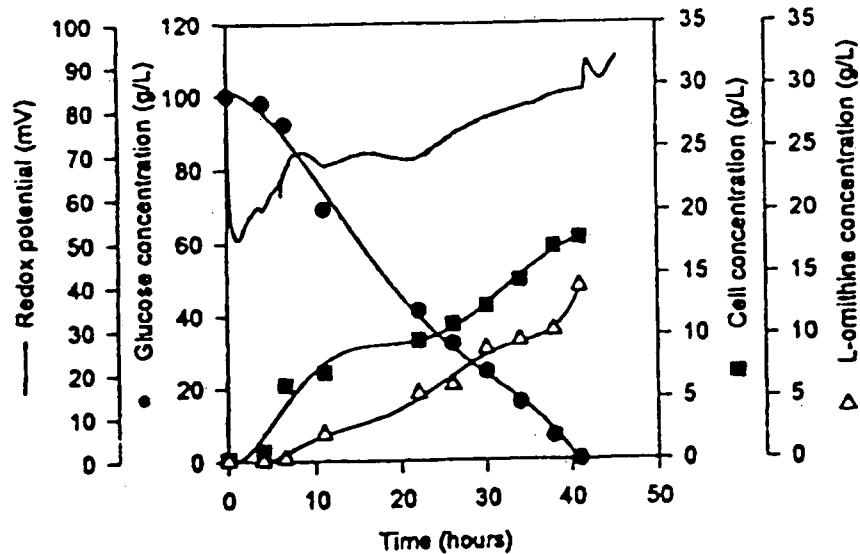
Poucas são as explanações a respeito da variação do potencial redox. Contudo, OKTYABR'SKII e SMIRNOVA (1989), citado em HIGAREDA *et al.* (1997), demonstraram que alterações no potencial redox da cultura podem ser causadas pela ação de compostos que afetam o pH intracelular.

### 2.13.6. Potencial redox e o estado fisiológico microbiano

Existe uma relação entre potencial redox e o estado fisiológico de um sistema microbiano, haja vista que o valor do potencial redox afeta o estado metabólico da célula. Diferentes comportamentos de potencial redox a várias fases de crescimento podem ser explicadas pela alteração do estado metabólico das células, que são representadas pelos perfis de crescimento celular, consumo de substrato e concentração de produtos. O comportamento do potencial redox parece estar fortemente relacionado ao crescimento celular.

Um exemplo dessa correlação pode ser estudado no trabalho de LEE *et al.* (1998) em cultura de *Brevibacterium ketoglutamicum*, em batelada, para produção de L-ornitina. Foi observado que o potencial óxido-redutor aumenta rapidamente na primeira fase após uma rápida queda por um curto intervalo de tempo. Esta queda foi explicada por KWONG *et al.* (1992), em seu trabalho referente a atividade metabólica baseada no potencial redox da cultura e perfis de oxigênio dissolvido durante fermentação aeróbica, como um fenômeno correspondente à fase lag. O potencial redox foi mantido quase constante a 67 mV, quando o crescimento celular foi retardado devido à depleção de arginina. Como apresentado na Figura 2.9, este comportamento continua por 15 horas. Resultado interessante foi que a ornitina, o produto, começou a ser produzido significativamente ao final da primeira fase, coincidindo com a diminuição da repressão da arginina sobre sua produção. Após o período estacionário, o peso seco celular aumentou novamente. Isto foi considerado resultado do aparecimento de células que voltaram a sua condição anterior, ou seja, perderam as características de arginina auxotróficos sob uma prolongada condição de depleção de arginina. O potencial redox aumentou novamente na terceira fase mas a inclinação foi menor que na primeira fase. Após a glicose ser completamente consumida, o potencial redox começou a aumentar mais rapidamente na quarta fase. Os autores consideram que estes resultados permitem prever “on line” o estado fisiológico da cultura a partir do perfil do potencial redox sem monitoramento “on line” de outra variável de estado (LEE *et al.*, 1998).

Outros trabalhos também revelam a relação do potencial redox com a condição fisiológica das cultura microbianas. WIMPENNY (1969), mostrou que o potencial redox tem um efeito sobre o ciclo dos ácidos tricarbóxicos e a cadeia respiratória. Também registrou que o potencial redox aumentou sob condições aeróbicas e que influenciou as enzimas do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, citocromo, “pool” de ATP, rendimento do crescimento e atividade hidrogenase.



**Figura 2.9.** Perfis de concentração de células, glicose e L-ornitina e potencial redox a 10% de concentração de oxigênio dissolvido (LEE *et al.*, 1998).

KWONG e RAO (1991) estudaram o monitoramento de um processo de produção de aminoácidos pela medida do potencial redox. HIGAREDA *et al.* (1997) estudaram o uso do potencial redox e a velocidade de assimilação de oxigênio pela avaliação da depleção de glicose e glutamina. Sabe-se que, assim que a glicose é exaurida do meio, o consumo de oxigênio diminui e, conseqüentemente, o potencial redox e a concentração de oxigênio dissolvido aumentam (KJAERGAARD e JOERGENSEN, 1979). LEE *et al.* (1998) utilizaram o potencial redox para sinalizar o princípio da fase de crescimento e fase de morte, bem como a depleção de nutrientes.

### 2.13.7. Aplicações atuais do potencial redox

O potencial redox é aplicado com sucesso em plantas de tratamento biológico de águas residuárias como um parâmetro para processos de nitrificação/denitrificação. Seu uso também tem atingido êxito na remoção biológica de fósforo (JANSSEN, 1998).



# CAPÍTULO 3.

## Material e Métodos

Neste capítulo são apresentadas as descrições dos equipamentos e metodologias utilizadas para execução dos experimentos realizados. As técnicas analíticas adotadas para as determinações das concentrações celulares, do consumo de substrato e produção de P(3HB), bem como os procedimentos experimentais adotados também estão descritas.

### 3.1. Microrganismo

A linhagem de microrganismo utilizada é a *Ralstonia eutropha* DSM 545 devido à sua capacidade de utilizar glicose como fonte de carbono, haja vista ser um mutante espontâneo.

A cepa de *R. eutropha* é mantida em um meio ágar nutriente sólido (NA) sob refrigeração. A composição deste meio é de 5,0 g/L de peptona de carne, 3,0 g/L de extrato de carne e 1,5% de ágar.

### 3.2. Meios de Cultura

Dois meios de cultura líquidos são utilizados:

3.2.1. **Caldo Nutriente (Nutrient Broth – NB):** utilizado na primeira pré-cultura que possui a seguinte composição: peptona de carne, 5,0 g/L; extrato de carne 3,0 g/L.

3.2.2. **Meio Mineral (MM):** utilizado na segunda pré-cultura (MM1) e como meio final (MM2). Está baseado em RAMSAY *et al.*(1990), modificado por ARAGÃO *et al.* (1996) cuja a composição é dada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Composição do meio mineral (MM).

Soluções	Reagentes	Concentração do meio (g/L)
		MM
1	Ácido Nitrolacético	0,19
	Citrato Ferroso de Amônia	0,06
	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,50
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01
	Solução de Oligoelementos <sup>a</sup>	1mL/L
	2	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,50*
3	Fonte de Carbono	30,00
4	NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	5,00 <sup>+</sup>

<sup>a</sup> a composição da solução concentrada de oligo-elementos é dada na Tabela 3.2

\* concentração para crescimento não limitado em fosfato.

<sup>+</sup> concentração para crescimento não limitado em nitrogênio.

O pH da solução 1 é ajustado a 7,0 com KOH 5M. As soluções 1, 2 e 3 são autoclavadas separadamente durante 20 minutos a 120°C e adicionadas assepticamente para compor o meio final. A solução 4 é adicionada à solução 1 anteriormente à esterilização.

Tabela 3.2. Composição da solução concentrada de oligo-elementos.

Elemento	Concentração (g/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	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
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,01

### **3.4. Culturas em Frascos Agitados**

Duas pré-culturas são necessárias para a cultura de *Ralstonia eutropha*. A primeira é realizada em um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 150 mL de meio NB inoculado com duas a três alçadas da cepa mantida em meio ágar. Esta pré-cultura é incubada durante 24 h à temperatura de 30 °C, sob agitação de 150 rpm. Após este período, um segundo frasco Erlenmeyer aletado de 500 mL, contendo 150 mL de meio MM, recebe uma quantidade correspondente a 10% de seu volume final de inóculo proveniente do meio NB. Este meio MM também é incubado durante 24 h à temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm. A concentração e a fonte de carbono são dependentes do ensaio realizado.

Nas análises preliminares, a cultura final para o crescimento do microrganismo é feita em frasco erlenmeyer aletado de 1000 mL, contendo 300 mL de meio MM e incubada à temperatura de 30 °C, sob agitação de 150 rpm. A inoculação é feita a 10% de seu volume a partir da pré-cultura anteriormente preparada em meio MM. Da mesma maneira, a fonte de carbono depende do ensaio a ser realizado.

#### **3.4.1. Preparo das soluções das fontes de carbono**

##### **3.4.4.1. Glicose, Açúcar Invertido**

Prepara-se uma solução concentrada (500 g/L), do respectivo açúcar, a ser adicionada aos frascos agitados para proporcionar uma concentração final no meio de cultivo de acordo com o experimento realizado.

### **3.5. Culturas em Biorreator**

As culturas são realizadas em biorreator de 5 L (BIOFLO III, fabricado pela New Brunswick Scientific CO.). O fermentador, contendo a solução 1 do meio MM2 (item 3.2.2), é autoclavado durante 20 minutos a 120 °C. O volume de trabalho é de 4 L com 10% de seu volume de inóculo.

#### **3.5.1. Preparo do meio de cultura**

##### **3.5.1.1. Solução de açúcar invertido**

Prepara-se uma solução concentrada (500 g/L) de açúcar a ser adicionada ao biorreator para proporcionar uma concentração final de 30 g/L no meio de cultivo.

### 3.5.1.2. Solução de Fosfato

A solução de fosfato é preparada de maneira a ocorrer a limitação deste nutriente em aproximadamente 10 g/L de concentração celular. Uma solução concentrada contendo 223,8 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  e 32,5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  é adicionada ao meio para a obtenção de uma concentração de fosfato de 8,95 g/L e 1,5 g/L respectivamente, para condição não limitante e 0,51 g/L e 0,07 g/L, respectivamente, para condição limitante.

### 3.5.2. Preparo do Inóculo

O meio de cultura do inóculo é o mesmo citado no item 2.3, acrescido da solução de açúcar de acordo com o ensaio. O volume de trabalho é de 400 mL em frasco de 1000 mL, a temperatura de operação é de 30°C, a agitação 150 rpm e o tempo de cultura é determinado através da concentração celular. Quando esta atinge um valor de aproximadamente 5 g/L segue-se a inoculação do meio de cultura.

### 3.5.3. Condições de Operação

A temperatura para o desenvolvimento da cultura é mantida constante a 30°C e o pH ajustado automaticamente a 7,0. Em todos os ensaios  $\text{NH}_4\text{OH}$  5% foi utilizado para corrigir pH ácidos e, segundo a necessidade do estudo,  $\text{HCl}$  1M foi utilizado para corrigir pH básicos.

As condições iniciais de agitação e aeração são de 400 rpm e 0,04 vvm, respectivamente, e atingiram, gradualmente, 780 rpm e 1 vvm. O polietilenoglicol é utilizado como antiespumante.

O eletrodo redox (ANALION) antes de cada ensaio foi submetido, conforme recomendações técnicas, a uma limpeza do anel de platina, primeiramente, por imersão em solução de Pepsina por 30 minutos, seguido por imersão em solução de Tiuréia por 15 minutos. Logo após fez-se a calibração imergindo o eletrodo em uma solução padrão (DM-S7B, DIGIMED) a 25°C até estabilizar o valor do potencial óxido-redutor em 228 mV.

### 3.5.4. Estratégias de Alimentação

#### 3.5.4.1. Alimentação em Açúcar invertido

Açúcar invertido é alimentado sempre que sua concentração decresce a aproximadamente 10 g/L. Este valor é monitorado através do método de DNS, como será descrito no item 3.6.3.1. A alimentação deve ser realizada de forma a proporcionar uma concentração final de 30 g/L de açúcar invertido.

### **3.6. Métodos Analíticos**

#### **3.6.1. Amostragem**

A amostragem nos ensaios em frascos agitados é realizada em intervalos de 2 horas. O volume de amostra retirado é de 2 mL para leitura em espectrofotômetro.

Nos ensaios em biorreator, descartam-se inicialmente 10 mL, e amostras, de 20 mL são retiradas nos momentos de coleta.

As amostras são congeladas em duplicata a  $-20^{\circ}\text{C}$ , depois de devidamente preparadas para posterior análise. Duplicatas são guardadas para eventualidade de ser necessário a realização de novas análises.

#### **3.6.2. Determinação da Concentração da Biomassa**

A concentração celular é determinada por dois métodos: por espectrometria (durante a cultura) e por gravimetria.

##### **3.6.2.1. Medida espectrofotométrica**

A concentração de biomassa do material coletado é avaliada em um espectrofotômetro (modelo E225-D, marca CELM) medindo-se a absorvância a 600 nm. Para manter uma precisão adequada (região linear), a faixa de absorvância utilizada é de 0,000 até 0,800. A partir deste valor, são feitas diluições para manter a linearidade.

##### **3.6.2.2. Medida gravimétrica**

A concentração celular é obtida por gravimetria a partir de um volume conhecido de cultura compreendido entre 1 e 10 mL, filtrado através de membranas Millipore de poliamida pré-pesadas (poro de  $0,2\ \mu\text{m}$ ). O filtrado é lavado duas vezes com HCl 0,01M, para remover íons e sais presentes na biomassa, seguido de secagem em estufa a  $90^{\circ}\text{C}$  por 24 h. A existência de uma relação linear entre a biomassa e a absorvância a 600 nm, na fase de acúmulo celular, permite construir uma curva de calibração de biomassa em função da absorvância que serve para estimar a concentração de células durante a fase de crescimento da cultura.

### 3.6.3. Dosagem de Substratos

#### 3.6.3.1. Açúcar Redutor

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

I. 300 g tartarato duplo de sódio e potássio e 16 g de NaOH dissolvido em água destilada.

II. adicionar aos poucos 10 g de ácido dinitrosalicílico (aquecer se necessário).

III. completar volume a 1 litro de água destilada.

A metodologia de análise é a seguinte: um volume de 400  $\mu$ l de sobrenadante, previamente diluído, é adicionado a 400  $\mu$ l de reativo DNS e depois colocado em ebulição, durante 5 minutos, em banho-maria. Após o resfriamento em banho de gelo, adiciona-se 4 mL de água destilada. Um tempo de 15 minutos é necessário para que a amostra se estabilize à temperatura ambiente. A leitura espectrofotométrica é realizada a 540 nm contra um branco de água destilada. A escala é compreendida entre 0 e 2 g/L de glicose. A curva de calibração expressa a concentração de glicose (g/L) vs. absorvância (540nm). O Anexo 2 apresenta um exemplo de curva padrão.

#### 3.6.3.2. Proteínas

Amostras do meio de cultura compreendendo 2 mL, são centrifugadas a 15.000 rpm por 5 minutos e o precipitado é lavado duas vezes com água destilada e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise pelo método de Biureto (Stickland, 1951). O precipitado é ressuspenso em 5,5 mL de água destilada e a lise celular é provocada por adição de 1mL de NaOH 20% (p/v) e incubação em banho-maria a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Após resfriamento, 170  $\mu$ L de  $\text{CuSO}_4$  25% (p/v) são adicionados, e deixam-se em repouso por mais 5 minutos. O sobrenadante obtido, após centrifugação a 5000 rpm durante 10 minutos, é analisado por espectrofotometria em um comprimento de onda de 560 nm. A concentração em g/L é obtida através de uma curva de calibração de proteína (g/L) vs absorvância (560nm), utilizando albumina bovina (BSA) entre 0 e 3g/L como padrão conforme ilustrado no Anexo 3.

### 3.6.3.3. Dosagem de Fosfato

Para a dosagem do fosfato é utilizado um kit colorimétrico (Fosfato Dolles). Os reagentes utilizados são os seguintes:

Solução Padrão: solução aquosa contendo 5 mg/dL de fósforo;

Ácido Ascórbico: frasco contendo 2 g de ácido ascórbico. Após reconstituição, tem-se uma solução 0,084 M de ácido ascórbico.

Reagente Molibdato: solução 0,018 M de molibdato de amônio em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 M.

Solução alcalina: solução 16 M de monoetanolamina.

Identificam-se 5 tubos de ensaio com B (branco), T (teste) e P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, (padrões) e procede-se conforme a seqüência apresentada na Tabela 3.4.

Agita-se e deixa-se repousar por 2 minutos. Lêem-se as absorvâncias de teste e padrão, ajustando-se o zero com o branco, em espectrofotômetro em 660nm.

A concentração de fosfato é calculada em g/L de acordo com a equação 3.1, onde abs é a absorvância lida, sendo abspadrão a média das absorvâncias dos padrões.

$$\text{Fosfato (g/L)} = \frac{\text{abs (teste)} \times 0,05}{\text{abs (padrão)}} \quad (\text{Eq.3.1})$$

**Tabela 3.4.** Seqüência para a dosagem de fosfato.

	Branco	Teste	Padrão
Ácido Ascórbico	3 mL	3 mL	3 mL
Amostra	-	100 µL	-
Solução padrão	-	-	100 µL
Reagente Molibdato	1 mL	1 mL	1 mL
As proteínas se precipitam. Deixar repousar durante 1 minuto			
Solução alcalina	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL

### 3.6.3.4. Dosagem de NADPH

Células são coletadas, centrifugadas e lavadas duas vezes com 3mL de tampão fosfato padrão (PBS). Em seguida, são ressuspensas com 0,15 mL de tampão extrator contendo 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0; 0,01 M EDTA e 0,05% (v/v) Triton X-100 e transferido para um tubo Ependorf (1,5 mL). A suspensão de célula é sonicada sobre gelo por 2 minutos com intervalo de 30 segundos. Em seguida, a solução é centrifugada a 5000 rpm/5min. O sobrenadante é coletado e imediatamente analisado NADPH.

NADPH é analisado espectrofotometricamente baseado na medida da absorbância da coenzima reduzida a 340 nm.

Três leituras são realizadas:

A1. A leitura do extrato que representa a quantidade total de NADPH e NADH na amostra.

A2. Uma alíquota do extrato (50  $\mu$ L) é incubada com glutathiona redutase para converter todo NADPH na amostra a NADP<sup>+</sup>. A mistura reagente contém 0,1 M de tampão fosfato, pH 7,6; 0,05 mM EDTA; 0,05% (v/v) Triton X-100; 0,005 M glutathiona, 5 UI glutathiona redutase (GR); 50  $\mu$ L de extrato em um volume total de 1,00 mL.

As reações para glicose-6-fosfato desidrogenase e glutathiona redutase são preincubadas a 37°C e 25°C, respectivamente, por 5 min na ausência de substrato para a enzima.

As reações são iniciadas pela adição de glicose-6-fosfato e glutathiona, respectivamente para glicose-6-fosfato desidrogenase e glutathiona redutase, e as misturas reagentes são incubadas a 37°C (para G6PD) e 25°C (para GR) por 5 min.

A absorbância das misturas a 340 nm é medida usando espectrofotômetro, onde:

$$A1 - A2 = \text{quantidade total de NADPH na amostra}$$

A concentração molar é calculada a partir do coeficiente de absorção molar (ou coeficiente de extinção molar) que é o coeficiente de absorção específico por concentração de 1mol.dm<sup>-3</sup> e um comprimento de caminho óptico de 1cm. Para uma solução um molar (1 M), o coeficiente de extinção molar de NADPH vale 6,22 x 10<sup>6</sup> cm<sup>2</sup>, para absorbância a 340 nm.



### 3.6.3.5. Dosagem de P(3HB)

O P(3HB) é dosado por cromatografia gasosa conforme o método de metanólise baseado em Braunegg *et al.* (1978), com as modificações propostas por Brandl *et al.* (1988).

As amostras, com volume conhecido de meio de cultura, são centrifugadas a 15.000 rpm por 5 minutos. O precipitado é lavado duas vezes com água destilada e a última ressuspensão é realizada em 2 mL de metanol acidificado ( $H_2SO_4$  15%), contendo ácido benzóico 0,4 g/L como padrão interno. A amostra é então congelada a  $-20^\circ C$  para posterior análise. Após descongelamento, um volume de 2 mL de clorofórmio é adicionado e a mistura aquecida a  $100^\circ C$  durante 140 minutos. Depois de 1 hora de aquecimento, a mistura é agitada durante alguns segundos e devolvida ao aquecimento. Após resfriamento à temperatura ambiente, adiciona-se 1 mL de água destilada e as amostras são agitadas durante 30 segundos, seguido de decantação. A fase orgânica (inferior) é retirada com uma seringa e guarda-se em geladeira para posterior análise em cromatografia gasosa. A curva padrão (Anexo 4) é feita utilizando-se o poli-3-hidroxi-butirato (Sigma), como padrão externo, com massa variando entre 0,0010 g e 0,0100 g. Submetem-se os padrões à mesma metanólise que as amostras. A coluna utilizada para dosagem do P(3HB) é de sílica fundida ( $\varnothing 0,53\text{mm} \times 30\text{m}$ ) modelo Supercowax-10. O cromatógrafo é um CG-90 equipado com um detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio). O gás de arraste utilizado é o nitrogênio a 20 mL/min e as temperaturas de injeção, detecção e coluna são respectivamente de  $185^\circ C$ ,  $230^\circ C$  e  $110^\circ C$ . O volume injetado é de 1  $\mu\text{L}$ . A integração e os cromatogramas foram obtidos através de uma placa interface AD/DA-MICROQUÍMICA.

## 3.7. Tratamento de Dados

### 3.7.1. Ajuste dos Dados Experimentais

Os dados experimentais obtidos são ajustados pelo programa Lissage, desenvolvido pelo laboratório do “Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse” França, por Ardaillon-Simoes, Arroyo, Uribe Larrea.

### 3.7.2. Análise Cinética

Como o acúmulo de P(3HB-co-3HV) é intracelular, as taxas específicas de crescimento celular devem ser calculadas em relação à biomassa residual ( $X_r$ ), obtida pela diferença entre a quantidade de biomassa total ( $X_t$ ) e a quantidade de P(3HB-co-3HV) ( $X_r = X_t - P(3HB-co-3HV)$ ).

#### 3.7.2.1. Velocidades Específicas de Crescimento

As velocidades específicas máximas de crescimento na fase de crescimento não limitado são calculadas a partir do coeficiente angular da curva linearizada pelo logaritmo neperiano da biomassa residual com o tempo de acordo com a equação 3.4.

$$\ln(X_r) = \ln(X_{r0}) + \mu t \quad (\text{Eq. 3.4})$$

Onde:

$X_r$  = biomassa residual (g)

$X_{r0}$  = biomassa residual inicial (g)

$\mu_{\max}$  = velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\text{h}^{-1}$ )

$t$  = tempo (h)

#### 3.7.3. Produtividade Média de P(3HB)

A produtividade média, ilustrada na equação 3.3, é calculada pela diferença entre a concentração de P(3HB-co-3HV) em um instante de tempo  $t$  e a concentração inicial de P(3HB-co-3HV) dividida pelo intervalo de tempo correspondente.

$$P_r = \frac{P(3HB)_t - P(3HB)_{t_0}}{t - t_0} \quad (\text{Eq. 3.5})$$

Onde:

$P_r$  = produtividade média de P(3HB) (g/L.h).

$P(3HB)_t$  = quantidade de P(3HB) no instante de tempo  $t$  (g).

$P(3HB)_{t_0}$  = quantidade de P(3HB) no tempo  $t_0$  inicial (g).

#### **3.7.4. Produtividade Instantânea de P(3HB)**

A produtividade instantânea (g/L.h) indica a concentração do biopolímero produzido pontualmente a cada tempo. Os valores da produtividade são obtidos a partir da derivada da curva da concentração de biopolímeros (g) em função do tempo (h) e do volume (L), no programa LISSAGE.

# CAPÍTULO 4.

## Resultados e Discussão

### 4.1. Experimentos realizados

A condução dos experimentos foi realizada em 4 etapas, descritas a seguir.

Etapa 1: experimentos em frascos erlenmeyer agitados buscando verificar a relação entre o potencial redox e o crescimento celular, a partir da limitação dos nutrientes nitrogênio ou fósforo;

Etapa 2: cultivos de *Ralstonia eutropha* DSM 545, em fermentador (5L), pH constante, em meio mineral com limitação do nutriente fósforo (carência) na fase de produção, visando sinalizar o instante de exaustão do agente limitante;

Etapa 3: cultivo de *Ralstonia eutropha* DSM 545, em frasco erlenmeyer agitado, em meio complexo com salmoura de processamento de chucrute, visando obter uma correlação entre os perfis de crescimento celular e potencial de oxido-redução.

Etapa 4: cultivos de *Ralstonia eutropha* DSM 545, em fermentador (5L), em meio mineral com limitação do nutriente fósforo (carência) na fase de produção e adição de agente redutor ditioneitol (DTT) para verificar a influência da condição oxido-redutora do ambiente sobre o crescimento celular e sobre a condição oxido-redutora intracelular.

## 4.2. Culturas em Frascos Erlenmeyer

O monitoramento de Eh já tem sido estudado em alguns trabalhos para identificação de alterações das condições óxido-redutoras de culturas microbianas, visando seu controle.

Nesta etapa do trabalho, foram realizados ensaios preliminares para avaliar o comportamento do potencial de óxido-redução durante o cultivo de *Ralstonia eutropha* DSM545, em diferentes substratos, visando a produção de PHA.

### 4.2.1. Evolução do Eh ao longo da cultura de *R. eutropha* DSM 545 utilizando glicose como substrato.

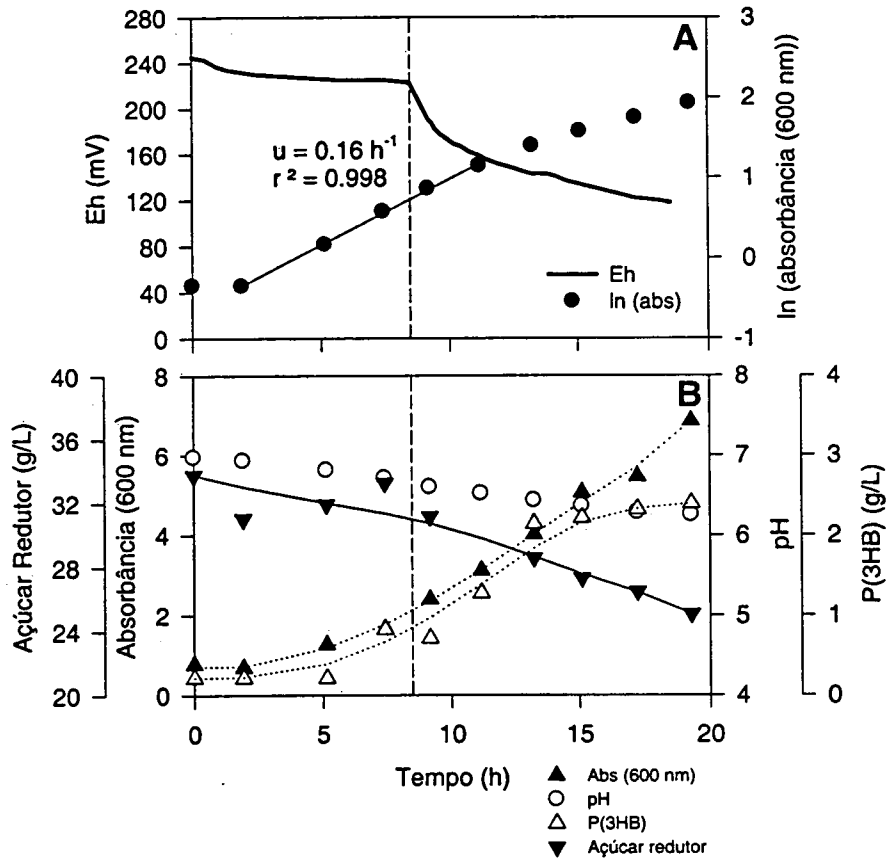
Objetivando estudar a variação do Eh ao longo da cultura de *R. eutropha*, a bactéria foi cultivada em frascos Erlenmeyer agitados, em meio MM, contendo glicose (30 g/L) e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na concentração limitante de 2,3 g/L.

A Figura 4.1 apresenta a evolução dos parâmetros cinéticos:  $\ln(\text{absorbância})$ , potencial de óxido-redução (Eh) (Figura 4.1 - A), absorbância (600 nm), pH, concentração do biopolímero P(3HB) e concentração de açúcar redutor (Figura 4.1 - B), obtidos ao longo desta cultura.

A evolução de  $\ln(\text{absorbância})$  (Figura 4.1 - A) mostra uma fase lag correspondente a aproximadamente 2 horas de cultivo, seguida de uma fase exponencial cujo valor da velocidade específica de crescimento máxima ( $\mu_{\text{max}}$ ) é de  $0,16 \text{ h}^{-1}$ . Este valor de  $\mu_{\text{max}}$  está abaixo dos valores de  $0,19 \text{ h}^{-1}$  e  $0,23 \text{ h}^{-1}$  encontrados, respectivamente, por OLIVEIRA (1999) e MARANGONI *et al.* (2001). Contudo, cabe lembrar que o presente trabalho foi realizado em frascos Erlenmeyer não aletados, o que pode ter causado a diminuição da velocidade específica de crescimento do microrganismo.

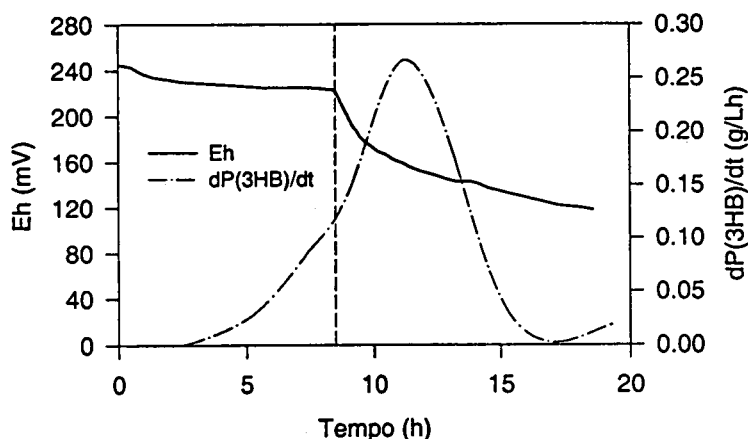
A fase de estabilização do valor de Eh e um período referente à sua diminuição, indicam a fase de crescimento exponencial da cultura. A comparação entre a curva de  $\ln(\text{absorbância (600 nm)})$  e o comportamento de Eh, permite afirmar que a súbita queda do valor de Eh (230 mV para 140 mV), a 8,5 horas de cultura, está próxima ao início da fase de desaceleração do crescimento, a qual pode ser observada pela alteração da velocidade específica de crescimento.

Observa-se ainda, pela Figura 4.1 - B, que a variação do pH não está correlacionada com a variação de Eh. Deste modo podemos afirmar que a variação de Eh não é causada apenas pela variação de pH do meio de cultivo durante a cultura.



**Figura 4.1.** Evolução do Eh (—), (ln (abs)) (●) (Figura 4.1-A), absorbância (600 nm) (▲), P(3HB) (△), açúcar redutor (▼) e pH (○) (Figura 4.1-B), durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em glicose, sob limitação de nitrogênio.

A Figura 4.2 apresenta as curvas da produtividade instantânea, e do Eh em função do tempo. Nesta figura, pode-se verificar que o instante da súbita queda do valor de Eh (8,5 h) é um pouco anterior ao momento da produtividade instantânea máxima (11,2 h) e que esta é igual a (0,27 g/L.h).



**Figura 4.2.** Evolução do Eh (—), produtividade instantânea (---) durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em glicose, sob limitação de nitrogênio.

Como para a produção de PHA por *R. eutropha*, a estratégia mais utilizada é a de permitir uma fase de crescimento celular não limitado e posteriormente uma fase de acúmulo de polímero sem limitação de carbono, porém com limitação de algum outro nutriente essencial ao crescimento, o conhecimento prévio do início da limitação é de importância fundamental. Este conhecimento permite controlar e otimizar a produção de polímero. As observações, feitas neste estudo, levam a crer que o monitoramento do Eh pode ser realizado permitindo um maior controle da cultura e, conseqüentemente, maior produtividade em biopolímero.

Para melhor avaliar esta hipótese, estudos com outros substratos foram realizados e são apresentados nos tópicos a seguir.

#### 4.2.2. Evolução do Eh ao longo da cultura de *R. eutropha* DSM 545 utilizando açúcar invertido como substrato.

A evolução de Eh de cultura de *R. eutropha* DSM545 utilizando glicose como substrato, e limitação em nitrogênio, indicou o momento da limitação. Foram, então, realizados outros estudos utilizando outra fonte de carbono como substrato.

Para este estudo a cultura de *Ralstonia eutropha* DSM 545 foi realizada em frascos Erlenmeyer aletados e agitados, em meio MM contendo açúcar invertido (30 g/L) e concentração limitante de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  de 0,51 g/L e 0,07 g/L, respectivamente.

A Figura 4.3 apresenta a evolução dos parâmetros cinéticos:  $\ln$  (absorbância), potencial de óxido-redução (Figura 4.3 - A), pH e absorbância (600 nm) (Figura 4.3 - B), obtidos ao longo desta cultura. A evolução de  $\ln(\text{absorbância})$  (Figura 4.3 - A) mostra uma pequena fase lag de aproximadamente 3,0 h, seguida de uma fase exponencial cujo  $\mu_{\text{max}}$  foi de  $0,21 \text{ h}^{-1}$ .

A comparação entre a curva de  $\ln$  (absorbância) e a curva do comportamento de Eh, permite afirmar que a diminuição de valor de Eh (220 mV para 197 mV), a 10 h de cultura, está próxima ao início da desaceleração do crescimento, observado pela alteração da velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\text{max}}$ ), confirmando o que ocorreu com o experimento em limitação de nitrogênio, utilizando glicose como substrato.

A queda do valor do pH (Figura 4.3-B) inicia anterior ao declínio de Eh. Mais uma vez confirmando que a variação de Eh não é devida apenas à variação do pH da cultura.

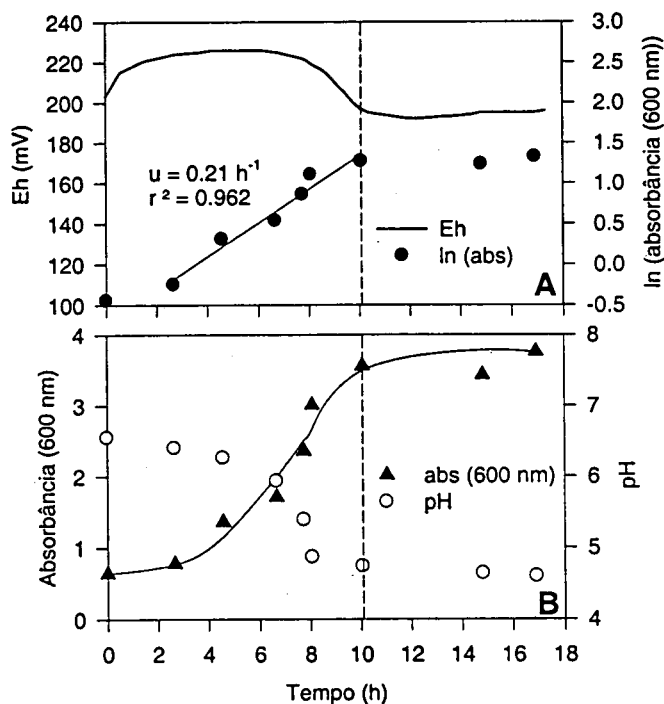


Figura 4.3. Evolução do Eh (—),  $\ln$  (abs) (●) (Figura 4.3-A), absorbância (600 nm) (▲) e pH (○) (Figura 4.3-B), durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em erlenmeyer, sob limitação de fósforo, com açúcar invertido como fonte de carbono.



#### 4.2.3. Evolução do Eh ao longo das culturas para o crescimento de *Ralstonia eutropha* DSM 545 e de *Ralstonia eutropha* SAC+ utilizando açúcar invertido e suplemento de sacarose como fonte de carbono.

Para avaliar se o mesmo comportamento de Eh ocorria em outras cepas, foi utilizada a cepa *R. eutropha* SAC+, que é mutante para a utilização de sacarose como fonte de carbono.

Culturas de *Ralstonia eutropha* DSM 545 e *Ralstonia eutropha* SAC+ foram realizadas em meio MM, sem limitação de sais, utilizando açúcar invertido e sacarose como fonte de carbono.

As etapas da cultura, bem como o preparo dos meios, seguiram a sequência já mencionada no capítulo Materiais e Métodos, excetuando a concentração de açúcar invertido utilizada que foi de 10 g/L, e a concentração de sacarose (5 g/L).

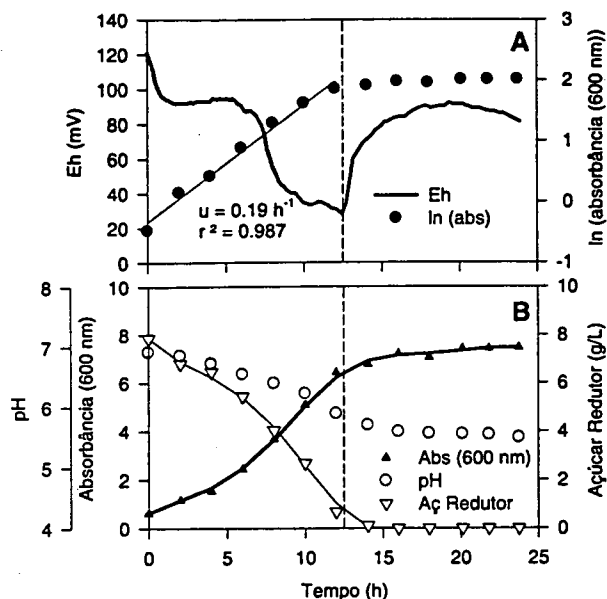
As Figuras 4.4-A e 4.5-A apresentam os dados das evoluções do potencial de oxidação-redução e de ln (absorbância), enquanto que as Figuras 4.4-B e 4.5-B apresentam os dados das evoluções do pH, absorbância (600 nm) e açúcar redutor, respectivamente para as culturas de *R. eutropha* DSM 545 e *R. eutropha* SAC+.

As Figuras 4.4-A e 4.5-A, a partir das curvas de ln (abs), mostram que não há uma fase lag bem definida, mostrando que a cultura está bem adaptada ao meio. A cultura de *R. eutropha* SAC+, na fase exponencial, apresenta velocidade específica de crescimento máxima ( $\mu_{max}$ ) de  $0,22 \text{ h}^{-1}$ , sendo este valor aproximado ao da cultura de *R. eutropha* DSM 545 que atingiu um  $\mu_{max}$  de  $0,19 \text{ h}^{-1}$ , coincidindo este valor com dados de OLIVEIRA (1999), quando apenas açúcar invertido foi fornecido a *R. eutropha* DSM 545.

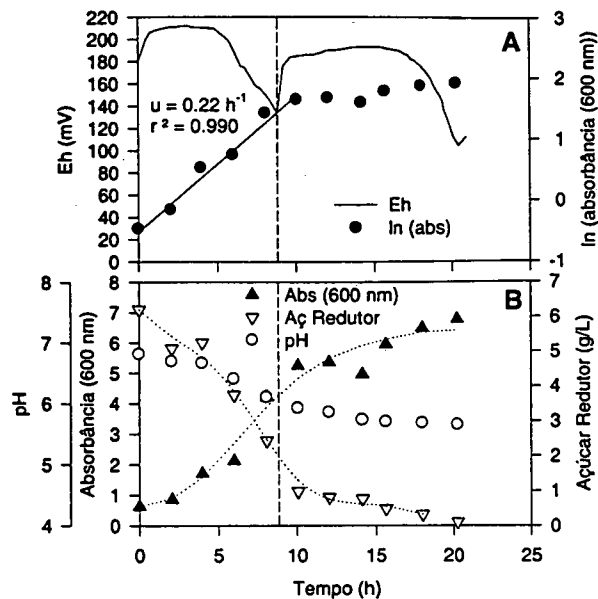
Durante a rápida fase lag das culturas, houve diferença de comportamento da evolução do Eh, que se estabiliza, em ambos os casos, no início da fase exponencial.

O comportamento de Eh coincide com o observado anteriormente em outros substratos onde a diminuição do valor de Eh corresponde ao início da desaceleração do crescimento celular.

Cabe ressaltar que nesta cultura, o Eh atinge um valor mínimo, em ambas as cepas, que coincide exatamente com o momento de início da fase estacionária, seguido de uma fase de aumento e estabilização. Perfil semelhante do Eh foi observado por JACOB (1974), Figura 2.8, na medida do crescimento de *S. aureus*, onde o Eh mostrou uma estabilização, seguida de uma diminuição, com o valor mínimo marcando o início da fase estacionária.



**Figura 4.4.** Evolução do Eh (—), (ln (abs)) (●) (Figura 4.4-A), absorbância (600 nm) (▲), açúcar redutor (▽) e pH (○) (Figura 4.4-B), durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em Erlenmeyer, com açúcar invertido e sacarose como fonte de carbono.



**Figura 4.5.** Evolução do Eh (—), (ln (abs)) (●) (Figura 4.5-A), absorbância (600 nm) (▲), açúcar redutor (▽) e pH (○) (Figura 4.5-B), durante a cultura de *R. eutropha* SAC+, em Erlenmeyer, com açúcar invertido e sacarose como fonte de carbono.

Como nestas culturas o meio não era limitado, a desaceleração do crescimento, após 8,5 horas para *R. eutropha* SAC+ e 12 horas para *R. eutropha* DSM 545, deve estar ligada à baixa concentração de açúcar redutor neste momento, respectivamente, 2,0 g/L e 0,68 g/L.

Assim, é possível verificar a importância do uso do eletrodo redox para avaliação do crescimento celular, uma vez que está caracterizada a sua capacidade de sinalizar a limitação em substrato para ambas as culturas, bem como a limitação em nitrogênio (item 4.2.1) e fósforo (item 4.2.2) ao longo das culturas.

O comportamento similar, tanto na velocidade específica de crescimento máxima ( $\mu_{\max}$ ) quanto no perfil do potencial de óxido-redução, leva a crer que a *R. eutropha* SAC+ não está consumindo a sacarose e que tenha perdido o plasmídeo que lhe conferia a capacidade para consumir esse dissacarídeo.

#### 4.2.4. Evolução do Eh ao longo das culturas de *R. eutropha* DSM 545 utilizando resíduo do processamento de chucrute como fonte de carbono.

Os experimentos anteriores mostraram claramente as mudanças da evolução de Eh durante o cultivo de *R. eutropha*, em meio sintético (MM), com substratos simples. Para verificar se o mesmo ocorre em meio complexo, foi utilizado um resíduo da indústria de alimentos como fonte de carbono, suplementado com os outros sais do meio. O resíduo escolhido foi a salmoura do processamento de chucrute por ser de fácil obtenção e ser resultante de um processo de fermentação láctica.

A salmoura de chucrute apresenta acidez entre 1,5 e 2,3% (p/v) em teor de lactato e uma concentração de 2,5 a 3,0% (p/v) de cloreto de sódio (NaCl), conforme dados fornecidos pela CIA Hemmer Indústria e Comércio de Blumenau.

Trabalhos realizados por TANAKA *et al.* (1993), TOHYAMA e SHIMIZU (1999) e KATOH *et al.* (1999) demonstraram que concentrações superiores a 5 g/L de ácido láctico apresentam efeito inibidor ao crescimento celular de *R. eutropha*. Assim, foi realizada a diluição da salmoura do chucrute para adequar a concentração de ácido láctico no meio de cultivo.

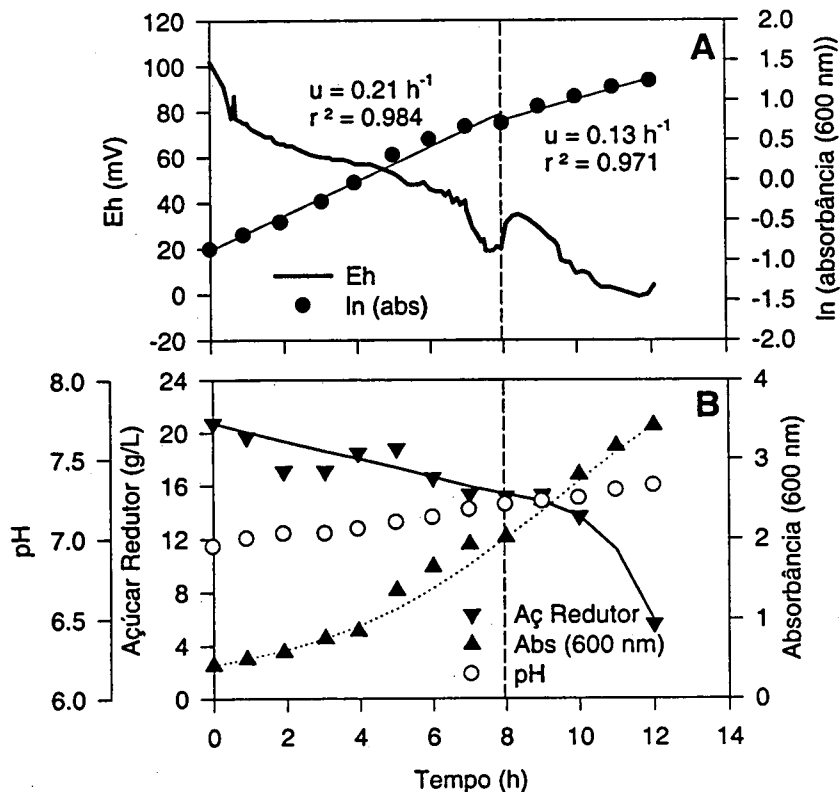
A concentração de NaCl também foi levada em consideração, uma vez que poderia ser outro fator limitante do crescimento, haja vista que poderia gerar estresse osmótico ao microrganismo. Contudo, a diluição da salmoura para adequação da concentração de ácido láctico diminuiu a concentração de NaCl a um nível aceitável para o crescimento da *R. eutropha*.

A análise de açúcares redutores do meio de cultura permitiu verificar que esse efluente industrial, além de fonte de lactato, também apresenta potencial como fonte de carboidratos simples, haja vista que, mesmo após a diluição, foi verificado um teor de açúcar redutor de aproximadamente 20 g/L.

O ensaio foi realizado em frascos Erlenmeyer de 1000 mL aletados e agitados, conforme as etapas já descritas no capítulo de Materiais e Métodos, tendo por diferença apenas o fato de que os sais (solução 1, item 2.3.2) foram adicionados à salmoura de chucrute previamente diluída.

A Figura 4.6 apresenta a evolução dos parâmetros cinéticos:  $\ln$  (absorbância), potencial de óxido-redução (Figura 4.6-A), pH, absorbância (600 nm) e concentração de açúcares redutores (Figura 4.6-B).

A evolução da Abs (600 nm) (Figura 4.6-B) não apresenta nitidamente uma fase lag. Na fase exponencial obteve-se um valor de  $\mu_{\max}$  de  $0,21 \text{ h}^{-1}$  (Figura 4.6-A). Este valor está próximo aos valores de  $0,22 \text{ h}^{-1}$  em açúcar invertido e  $0,23 \text{ h}^{-1}$  em mistura de lactato e açúcar invertido (OLIVEIRA, *et al.* 1999), porém inferior a  $0,42 \text{ h}^{-1}$  para lactato (ARAGÃO, 1986 e SONNLEITNER *et al.* 1979) e  $0,31 \text{ h}^{-1}$  (OLIVEIRA, *et al.* 1999).



**Figura 4.6.** Evolução do Eh (—), ln (abs)) (●) (Figura 4.6-A), absorvância (600 nm) (▲), açúcar redutor (▼) e pH (○) (Figura 4.6-B), durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em Erlenmeyer, sem condição limitante, em salmoura do processamento de chucrute.

A análise destes resultados permite verificar que, mesmo em meio complexo, o Eh apresenta efeito sinalizador do estágio de crescimento da cultura. Neste ensaio, o desvio da linearidade observada na curva ln (abs) registra o momento de desaceleração do crescimento celular. Isso pode ser observado uma vez que há alteração da velocidade específica de crescimento máxima (Figura 4.6-A). Neste momento, o declínio de Eh sinaliza claramente a limitação do crescimento, que não é devida a carência de algum sal ou de açúcar. Contudo,

este declínio pode ter sido causado pela limitação em oxigênio e/ou pelo potencial característico do substrato utilizado. Considerando que o meio não era limitado em sais, e também não estava limitado em substrato, pois a análise neste momento indicava uma concentração de 15,1 g/L de açúcar redutor, foi levantada a hipótese do Eh estar sinalizando o início do consumo de um outro substrato presente no meio, uma vez que tal já foi levantado quando houve crescimento de *R. eutropha* DSM 545 e *R. eutropha* SAC+ em açúcar invertido e sacarose (Figuras 4.4-A e 4.5-A).

Embora análises de lactato não tenham sido realizadas, o aumento do pH observado é um indicativo de que este estaria sendo consumido. O mesmo comportamento de pH foi observado por OLIVEIRA *et al.* (1999) em cultura utilizando, como fonte de carbono, uma mistura de lactato e açúcar invertido. Ainda observa-se que o Eh parece retomar um novo perfil de crescimento celular que pode estar caracterizando o consumo de outra fonte de carbono.

Novamente, observa-se que o monitoramento do potencial de óxido-redução em culturas bacterianas, ainda que sendo realizadas em meio complexo, permite acompanhar a condição de crescimento celular.

### **4.3. Avaliação do comportamento do Eh em culturas em fermentador**

Com intuito de verificar o comportamento do potencial redox em condições controladas de pH, temperatura e aeração, culturas de *R. eutropha* DSM 545, foram realizadas em fermentador (5L).

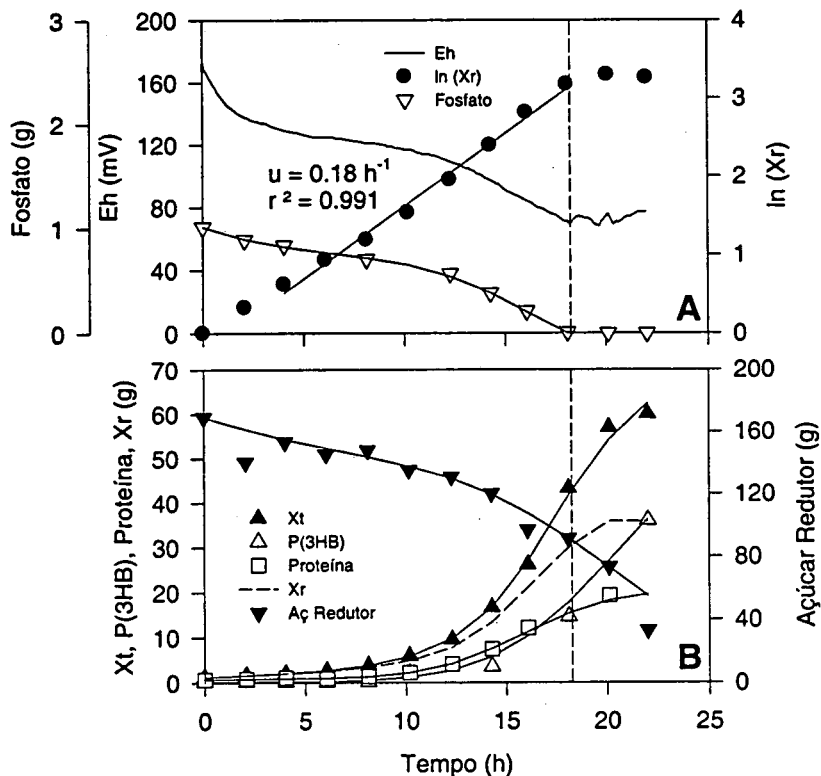
#### **4.3.1. Evolução do Eh ao longo da cultura, em batelada alimentada, de *R. eutropha* DSM 545, utilizando açúcar invertido como substrato**

Durante a cultura, o pH foi mantido a 7,0 e a agitação e a aeração aumentados no decorrer do crescimento celular. O substrato foi o açúcar invertido e a limitação de crescimento foi gerada pela diminuição da concentração de fosfato. A descrição do preparo dos meios de cultura e condições dos ensaios estão no capítulo referente a Materiais e Métodos.

As alimentações de açúcar invertido, na forma de pulso, foram realizadas a 14,9 h e 18,5 h a fim de atingir uma concentração de açúcar redutor final de 30 g/L..

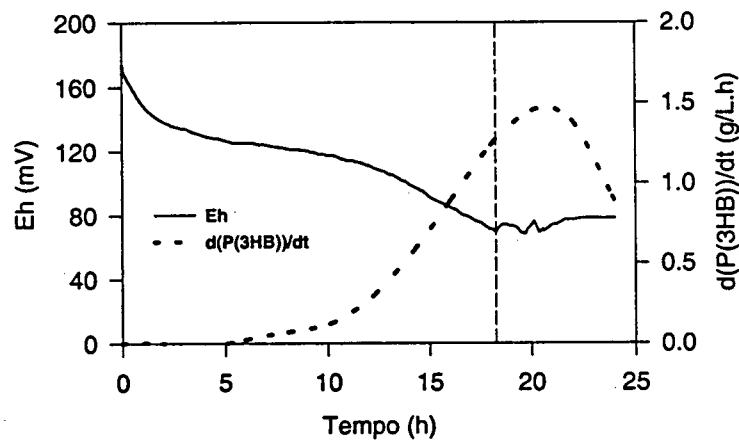
A Figura 4.7 apresenta a evolução dos parâmetros cinéticos:  $\ln(X_r)$ , massa de fosfato, potencial de óxido-redução (Figura 4.7-A), biomassa total ( $X_t$ ), biomassa residual ( $X_r$ ), massa de proteína, massa de biopolímero P(3HB) e massa de açúcar redutor (Figura 4.7-B).

A evolução de  $\ln(X_r)$  (Figura 4.7 - A) mostra, uma fase exponencial que atinge  $\mu_{\max}$  após 4 h de cultura. O valor de  $\mu_{\max}$ , obtido pelo ajuste linear do logaritmo natural da biomassa residual, foi de  $0,18 \text{ h}^{-1}$ . A fase estacionária inicia após a exaustão de fosfato no meio de cultura, que está sinalizado pelo valor mínimo de Eh (69 mV a 18,3 h), conforme indicado pela linha tracejada paralela às ordenadas.



**Figura 4.7.** Evolução do Eh (—),  $\ln(X_r)$  (●), massa de fosfato (▽) (Figura 4.7-A),  $X_t$  (▲), massa de P(3HB) (△),  $X_r$  (---), massa proteica (□), massa de açúcar redutor (▼) (Figura 4.7-B), durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com alimentação de açúcar invertido.

A Figura 4.9 apresenta o Eh (mV) e a produtividade instantânea de P(3HB) (g/L.h) em função do tempo. Novamente é possível observar uma alteração do potencial redox próximo à produtividade instantânea máxima que, neste ensaio, foi de 1,45 g/L.h, confirmando resultados anteriormente obtidos em frascos Erlenmeyer (item 4.2.1).



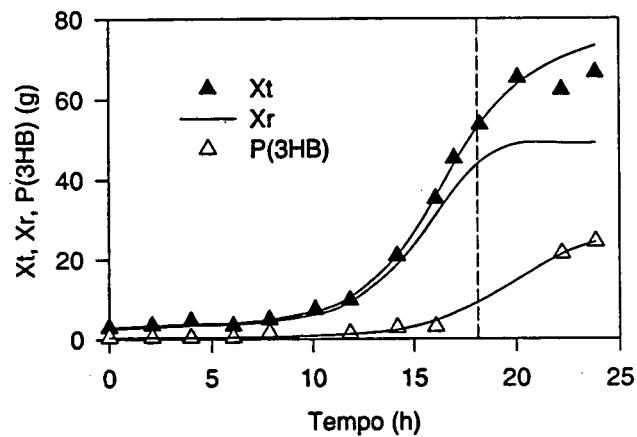
**Figura 4.8.** Evolução do Eh (—), produtividade instantânea ( $dP(3HB)/dt$ ) (- -) durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com alimentação de açúcar invertido.

#### 4.3.2. Evolução do Eh ao longo da cultura, em batelada alimentada, de *R. eutropha* DSM 545, utilizando glicose como substrato.

A cultura foi realizada em fermentador (5L), com pH mantido a 7,0; agitação e aeração aumentados, no decorrer do crescimento celular, para manter o nível de oxigênio dissolvido elevado. O substrato utilizado foi a glicose e a limitação de crescimento foi gerada pela diminuição da concentração de fosfato. A descrição do preparo dos meios de cultura e condições dos ensaios estão no capítulo referente a Materiais e Métodos. A Tabela 4.2 apresenta o momento em que a alimentação com glicose, na forma de pulso, foi realizada para esta cultura.

A alimentação de glicose, na forma de pulso, foi realizada durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, a 17h de cultivo, a fim de atingir uma concentração final de 30 g/L.

A Figura 4.10 apresenta a cinética das evoluções de biomassa total, massa de P(3HB) e biomassa residual ( $X_r$ ). Observa-se que a partir do instante da limitação houve uma estabilização da biomassa residual e aumento da biomassa total. Isso vem de encontro com o esperado uma vez que estando em condição limitante de fosfato o crescimento celular é limitado e o aumento observado para a biomassa total representa a inclusão de biopolímero na massa celular.

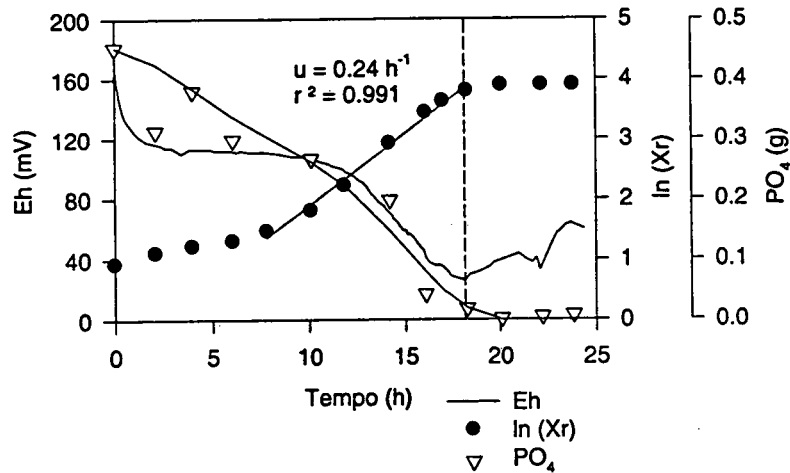


**Figura 4.9.** Evolução de  $X_t$  (▲), massa de P(3HB) (△),  $X_r$  (—), durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com alimentação de glicose.

A Figura 4.11 apresenta a evolução dos parâmetros cinéticos: potencial redox,  $\ln(X_r)$  e massa de fosfato.

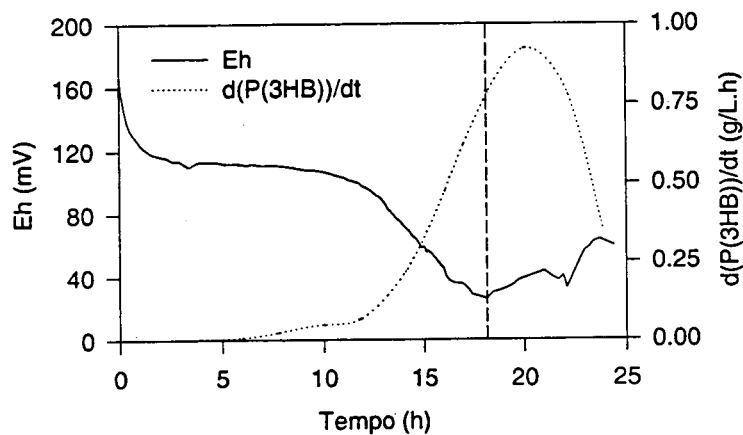
A evolução de  $\ln(X_r)$  (Figura 4.11-A) mostra, uma fase exponencial que atinge  $\mu_{max}$ , após 8 horas de cultura. O  $\mu_{max}$ , obtido pelo ajuste linear do logaritmo natural da biomassa residual ( $X_r$ ), foi de  $0,24 \text{ h}^{-1}$ . A fase estacionária inicia após a exaustão de fosfato no meio de cultura, que está sinalizado pelo valor mínimo de Eh (26 mV à 18,15 h), indicado pela linha tracejada paralela às ordenadas.





**Figura 4.10.** Evolução do Eh (—),  $\ln(Xt)$  (●), massa de fosfato ( $\nabla$ ) durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com glicose como fonte de carbono.

Na Figura 4.12 observa-se os perfis do potencial redox (mV) e da produtividade instantânea de P(3HB) (g/Lh) em função do tempo. A produtividade instantânea máxima, neste ensaio, foi de 3,2 g/L.h, superior ao ensaio em açúcar redutor (item 3.2.1). Mais uma vez observa-se que o potencial redox, no instante que atinge um valor mínimo, está próximo à máxima produtividade instantânea.



**Figura 4.11.** Evolução do Eh (—), produtividade instantânea de  $d(P(3HB))/dt$  (---) durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com alimentação de glicose.

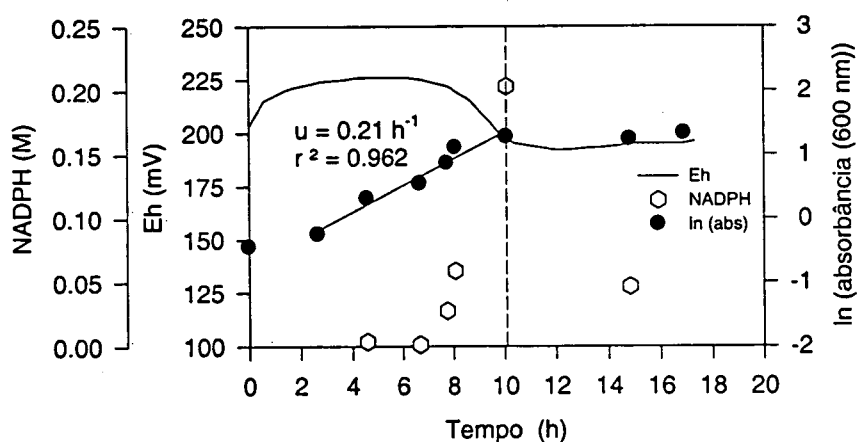
#### 4.4. Evolução da condição óxido-redutora intracelular a partir da avaliação da coenzima NADPH em cultivos de *R. eutropha* DSM 545, sob limitação de fosfato.

##### 4.4.1. Ensaio realizado em Erlenmeyer

Os valores de Eh registrados com o uso da sonda redox, mostram a condição óxido-redutora extracelular. A fim de verificar a correlação do comportamento de Eh no meio com a condição óxido-redutora intracelular, fez-se o monitoramento da coenzima NADPH. Cabe salientar que o NADPH é cofator da enzima acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente.

A Figura 4.13 apresenta a evolução dos parâmetros cinéticos:  $\ln(\text{abs})$ , potencial redox (Eh) e concentração de NADPH em cultura realizada em Erlenmeyer de 1000 mL aletado e agitado, com glicose como fonte de carbono e sob limitação por fosfato. Observa-se que a máxima concentração da coenzima ocorre no momento em que inicia-se a fase estacionária do Eh, em um valor mínimo. A concentração de NADPH aumenta até início da fase dedesaceleração e diminui após esse instante.

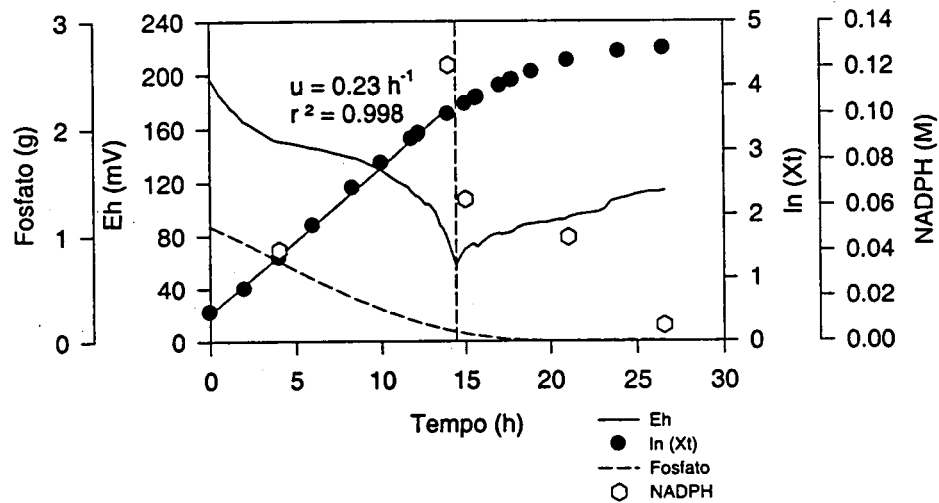
A diminuição da concentração de NADPH durante a fase de produção do polímero está de acordo com a sua oxidação nesta fase.



**Figura 4.12.** Evolução do Eh (—),  $\ln(\text{abs})$  (●) e NADPH (○) durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em Erlenmeyer, sob carência de fósforo, com glicose como fonte de carbono.

#### 4.4.2. Ensaio realizado em Fermentador

A Figura 4.14 apresenta a evolução dos parâmetros cinéticos:  $\ln(X_t)$ , potencial de óxido-redução, massa de fosfato e concentração de NADPH em cultura realizada em fermentador (5L), com açúcar invertido como fonte de carbono e agente limitante o fosfato. Nota-se que a maior concentração de NADPH ocorre quando o Eh sinaliza um valor mínimo, mesmo instante em que há desvio da linearidade na curva de  $\ln(X_t)$ .



**Figura 4.13.** Evolução do Eh (—),  $\ln(X_t)$  (●), massa de fosfato (---) e concentração de NADPH (○) durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com alimentação de açúcar invertido.

Dessa forma, é possível verificar que a concentração de coenzima NADPH é máxima na fase de desaceleração que, em cultivos de *R. eutropha*, corresponde à fase inicial de produção de PHAs. Além disso, verifica-se que o Eh extracelular sinaliza também as condições óxido-redutoras intracelulares, como avaliado pela variação concomitante de Eh à variação da concentração de NADPH. A fim de tentar manter a concentração de NADPH num valor máximo, foi realizado um ensaio com adição de um agente redutor no início da fase estacionária, sinalizada pelo valor mínimo de Eh.

#### 4.4.3. Evolução do Eh ao longo da cultura em batelada alimentada de *R. eutropha* DSM 545, utilizando açúcar invertido como substrato e adição de ditioneitol (DTT) como agente redutor do meio.

A via biossintética de PHA por *Ralstonia eutropha* apresenta três etapas enzimáticas e, uma delas, requer a oxidação de uma molécula de NADPH, que é coenzima da acetoacetyl-CoA redutase NADPH dependente, para cada unidade monomérica adicionada ao polímero pela PHA sintase (RAMSAY, 1994 ).

A velocidade de acúmulo de PHA é fator não apenas da quantidade de substrato e da atividade específica das enzimas biossintéticas, mas também da disponibilidade de poder redutor na forma de NADPH (RAMSAY, 1994; SHI *et al.*, 1997; BRAUNEGG *et al.*, 1998).

Entre os agentes redutores utilizados em processos biológicos, sabe-se que a adição de ditioneitol (DTT), um agente redutor que age sobre a permeabilidade da membrana, gera um ambiente intracelular redutor que afeta o enovelamento das proteínas, em particular a formação de ligações dissulfeto. Além disso, em níveis superiores a 20 mM, DTT tem sido letal para *E. coli* (MISSIAKAS *et al.*, 1993).

Sob condições altamente aeróbias, a adição de um agente redutor, como por exemplo, o DTT, afeta o potencial redox mas não o nível de oxigênio dissolvido no meio (GILL *et al.*, 1998).

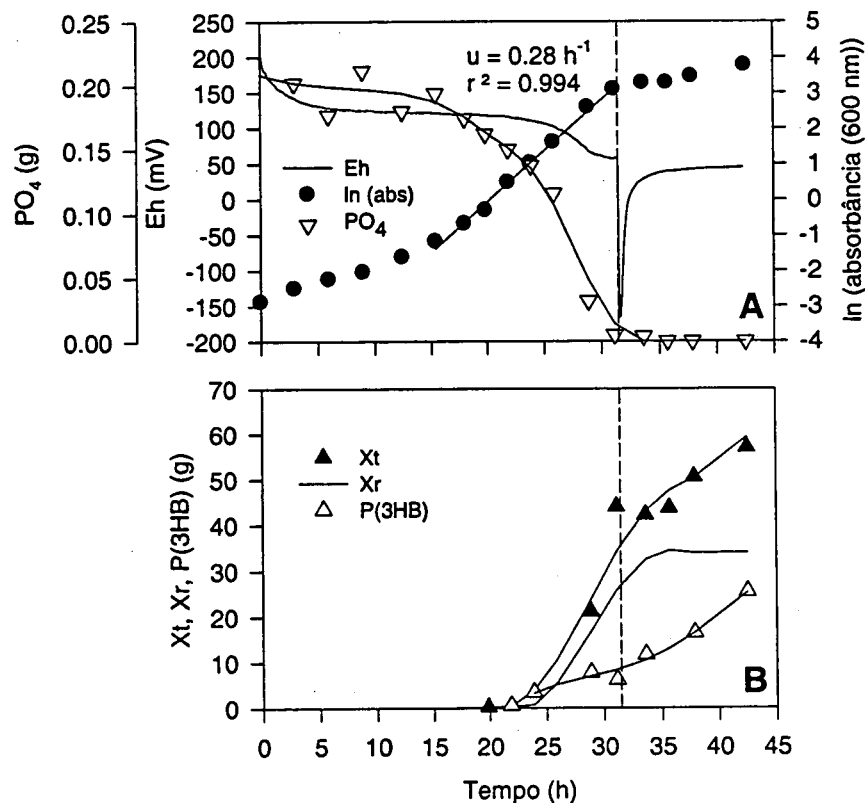
Assim, no presente ensaio, manteve-se um ambiente aerado e fez-se uso do DTT, na concentração de 0,5 g/L, para verificar a influência de um agente redutor, na condição óxido-redutora intracelular através da determinação da coenzima NADPH, e extracelular através da evolução de Eh, e o reflexo destas condições na produção do biopolímero P(3HB).

A cultura foi realizada em fermentador (5L) com pH mantido a 7,0; agitação e aeração aumentados no decorrer do crescimento celular. O substrato utilizado foi o açúcar invertido e o agente limitante do meio foi o fosfato. A descrição do preparo dos meios de cultura e condições do ensaio estão no capítulo referente a Materiais e Métodos.

As alimentações em açúcar invertido, na forma de pulsos, foram realizadas para esta cultura, a 28,9 h e 31,0 h, a fim de atingir sempre uma concentração final de 30 g/L.

A Figura 4.15 apresenta a evolução dos parâmetros cinéticos:  $\ln$  (absorbância (600 nm)), massa de fosfato ( $\text{PO}_4$ ), potencial de óxido-redução (Figura 4.15-A), biomassa total ( $X_t$ ), biomassa residual ( $X_r$ ) e massa do biopolímero P(3HB) (Figura 4.15-B).

A evolução de  $\ln$ (absorbância) (Figura 4.15-A) mostra uma fase exponencial que apresenta  $\mu_{\max}$ , após 16 h. O  $\mu_{\max}$  obtido pelo ajuste linear do logaritmo natural da absorbância, foi de  $0,28 \text{ h}^{-1}$ .



**Figura 4.14.** Evolução do Eh (—),  $\ln$  (absorbância (600 nm)) (●), massa de fosfato ( $\text{PO}_4$ ) (▽) (Figura 4.15-A), biomassa total ( $X_t$ ) (▲), biomassa residual (—) e massa de P(3HB) (△) (Figura 4.15-B), durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com alimentação de açúcar invertido e adição de DTT.

No início da fase estacionária, quando o potencial redox sinaliza um valor mínimo, foi realizada a adição do agente redutor DTT (0,5 g/L), na forma de pulso. A adição do DTT gera imediata diminuição no valor de Eh. Contudo, observa-se que o valor de Eh apresenta uma tendência a retomar uma condição mais oxidante (aumento do valor de Eh) e estabilizar-se (Figura 4.15-A).

A Figura 4.16 apresenta a evolução da absorbância (600 nm) do meio, da produtividade média e da concentração da coenzima NADPH.

**Figura 4.15.** Evolução da absorbância (600 nm) (●), da concentração de NADPH (◇) e da produtividade média (○), durante a cultura de *R. eutropha* DSM545, em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com alimentação de açúcar invertido e adição de DTT.

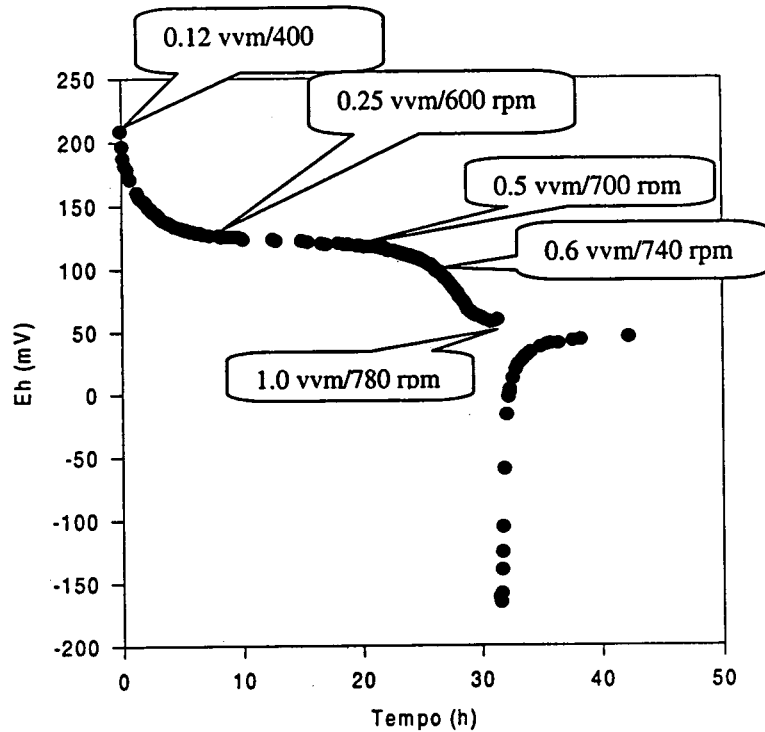
A variação da condição óxido-redutora do meio, e não a limitação em fosfato, afetou o crescimento celular, que pode ser observado pela manutenção da absorbância (600 nm) do meio após a adição do DTT (Figura 4.16). Em seguida é observado um incremento na densidade ótica que é resultado do acúmulo de P(3HB). Isso pode ser evidenciado na Figura 4.15-B onde é possível observar que a massa residual permanece constante enquanto que a biomassa total, que compreende o somatório de todo o conteúdo celular, aumenta.

Observa-se que, após a adição de DTT, a 31,5 h (marcado pela variação de Eh na Figura 4.15-A), a concentração de NADPH diminui. (Figura 4.16).

Assim, fica constatado que o DTT afeta o crescimento celular mas não a produção de P(3HB).

A Figura 4.17 apresenta o perfil do comportamento de Eh em função do tempo. Sobre este estão sinalizados os instantes em que foram realizados incremento na agitação e aeração, conforme mencionado em Materiais e Métodos, item 3.5.3. Observa-se que a alteração nas condições de aeração e agitação no meio, que influenciam diretamente a concentração de oxigênio dissolvido, não ocasionam qualquer perturbação no perfil de Eh, apesar de ser conhecido que a concentração de oxigênio dissolvido influencia o Eh (JACOB, 1974; GILL *et al.*, 1998). Isto pode ser considerado um ponto positivo, em relação à sonda de oxigênio utilizada em processos industriais é sensível à variação da concentração de oxigênio

dissolvido no meio, o que impossibilita a sinalização das etapas de crescimento celular quando ajustes na concentração de oxigênio são necessários. Assim, a utilização da sonda redox para sinalização das etapas de crescimento, bem como do momento de exaustão do nutriente parece ser uma alternativa interessante, uma vez que, além de apresentar melhor definição para os parâmetros cinéticos. Cabe lembrar que o custo de aquisição da sonda redox é menor que aquele para a sonda de oxigênio.



**Figura 4.16.** Evolução do Eh em função do tempo, sinalizando os instantes de incremento da aeração e agitação, em cultura de *R. eutropha* DSM 545, em fermentador (5 L), sob carência de fosfato, com alimentação de açúcar invertido e adição de DTT.

# CAPÍTULO 5.

## Conclusões

O objetivo deste trabalho foi avaliar a evolução do potencial óxido-redutor (Eh) durante a cultura de *R. eutropha* na produção de PHA.

Os ensaios realizados em frascos Erlenmeyer (1 L), bem como, em fermentador (5 L) mostraram haver uma correlação entre a curva de crescimento celular e o perfil do potencial redox, durante as culturas, e pode ser usada para o controle de processo de produção de PHAs.

Os ensaios realizados em fermentador (5 L) mostram claramente que a sonda redox pode ser utilizada para sinalizar o instante da exaustão do agente limitante fosfato do meio. Isso significa que tal medida pode ser utilizada como instrumento para definição do início da fase de produção de PHAs.

A análise da condição óxido-redutora intracelular, a partir da análise da concentração de NADPH, permite verificar que, quando o potencial de óxido-redução atinge seu valor mínimo, a concentração de NADPH é máxima.

A adição do agente redutor ditioneitol (DTT), na forma de pulso, na concentração de 0,5 g/L, no instante em que o Eh atinge seu valor mínimo, é eficiente em gerar um ambiente redutor. A adição na forma de pulso altera muito bruscamente a condição óxido-redutora do meio, ocasionando retardamento do crescimento. A adição do agente redutor parece ter influenciado a condição óxido-redutora intracelular pois há um rápido incremento na concentração de NADPH após a adição do DTT.



# CAPÍTULO 6.

## Sugestões

Com base nos resultados apresentados é possível sugerir algumas propostas de estudo como:

- a. Controlar as condições de agitação e aeração, através de medidor de oxigênio dissolvido visando determinar o momento de limitação do crescimento e compará-la ao monitoramento do potencial redox.
- b. Estudar a influência do DTT sendo adicionado a uma vazão constante no meio, a fim de manter um determinado nível de potencial óxido-redutor.
- c. Testar diferentes agentes redutores a fim de verificar a condição óxido-redutora da coenzima NADPH e sua influência na produtividade de PHAs.
- d. Estudar a possibilidade de produção do copolímero P(3HB-co-3HV) utilizando a sonda redox como sinalizador do momento da adição de propionato.

# CAPÍTULO 7.

## Referências Bibliográficas

- ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Reviews*, v. 54, p. 450-472, 1990.
- ARAGÃO, G.M.F.; LINDLEY, N.D.; URIBELARREA, J.L.; PAREILLEUX, A. Maintaining controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *A. eutrophus*. *Biotechnology Letters*, v. 18, p. 937-942, 1996.
- BALAKIREVA, L.M.; KANTERE, V. M.; RABOTNOVA, I.L. The redox potential in microbiological media. *Biotechnology & Bioengineering Symposium*, n.4, p.769-780, 1974.
- BESPALOV, V. A.; ZHULIN, I. B.; TAYLOR, B.L. Behavior responses of *Escherichia coli* to changes in redox potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.93, p.10084-10089, 1996.
- BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economies. *Trends in Biotechnology*, v.5, p.246-250, 1987.
- BYROM, D. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate:poly- $\beta$ -hydroxyvalerate copolymers. *FEMS Microbiology Reviews*, v.103, p. 247-250, 1992.
- BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly-( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, n. 8, p. 1977-1982, 1988.
- BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. Plastics from and for bacteria: poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, v.41, p. 77-93, 1990.

- BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R.M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p. 29-37, 1978.
- BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K.F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v.65, p. 127-161, 1998.
- CHOI, J.; LEE, S.Y. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. **Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 335-342, 1997.
- CHOI, J.; LEE, S.Y. Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, n.5, p. 546-553, 1999.
- DAWES, E.A.; SENIOR, P.J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Advances in Microbiology and Physiology**, v.10, p.135-266, 1973.
- DU, G.C.; CHEN, J.; YU, J.; LUN, S. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*. **Biochemical Engineering Journal**, v.8, p.200-205, 2001a.
- Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. **Journal of Biotechnology**, v.88, p.59-65, 2001b.
- FOSTER, J. W.; MOAT, A.G. Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. **Microbiological Reviews**. v.44, n.1, p.83-105, 1980.
- FULLER, R.C. Microbial inclusions with special reference to PHA inclusions and intracellular boundary envelopes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.25, p.21-29, 1999.
- GILL, R.T.; CHA, H.J.; JAIN, A.; RAO, G.; BENTLEY, W.E. Generating controlled reducing environments in aerobic recombinant *Escherichia coli* fermentations: effects on cell growth, oxygen uptake, heat shock protein expression, and in vivo CAT activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v.59, n.2, p.248-259, 1998.
- GOMEZ, J.G.C.; RODRIGUES, M.F.A.; ALII, R.C.P.; TORRES, B.B.; BUENO NETTO, C.L.; OLIVEIRA, M.S.; SILVA, L.F. Evaluation of soil gram-negative

bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.45, p. 785-791, 1996.

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

GROTHER, E.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Fermentation optimization for the production of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. **Enzyme Microbial Technology**, v.25, p.132-141, 1999.

HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; CHU, L.; DAWES, E.A. The role of NAD- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 52, p. 259-264, 1988.

HIGAREDA, A.E.; POSSANI, L.D.; RAMIREZ, O.T. The use of culture redox potential and oxygen uptake rate for assessing glucose and glutamine depletion in hybridoma cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, n.5, p.555-563, 1997.

HOCK, I. E. Avaliação da substituição de extrato de levedura por milhocina no cultivo de *Zymomonas mobilis* para a produção da enzima glicose-frutose-oxirredutase. **Monografia apresentada ao Curso de Química Industrial, UNIVILLE**, 1997.

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

HU, W.F.; CHUA, H.; YU, P.H.F. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from activated sludge. **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 695-698, 1997.

JACOB, H.E. Reasons for the redox potential in microbial cultures. **Biotechnology & Bioengineering Symposium**, n.4, p.781-788, 1974.

JANSSEN, A.J.H., MEIJER, S.; BONTSEMA, J.; LETTINGA, G. Application of the redox potential for controlling a sulfide oxidizing bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.60, n.2, p.147-155, 1998.

KATOH, T.; YUGUCHI, D.; YOSHII, H.; SHI, H.; SHIMIZU, K. Dynamics and modeling on fermentative production of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) from sugars via lactate by a

mixed culture of *Lactobacillus delbrueckii* and *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Biotechnology**, v. 67, p. 113-134, 1999.

KELLEY, A.S.; SRIENC, F. Production of two phase polyhydroxyalkanoic acid granules in *Ralstonia eutropha*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 61-67, 1999.

KESSLER, B., WITHOLT, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. **Journal of Biotechnology**, v.86, p.97-104, 2001.

KIM, B.S.; LEE, S.C.; LEE, S.Y.; CHANG, Y.K., WOO, S.I. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate control using on-line glucose analyzer. **Enzyme and Microbiology Technology**, v.16, p. 556-561, 1994.

KIM, M.K.; LEE, I.Y.; PARK, Y.H. Metabolites and amino acids affecting cellular cofactor concentrations and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v.18, n.5, p.559-564, 1996.

KJAERGAARD, L.; JOERGENSEN, B.B. Redox potential as a state variable in fermentation systems. **Biotechnology & Bioengineering Symposium**, n.9, p.85-94, 1979.

KWONG, S.C.W.; RAO, G. Utility of culture redox potential for identifying metabolic state changes in amino acid fermentation. **Biotechnology Bioengineering**, v.38, p.1034-1040, 1991.

KWONG, S.C.W.; RAO, G. Effect of reducing agents in an aerobic amino acid fermentation. **Biotechnology Bioengineering**, v.40, n.7, p.851-857, 1992.

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

LEE, S.Y.; CHANG, H.N. Production of poly-hydroxyalkanoic acid. **Advances in Biochemistry and Engineering Biotechnology**, v.52, p. 27-58, 1995.

LEE, Y.I.; KIM, M.K.; PARK, Y.H.; LEE, S.Y. Regulatory effects of cellular nicotinamide nucleotides and enzyme activities on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, n. 6. p. 707-712, 1996.

- LEE, T.H.; CHANG, Y.K.; CHUNG, B.H.; PARK, Y.H. Correlation of redox potential with state variables in cultures under controlled dissolved oxygen concentration and pH. **Biotechnology Progress**, v. 14, p. 959-962, 1998.
- LEE, S.Y. Review: Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 1-14, 1996.
- LEE, S.Y., CHOI, J. Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment. **Waste Management**, v. 19, p. 133-139, 1999a.
- LU, B.; WANG, Z.R.; YANG, H. Long-acting delivery microspheres of levo-norgesterol-poly(3-hydroxybutyrate): their preparation characterization and contraceptive testes on mice. **Journal of Microencapsulation**, v. 18, n. 1, p. 55-64, 2001.
- MADISON, L.L.; HUISMAN, G.W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and Molecular biology Reviews**, v. 63, n.1, p. 21-53, 1999.
- MARANGONI, C.; FURIGO, JR., A.; ARAGÃO, G.M.F. The influence of substrate source on the growth of *Ralstonia eutropha* aiming at the production of polyhydroxyalkanoate. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.18, n.02, p.175-180, 2001.
- MILLER, G.L. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MISSIAKAS, D.; GEORGOPOULOS, C.; RAINA, S. Identification and characterization of the *Escherichia coli* gene dsB whose product is involved in the formation disulfide bonds in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 7084-7088, 1993.
- MULLER, S.; BLEY, T.; BABEL, W. Adaptive responses of *Ralstonia eutropha* to feast and famine condition analysed by flow cytometry. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 81-97, 1999.
- OEDING, V.; SCHLEGEL, H.G.  $\beta$ -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism. **Biochemistry Journal**, v. 134, p. 239-248, 1973.
- OKTYABRSKY, O.N.; SMIRNOVA, G.V. Dynamics of redox potential in bacterial cultures growing on media containing different sources of carbon, energy and nitrogen. **Acta Biotechnologica**, v. 9, p. 203-209, 1989.

- OLIVEIRA, R. **Produção de poli-3-hidroxi-butirato (P(3HB)) por *Ralstonia eutropha* em substrato de baixo custo: Estudos de diferentes estratégias de limitação de crescimento.** 1999. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- PAGE, W.J.; KNOSP, O. Hyperproduction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. **Applied Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1334-1339, 1989.
- PREEZ, J.C.; DRIESSEL, B.; PRIOR, B.A. The relation between redox potential and D-xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v.10, n.12, p.901-906, 1988.
- RAMAKRISHNA, S; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E.; LEONG, K.W. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. **Composites Science and Technology**, v. 61, p. 1189-1224, 2001.
- RAMSAY, B.A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBE, B.; BATAILLE, P; RAMSAY, J.A. Production of poly-( $\beta$ -hydroxybutyric-co- $\beta$ -hydroxyvaleric) acids. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2093-2098, 1990.
- RAMSAY, B.A. Physiological factors effecting PHA production. In: **Physiology, kinetics, production and use of biopolymers (proceedings)**, pp. 9-17, may 13-15, 1994, Schloss Seggau, Austria.
- RIONDET, D.; CACHON, R.; WACHÉ, Y.; ALCARAZ, G.; DIVIES, C. Extracellular oxidoreduction potential modifies carbon and electron flow in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v. 182, n. 3, p. 620-626, 2000.
- SCOTT, G. Green Polymers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 68, p. 1-7, 2000.
- SEO, J.K.; YOON, J.Y.; OH, J.T.; KIM, W.S. Optimum growth conditions and pH control solution for PHB biosynthesis in *A. eutrophus*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 215-220, 1998.
- SCHEMBRI, M.A.; BAYLY, R.C.; DAVIES, J.K. Phosphate concentration regulates transcription of the *Acinetobacter* polyhydroxyalkanoic acid biosynthetic genes. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 4501-4507, 1995.

- SCHLEGEL, H.G.; GOTTSCHALK, G.; VON BARTHA, R. Formation and utilization of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by Knallgas bacteria (*hydrogenomonas*). **Nature**, v.191, n.4787, p.463-465, 1961.
- SENIOR, P.J.; DAWES, E.A. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Biochemical Journal**, v.125, p. 55-66, 1971.
- SHI, H.; SHIRAISHI, M.; SHIMIZU, K. Metabolic flux analysis for biosynthesis of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) in *Alcaligenes eutrophus* from various carbon sources. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.84, n.6, p.579-587, 1997.
- SIM, S.J.; SNELL, K.D.; HOGAN, S.A.; STUBBE, J.; RHA, C.; SINSKEY, A.J. PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo. **Nature Biotechnology**, v.15, p.63-67, 1997.
- SMITH, M.V.; PIERSON, M.D. Effect of reducing agents on oxidation-reduction potential and the outgrowth of *Clostridium botulinum* Type E spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, n.5, p.978-984, 1979.
- SON, H.; PARK, G.; LEE, S. Growth-associated production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from glucose or alcoholic distillery wastewater by *Actinobacillus* sp. EL-9. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 1229-1234, 1996.
- SONNLEITNER, B.; HEINZLE, E.; BRAUNEGG, G.; LAFEERTY, R.M. Formal kinetics of poly- $\beta$ -hydroxybutyric (PHB) in *Alcaligenes eutrophus* H16 and *Mycoplana rubra* R14 with respect to the dissolved oxygen tension in ammonium limited batch cultures. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 1-10, 1979.
- STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 419-427, 1998.
- STICKLAND, L.H. The determination of small quantities of bacteria by means of the Biuret reaction. **Journal of General Microbiology**, v. 5, p. 689-703, 1951.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxialkanoates biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v.25, p.1503-1555, 2000.
- TANAKA, K.; KATAMUNE, K.; ISHIZAKI, A. Fermentative production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid from xylose by a two-stage culture method employing *Lactococcus*



- lactis* IO-1 and *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 12, p. 1217-1222, 1993.
- ZHANG, H.; OBIAS, V.; GONYER, K.; DENNIS, D. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n. 4, p. 1198-1250, 1994.
- THOMPSON, B.G.; GERSON, D.F. Electrochemical control of redox potential in batch cultures of *Escherichia coli*. **Biotechnology Bioengineering**, v.27, p.1512-1515, 1985.
- TOHYAMA, M.; SHIMIZU, K. Control of a mixed culture of *Lactobacillus delbruekii* and *Ralstonia eutropha* for the production of PHB from glucose via lactate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 45-53, 1999.
- WEINER, R.M. Biopolymer from marine prokaryotes. **Trends in Biotechnology**, v.15, p.390-394, 1997.
- WIMPENNY, J.W. The effect of  $E_h$  on regulatory processes in facultative anaerobes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 11, 623-629, 1969.
- WONG, H.H; LEE, S.Y. Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Microbiology Biotechnology**, n. 50, p. 30-33, 1998.
- YAMANE, T. Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. **Biotechnology and Bioengineering**, v.41, p.165-170, 1993.
- YU, J. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. **Journal of Biotechnology**, v.86, p.105-112, 2001.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

### Teoria do Potencial Redox (E<sub>h</sub>)

A capacidade de oxidação ou redução de uma solução é caracterizada pela atividade dos elétrons livres nela, ou seja, pelas trocas redox envolvidas, bem como a concentração de oxigênio dissolvido (DOC) e pH. Assim, a relação pode ser representada pela função genérica que segue:

$$E_h = f(\text{DOC}, \text{pH}, \text{Re}_i) \quad (1)$$

onde Re<sub>i</sub> estipula as concentrações dos vários pares redox constituintes.

O potencial eletroquímico de um meio de fermentação pode ser expresso pela seguinte equação:

$$E_h = E'_o + (2,3 \text{ RT}/4\text{F})\log P_{\text{O}_2} + 2,3 (\text{RT}/\text{F}) \log (\text{H}^+)$$

Quando o pH e DOC são mantidos constantes durante a cultura, tem-se a equação 1 reformulada na equação 2, sendo o E<sub>h0</sub> uma constante apropriada.

$$E_h = E_{h0} + g(\text{Re}_i) \quad (2)$$

As concentrações dos componentes dissolvidos que agem como pares redox no meio de cultura dependerão da maneira como as células tem sido formadas pelo consumo dos componentes do meio, incluindo o substrato, e como muitos produtos e subprodutos são produzidos. O substrato (S) e produto (P) podem ser determinados quantitativamente, mas o consumo ou formação de outros componentes dissolvidos que estão relacionados ao crescimento celular não podem ou são difíceis de serem caracterizados e quantitativamente determinados. Assim, a equação (2) foi reformulada para equação (3) pela agregação dos efeitos destes componentes no efeito da concentração celular (X), uma quantidade mensurável, em que o potencial redox (E<sub>h</sub>) é representado como uma função de X, S, e P apenas.

$$E_h = E_{h0} + g(X,S,P) \quad (3)$$

Sendo o tempo de vida de um elétron livre extremamente curto ( $10^{-11} - 10^{-15}$  seg) há uma possibilidade estatística da existência de elétrons livres no momento da transformação de sistemas doadores de elétrons para sistemas aceptores de elétrons.

A atividade do elétron equivale a

$$A_e = (1/k)^{1/n} \cdot (A_{red}/A_{ox})^{1/n} \quad (4)$$

Onde  $A_{ox}$  e  $A_{red}$  são respectivamente as atividades das formas oxidadas e reduzidas do material,  $n$  é o número de elétrons participantes na reação redox,  $k$  é a constante de balanço na reação  $ox + ne = red$ .

Como está claro na equação 4, a atividade do elétron depende da razão das atividades de  $A_{ox}$  e  $A_{red}$ , do número  $n$ , e das propriedades individuais do sistema redox, que são caracterizados pela constante de balanço  $k$ .

O potencial de oxidação é uma medida quantitativa da capacidade redox de uma solução que representa uma unidade elétrica da troca de energia livre em uma interação redox de dado sistema com o sistema padrão.

O sistema  $H^+ + e^- = \frac{1}{2} H_2$  é o sistema padrão.

O potencial de oxidação é relatado para a atividade de elétrons na solução:

$$E_h = - \theta \log A_e \quad (5)$$

onde  $\theta = 2,3 RT/F$ ,  $R$  é a constante universal dos gases,  $T$  é a temperatura e  $F$  é o número de Faraday.

É conveniente avaliar a atividade de elétrons em unidades  $p_e$  que equivale ao logaritmo negativo de Brigg da atividade do elétron.

$$p_e = - \log A_e \quad (6)$$

logo,

$$E_h = \theta p_e \quad (7)$$

A simplicidade e clareza da interdependência entre o potencial de oxidação e o valor  $p_e$  torna possível identificar a medida redox.

A relação do potencial de oxidação para  $A_{ox}/A_{red}$  e para as propriedades individuais do sistema ( $k$  e  $n$ ) é expressa pela equação de Nernst:

$$E_h = E_{h_0} + \theta/n \log (A_{ox}/ A_{red}) \quad (8)$$

onde  $E_{h_0} = - \theta/n \log (1/k)$  é um potencial padrão definido pela natureza do sistema.

É necessário enfatizar que as correlações acima (5), (7) e (8) são equivalentes e sua aplicação é subjetiva e dependente do método do pesquisador.

Juntamente com o que foi acima descrito, o valor  $rH$  é frequentemente encontrado na literatura biológica como uma característica das condições redox na solução.

$$rH = - \log pH_2 \quad (9)$$

$$rH = 2/\theta + 2pH \quad (10)$$

O valor  $rH$  foi introduzido em 1923 por Clark como uma unidade de capacidade redox, que não varia com o valor do  $pH$ .

A correlação do potencial de oxidação com o valor de  $pH$  é a seguinte:

$$E_h = E_{h_0} + \theta/n \log (A_{ox}/ A_{red}) - (m/n) \theta pH \quad (11)$$

onde  $m$  é o número de íons hidrogênio tomando parte na reação redox.

Comparando as equações (10) e (11) é fácil ver que o valor de  $rH$  é constante para o valor de  $pH$  no caso onde  $m = n = 1$ . Em todos outros casos o uso do valor  $rH$  não é correto e o valor de Clark é rejeitado.

Algumas vezes contudo, este termo é ainda usado devido a facilidade de comparação de diferentes condições redox a diferentes valores de  $pH$ , quando levando em consideração um valor de  $rH$  aproximado.

### Características dos sistemas redox

Sistemas redox em uma solução podem ser quimicamente reversíveis ou irreversíveis. Se a solução contém apenas um sistema irreversível, com suficiente concentração de formas oxidadas e reduzidas ele adquire um valor estável da atividade do elétron e, conseqüentemente, um estável potencial de oxidação. Tais soluções são tamponantes quanto ao redox. O tamponamento é expresso pelo valor da capacidade tampão  $\pi$ :

$$\pi = (\theta/n) (1/C) C_{red} (C - C_{red}) \quad (12)$$

onde C é a soma das concentrações de agentes redutores e oxidantes. Tamponamento é uma importante característica da solução, conectada com a validade termodinâmica do potencial de oxidação.

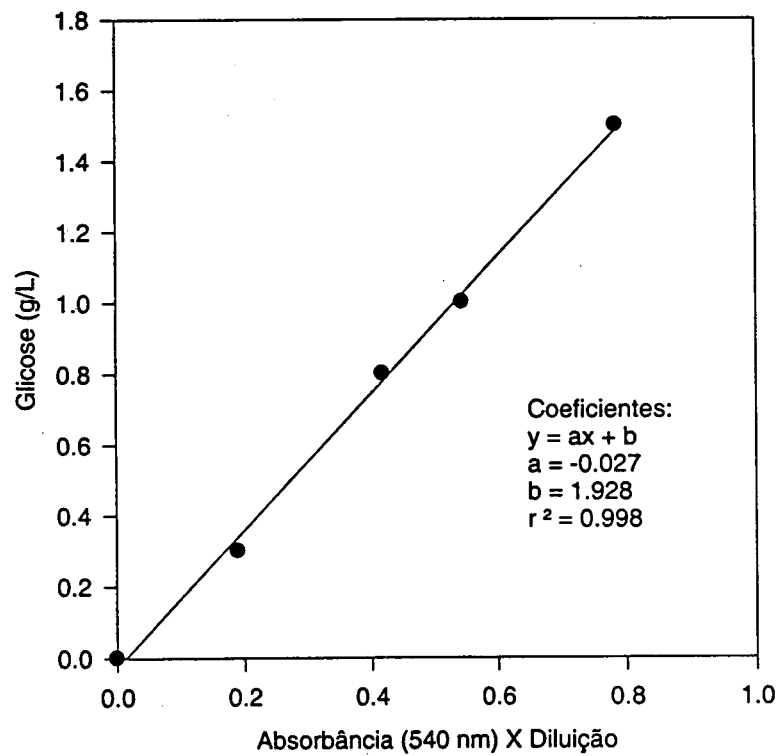
Soluções contendo sistemas quimicamente irreversíveis, e sistemas redox com pouca concentração de oxidantes e redutores, não são tamponados ou por outro lado caracterizados pelo pequeno valor de  $\pi$ . A atividade do elétron em tal solução não é estável. Exemplos de tais culturas são culturas microbianas. Processos complexos e variados estão simultaneamente tomando lugar nestas soluções, nas quais ambos sistemas reversíveis e irreversíveis ocorrem.

É difícil isolar um sistema redox caracterizando as condições redox no meio. Reações redox tomam lugar no meio, em células e na fronteira da célula com o meio. Comparativamente, baixas concentrações de oxidantes e redutores e uma considerável alteração da razão  $A_{ox}/A_{red}$  para a forma reduzida é típica para muitos meios e gera uma pequena capacidade tamponante do meio microbiológico (BALAKIREVA, 1974).

## ANEXO 2

**Curva de calibração de determinação da concentração de açúcares redutores pelo método do ácido 3-5-dinitrosalicílico (DNS).**

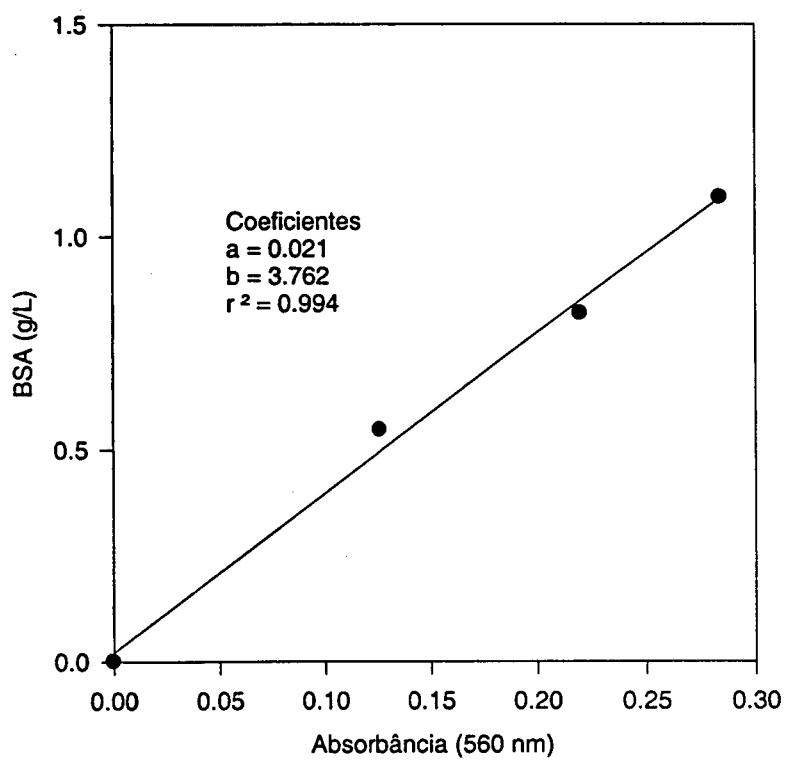
**Curva de calibração: padrão glicose**



## ANEXO 3

Curva de calibração de determinação da concentração de proteínas pelo método de Biureto.

Curva de calibração: padrão albumina bovina (BSA)





## ANEXO 4

Curva de calibração do poli-3-hidroxi-butirato (P(3HB))

Curva de calibração: padrão poli-3-hidroxi-butirato  
padrão interno ácido benzóico

