

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

**Produção de polihidroxibutirato por  
*Cupriavidus necator* glpFK a partir de glicerol**  
Desenvolvimento experimental e modelagem matemática

*Felipe Andre Pavan*

2019

Felipe Andre Pavan

**Produção de polihidroxibutirato por  
*Cupriavidus necator* glpFK a partir de glicerol**  
Desenvolvimento experimental e modelagem matemática

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Engenharia de  
Alimentos como requisito para a  
obtenção do título de doutor.

*Orientadora*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gláucia M. F. de Ara-  
gão

*Co-orientadores*

Prof. Dr. Willibaldo Schmidell  
Netto  
Prof. Dr. Natan Padoin

Florianópolis  
2019

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

Pavan, Felipe Andre  
Produção de polihidroxitirato por *Cupriavidus*  
*necator* glpFK a partir de glicerol: :  
Desenvolvimento experimental e modelagem matemática  
/ Felipe Andre Pavan ; orientadora, Gláucia Maria  
Falcão de Aragão, coorientador, Natan Padoin,  
coorientador, Willibaldo Schmidell, 2019.  
209 p.

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

Inclui referências.

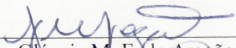
1. Engenharia de Alimentos. 2. biopolímero. 3.  
polihidroxitirato. 4. cinética microbiana. 5.  
modelagem matemática. I. Aragão, Gláucia Maria  
Falcão de . II. Padoin, Natan. III. Schmidell,  
Willibaldo IV. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de  
Alimentos. V. Título.

**“PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR  
*Cupriavidus necator* glpFK A PARTIR DE GLICEROL:  
DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL E MODELAGEM  
MATEMÁTICA”**

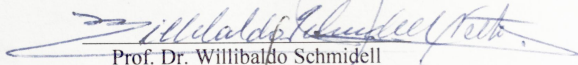
Por

**Felipe Andre Pavan**

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

  
\_\_\_\_\_  
Prof.a. Dra. Gláucia M. F. de Aragão

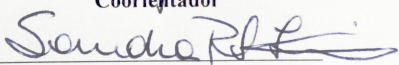
**Orientador**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Willibaldo Schmidell

**Coorientador**

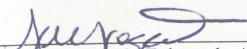
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Natan Padoin

**Coorientador**

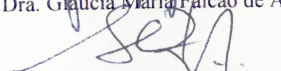
  
\_\_\_\_\_  
Prof.a. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira

**Coordenadora**

**Banca Examinadora:**

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

  
\_\_\_\_\_  
Prof.a. Dra. Cintia Soares

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr.

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

**Florianópolis, 02 de abril de 2019.**



## Agradecimentos

Muitas pessoas foram essenciais no desenvolvimento deste estudo, seja pela ajuda técnica ou afetiva. Assim, gostaria de agradecer profundamente aos meus pais e irmã, Cláudio, Rosângela e Cláudia, por todo amor e motivação dados ao longo de todos estes anos; à Roberta, pelo incentivo transmitido, pelas noites e finais de semanas no laboratório e pelo amor demonstrado nas mais diferentes formas.

Agradeço à Gláucia, pelo apoio nas minhas decisões e pela orientação durante todos meus estudos de pós-graduação; encontre aqui a expressão de meu reconhecimento de todo seu conhecimento técnico e qualidades humanas. Da mesma maneira, agradeço ao Willibaldo pelos valiosos conselhos e conversas sobre o rumo deste trabalho; Natan, pela disponibilidade em ajudar e grande suporte no desenvolvimento matemático.

Meus sinceros agradecimentos aos meus amigos e colaboradores Sidnei Bordignon e Raul Delsasso, pelas discussões e conselhos que resultaram neste estudo. Agradeço aos membros da banca avaliadora do exame de qualificação: Agenor Furigo, Jaciane Ienczak e Patricia Poletto, pelas sugestões e discussão visando tornar este trabalho melhor; ao Programa de pós-graduação em engenharia de alimentos e à UFSC por propiciar o ambiente de aprendizado e de desenvolvimento experimental. Por toda ajuda com as análises em cromatografia gasosa, agradeço ao Lindomar Lerin. Por ter feito os cultivos em microplacas possíveis, agradeço à Karina Sesca.



## Resumo

Polihidroxibutirato (PHB) é uma classe de biopolímero sintetizado por diversos microrganismos como material de reserva energética. Suas propriedades termo-mecânicas e capacidade de ser produzido a partir de fontes renováveis, o torna uma alternativa notável aos plásticos de origem petroquímica. Dessa maneira, o presente trabalho buscou a síntese de PHB pela cepa *Cupriavidus necator* glpFK utilizando glicerol como fonte de carbono. Foram realizados cultivos em microplaca e agitador orbital com o objetivo de avaliar a influência das concentrações iniciais de glicerol e nitrogênio na velocidade específica de crescimento na fase exponencial ( $\mu_{X_{r_{max}}}$ ). A partir dos resultados obtidos determinou-se as condições iniciais para os cultivos em biorreator agitado e aerado. Diferentes condições de operação como temperatura do meio e modo de alimentação de substrato, foram avaliadas baseado nos parâmetros cinéticos  $\mu_{X_{r_{max}}}$  e produtividade em PHB. O cultivo de maior produtividade,  $0,75 \text{ g}_p \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , foi conduzido à temperatura de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  e alimentado ao longo da fase de produção com as fontes de nitrogênio e carbono. Neste ensaio, a concentração de biomassa total atingida foi de  $54,7 \text{ g L}^{-1}$  sendo 65 % PHB acumulado. Posteriormente, um modelo matemático que descreve a evolução das concentrações de biomassa residual, PHB e oxigênio dissolvido foi proposto. No equacionamento foi levado em consideração a influência da concentração fontes de nitrogênio e carbono sobre o crescimento celular e produção de biopolímero. Esta foi a primeira vez que a concentração de oxigênio dissolvido foi prevista na produção de PHB. Além do consumo de oxigênio, sua transferência da fase líquida à gasosa foi matematicamente avaliada em termos do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ). Para avaliar o comportamento do modelo em função das variações das grandezas de entrada, foi realizada a análise de sensibilidade global pelo método LHS-PRCC. Nesta análise foram avaliados 5.000 casos dentro de um intervalo de variação definido para cada grandeza. Como resultado, os parâmetros relativos ao consumo de oxigênio e fonte de carbono para manutenção das atividades celulares foram desconsiderados do modelo



devida à baixa influência causada. O modelo foi, então, treinado por meio da otimização multiobjetivo por busca padronizada a partir dos dados experimentais de apenas um dos cultivos realizados. Assim, avaliou-se seu ajuste aos dados experimentais dos demais ensaios à mesma temperatura, verificando-se uma notável qualidade. Uma nova otimização foi realizada, em que o objetivo foi maximizar a produtividade em PHB por meio da alteração das condições operacionais. Por meio deste experimento computacional, foi apresentada a possibilidade de atingir uma concentração final de biomassa de  $108,7 \text{ g L}^{-1}$  em 60 h de cultivo, com produtividade de  $1,36 \text{ g}_p \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Desse modo, os desenvolvimentos experimentais e matemáticos realizados neste estudo foram complementares.

Palavras-chave: biopolímero; polihidroxibutirato; cinética microbiana; modelagem matemática; modelo cinético.

## Abstract

Polyhydroxybutyrate (PHB) is a class of biopolymer synthesized by several microorganisms as energy reserve material. Its thermo-mechanical properties and ability to be produced from renewable sources make it a notable alternative to petrochemical plastics. Thus, the present work sought the biosynthesis of PHB by the bacteria strain *Cupriavidus necator* glpFK using glycerol as carbon source. Cultures were performed in microplates and incubator shakers in order to evaluate the influence of the initial concentrations of glycerol and nitrogen on the specific growth rate in during the exponential phase ( $\mu_{X_{r_{max}}}$ ). From these, the initial conditions for the agitated and aerated bioreactor cultures were determined. Different operating conditions such as, temperature and substrate-feed mode were evaluated, in which the kinetic parameters  $\mu_{X_{r_{max}}}$  and productivity in PHB were used as the evaluation criteria. The cultivation with highest productivity,  $0.75 \text{ g}_p \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  was conducted at  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  and fed throughout the production phase with the sources of nitrogen and carbon. In this assay, the final biomass concentration was  $54.7 \text{ g L}^{-1}$  being 65% accumulated PHB. Thereafter, a mathematical model describing the evolution of residual biomass, PHB and dissolved oxygen concentrations was proposed. In this system of equations, the influence of nitrogen and carbon sources on cell growth and biopolymer production was taken into consideration. This was the first time that the concentration of dissolved oxygen was predicted in the production of PHB. In addition to oxygen consumption, its transfer from liquid to gaseous phase was mathematically evaluated in terms of the volumetric oxygen transfer coefficient ( $k_L a$ ). In order to evaluate the model's behavior as function of variations in the inputs, the global sensitivity analysis was performed by the LHS-PRCC method. In this analysis, 5,000 cases were evaluated within a defined range for each input. As result, the parameters related to oxygen and carbon source consumption to maintain cellular activities were taken out of the model due to the low influence caused. The model was then trained through multiobjective optimization by Pattern Search using experimental data of only one of the cultures performed. Then, it was evaluated its fit to the experimental data of the others cultures at the same temperature, in which outstanding quality was obtained. A new optimization was performed, in which the objective was to maximize the

productivity in PHB by the selection of optimal operational conditions. By this computational experiment, the possibility of reaching a final concentration of biomass of  $108.7 \text{ g L}^{-1}$  in 60 h of cultivation with yield of  $1.36 \text{ g}_p \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , was presented. Thus, the experimental and mathematical developments performed in this study were complementary.

Keywords: biopolymer; polyhydroxybutyrate; microbial kinetics; mathematical modeling; kinetic model.

## Lista de símbolos

$c$	Constante de proporcionalidade (-)
$C$	Concentração de oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ )
$C_s$	Concentração de oxigênio dissolvido na saturação ( $\text{mg L}^{-1}$ )
$D_i$	Diâmetro do agitador (m)
$DO$	Densidade ótica (absorbância*diluição) (-)
$F$	Conjunto de funções objetivo
$f_p$	Razão entre PHB e biomassa residual (-)
$f_u$	Função objetivo, sendo $m$ a quantidade de objetivos
$g$	Aceleração devido à gravidade ( $\text{m s}^{-2}$ )
$k_p$	Constante de atraso da sonda de oxigênio dissolvido ( $\text{h}^{-1}$ )
$K_{p,n}$	Constante de afinidade entre nitrogênio e PHB ( $\text{g L}^{-1}$ )
$K_{p,s}$	Constante de afinidade entre glicerol e PHB ( $\text{g L}^{-1}$ )
$k_L a$	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $\text{s}^{-1}$ )
$K_{x,n}$	Constante de afinidade entre nitrogênio e biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ )
$K_{x,s}$	Constante de afinidade entre glicerol e biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ )
$m_o$	Consumo de oxigênio para manutenção celular ( $\text{mg g}^{-1} \text{L}^{-1}$ )
$m_s$	Consumo de substrato para manutenção celular ( $\text{mg g}^{-1} \text{L}^{-1}$ )
$n$	Número de execuções do modelo (amostra)
$N$	Concentração de nitrogênio ( $\text{g L}^{-1}$ )
$N_0$	Concentração inicial de nitrogênio ( $\text{g L}^{-1}$ )
$N_A$	Número de aeração (-)
$N_{Fr}$	Número de Froude (-)
$N_p$	Número de potência (-)
$N_{Re}$	Número de Reynolds (-)
$N_{rot}$	Velocidade de rotação do agitador ( $\text{s}^{-1}$ )
$n_{O_2}$	Velocidade de transferência de oxigênio ( $\text{mg}_{O_2} \text{L}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
$P$	Concentração de PHB ( $\text{g L}^{-1}$ )
$P_g$	Potência dissipada sob condições de aeração ( $W$ )
$Prod$	Produtividade em PHB ( $\text{g}_P \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
$Q$	Vazão de aeração ( $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$ )
$Q_{O_2} X_r$	Velocidade de consumo de oxigênio ( $\text{mg}_{O_2} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
$Q_{O_2}$	Velocidade específica de consumo de oxigênio ( $\text{mg}_{O_2} \text{g}_X^{-1} \text{h}^{-1}$ )
$r_{xy}$	Coefficiente de Pearson
$S$	Concentração de glicerol ( $\text{g L}^{-1}$ )
$S_0$	Concentração inicial de glicerol ( $\text{g L}^{-1}$ )

T	Temperatura (°C)
$T_m$	Temperatura de fusão (°C)
$T_{cc}$	Temp. de cristalização sob resfriamento (°C)
$T_g$	Temp. de transição vítrea (°C)
$T_{hc}$	Temp. de cristalização sob aquecimento (°C)
$t_{0,05}$	Tempo para atingir 95% de mistura (s)
$V_l$	Volume de líquido ( $m^3$ )
V	Volume de meio (L)
$V_{ad}$	Volume adicionado entre o tempo de coleta (i - 1) e i (L)
$v_s$	Velocidade superficial do gás ( $m\ s^{-1}$ )
$W_i$	Largura das pás dos agitadores (m)
$X_c$	Grau de cristalinidade (%)
$x_j$	Grandeza de entrada do modelo (j=1,2,...,k)
$X_r$	Concentração de biomassa residual ( $g\ L^{-1}$ )
$X_t$	Concentração de biomassa total ( $g\ L^{-1}$ )
y	Grandeza de saída do modelo
$y^*$	Valor experimental
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de glicerol em PHB ( $g_p\ g_s^{-1}$ )
$Y_{X/N}$	Fator de conversão de nitrogênio em biomassa ( $g_{xr}\ g_N^{-1}$ )
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de glicerol em biomassa ( $g_{xr}\ g_s^{-1}$ )
$Y_{X/O}$	Fator de conversão de oxigênio em biomassa ( $g_{xr}\ g_{O_2}^{-1}$ )
$Y_{P/O}$	Fator de conversão de oxigênio em PHB ( $g_p\ g_{O_2}^{-1}$ )
w	Variáveis de decisão (vetor k-dimensional)
$\Delta H_m$	Entalpia de fusão ( $J\ g^{-1}$ )
$\Delta H_c$	Entalpia de cristalização ( $J\ g^{-1}$ )
$\Delta H_m^0$	Entalpia de fusão do PHB 100% cristalino ( $J\ g^{-1}$ )
$\theta$	Expoente do termo $\left(1 - \frac{f_p}{f_{pmax}}\right)$
$\theta'_i$	Concentração corrigida no tempo de coleta i ( $g\ L^{-1}$ )
$\theta_i$	Concentração no tempo de coleta i ( $g\ L^{-1}$ )
$\mu_P$	Velocidade específica de produção de PHB ( $g_p\ g_{X_r}^{-1}\ h^{-1}$ )
$\mu_{Pmax}$	Velocidade esp. de produção de PHB ( $g_p\ g_{X_r}^{-1}\ h^{-1}$ )
$\mu_{X_r}$	Velocidade específica de crescimento celular ( $h^{-1}$ )
$\mu_{X_rmax}$	Velocidade específica de crescimento celular na fase exponencial ( $h^{-1}$ )
$\rho$	Massa específica do meio ( $kg\ m^{-3}$ )
$\sigma$	Desvio padrão dos valores experimentais
$\Omega$	Universo de valores contendo todos os possíveis w

# Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>17</b>
1.1	Diagrama conceitual . . . . .	18
1.2	Objetivos . . . . .	21
<b>2</b>	<b>Revisão da literatura</b>	<b>23</b>
2.1	Polihidroxialcanoatos . . . . .	24
2.2	Estratégias para melhorar a produção de PHAs . . . . .	28
2.2.1	Fornecimento de substratos de baixo custo . . . . .	28
2.2.2	Modificação genética de cepas . . . . .	33
2.2.2.1	<i>Cupriavidus necator</i> glpFK . . . . .	33
2.2.3	Aperfeiçoamento do <i>upstream</i> do processo . . . . .	34
2.3	Síntese de PHB a partir de glicerol . . . . .	36
2.4	Modelagem matemática . . . . .	37
2.5	Agitação e mistura em biorreatores agitados e aerados . . . . .	40
2.5.1	Tempo de mistura . . . . .	45
2.5.2	Transferência de oxigênio . . . . .	45
2.6	Análise de sensibilidade . . . . .	49
2.7	Otimização de problemas . . . . .	51
2.8	Avaliação da precisão . . . . .	54
2.9	Considerações finais . . . . .	54
<b>3</b>	<b>Material e Métodos</b>	<b>55</b>
3.1	Determinações analíticas . . . . .	61
3.1.1	Concentração de biomassa . . . . .	61
3.1.2	Concentração de proteína celular . . . . .	61
3.1.3	Concentrações de glicerol e nitrogênio . . . . .	62

3.1.4	Concentração de PHB . . . . .	62
3.2	Extração e caracterização do polímero produzido . . . . .	63
3.3	Determinação de parâmetros cinéticos . . . . .	65
3.4	Tratamento dos dados . . . . .	65
3.4.1	Velocidade específica de crescimento celular e produção de PHB . . . . .	67
3.4.2	Fatores de conversão . . . . .	68
3.4.3	Produtividade em PHB . . . . .	68
3.4.4	Tempo de mistura . . . . .	68
3.4.5	Transferência de oxigênio . . . . .	68
3.5	Previsão do comportamento cinético dos cultivos . . . . .	71
3.6	<i>Hardware</i> e <i>software</i> utilizados . . . . .	71
3.7	Hipóteses . . . . .	72
3.8	Análise de sensibilidade . . . . .	72
3.9	Otimização de parâmetros e avaliação do modelo . . . . .	73
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>77</b>
4.1	Concentração inicial de substrato e crescimento celular . . . . .	77
4.2	Cinética de crescimento (Cultivos A e B) . . . . .	81
4.3	Influência do modo de operação do cultivo (Cultivo C) . . . . .	89
4.4	Influência da temperatura (Cultivo D) . . . . .	96
4.4.1	Caracterização do PHB extraído . . . . .	104
4.5	Adaptação da cepa em glicerol (Cultivos E e F) . . . . .	108
4.6	Tempo de fase de produção (Cultivo G) . . . . .	115
4.7	Alimentação com nitrogênio na fase de produção (Cultivo H)	121
4.8	Proposta de modelo . . . . .	128
4.9	Determinação de parâmetros . . . . .	132
4.10	Análise de sensibilidade . . . . .	133
4.11	Minimização do erro . . . . .	141
4.12	Alimentação com nitrogênio e glicerol em uma única solução (Cultivo I) . . . . .	144
4.13	Transferência de oxigênio . . . . .	152
4.14	Análise dos resíduos . . . . .	158
4.15	Maximização da produtividade . . . . .	160
<b>5</b>	<b>Conclusão</b>	<b>165</b>

<b>6 Sugestões para trabalhos futuros</b>	<b>167</b>
<b>Referências</b>	<b>169</b>
<b>A Curvas de calibração</b>	<b>183</b>
<b>B Fatores de conversão</b>	<b>187</b>
<b>C Parâmetros cinéticos em batelada alimentada</b>	<b>195</b>
<b>D Código-fonte</b>	<b>203</b>





# Capítulo 1

## Introdução

Os plásticos de origem petroquímica apresentam grande versatilidade e qualidades técnicas, porém, geram problemas ambientais em escala global e são provenientes de fonte não renovável. O polihidroxibutirato (PHB) destaca-se como alternativa, graças à sua biodegradabilidade, bem como às suas propriedades termomecânicas próximas às do polipropileno. Este biopolímero é produzido por diversos microrganismos como reserva energética, sendo a bactéria *Cupriavidus necator* a mais utilizada para tal. Isto se deve à possibilidade de utilizar diferentes fontes de carbono, elevada velocidade de crescimento celular e alta capacidade de acúmulo de PHB.

Contudo, a produção biotecnológica de PHB ainda apresenta custo elevado em relação aos plásticos convencionais. Diversas estratégias foram traçadas para tentar solucionar tal problema, destacando-se o uso de substratos de baixo custo, como resíduos industriais; a modificação genética de microrganismos e o aperfeiçoamento do processo produtivo. Zanfano (2016) modificou geneticamente *C. necator* DMS 545 visando tornar o consumo de glicerol mais eficiente, originando a cepa *C. necator* glpFK. Posteriormente, Boeira (2018) e Goularte (2018) demonstraram que esta cepa é capaz de crescer em meio contendo apenas glicerol como fonte de carbono, embora a velocidade específica de crescimento tenha sido inferior à obtida quando se utiliza glicose.

Assim, o foco do presente estudo foi aperfeiçoar as condições e proce-

dimentos de cultivo. As estratégias utilizadas tiveram como objetivo elevar a velocidade específica de crescimento e, principalmente, a produtividade em PHB. No entanto, quando se trabalha com elevada concentração celular de microrganismos aeróbios, ocorre um rápido consumo do oxigênio dissolvido. Desse modo, a partir da quantificação da capacidade de transferência de oxigênio do sistema é possível realizar sua modelagem matemática, permitindo a previsão de seu desempenho e seu aperfeiçoamento.

## 1.1 Diagrama conceitual

Por quê?

- O custo de produção do PHB deve ser reduzido para que este material seja economicamente competitivo.
- O glicerol é um subproduto da indústria de biodiesel e, devido à sua abundância no Brasil, seu preço se tornou atrativo para utilização em bioprocessos.
- Pavan (2015) mostrou que o aumento da concentração celular no meio pode resultar em uma redução de 20% do custo de produção de PHB.

Quem já fez?

- Zanfonato (2016) desenvolveu a cepa recombinante *C. necator* glpFK e verificou seu crescimento em glicerol.
- Goularte (2018), avaliando a cinética de crescimento de *C. necator* glpFK sob diferentes concentrações de glicose e glicerol, mostrou que esta cepa é capaz de crescer em meio contendo estes substratos.
- Boeira (2018) mostrou que o crescimento de *C. necator* glpFK não é influenciado pelas impurezas presentes na glicerina bruta em relação à glicerina refinada. Entretanto, não há estudos que busquem aperfeiçoar a velocidade de crescimento dessa cepa utilizando somente glicerol como fonte de carbono.

Hipóteses

- A modificação das condições de cultivo e método de alimentação da fonte de carbono e nitrogênio podem elevar a velocidade específica de crescimento celular.
- Sendo este um microrganismo aeróbico, a partir do conhecimento de sua atividade metabólica e da situação quanto à transferência e consumo de oxigênio, é possível modelar matematicamente o processo, e assim modificar as condições de operação visando maior produtividade em PHB.

## Metodologia

- Estudar o crescimento de *C. necator* glpFK em batelada simples sob diferentes concentrações de substrato.
- Alterar individualmente as condições do processo, tais como, concentração inicial de substrato, temperatura e modo de operação do cultivo (batelada alimentada na forma de pulsos e contínua), e avaliar suas influências no crescimento celular e acúmulo de PHB.
- Avaliar a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida e a velocidade de consumo de oxigênio pelos microrganismos em função da modificação das condições de agitação e aeração.
- Propor um modelo matemático que contemple o crescimento celular, formação de PHB e consumo de nutrientes em função dos parâmetros cinéticos e condições de operação.

## Respostas

- Estabelecer uma estratégia de cultivo que resulte no aumento significativo da velocidade específica de crescimento, produtividade de PHB e alta concentração celular em relação ao encontrado na literatura.
- Utilizar o modelo proposto para compreender quais as grandezas mais influentes no cultivo de *C. necator* para produção de PHB.

## 1.2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi a obtenção de alta concentração celular e elevada produtividade em PHB no cultivo de *C. necator* glpFK, utilizando glicerol como fonte de carbono e descrição matemática do crescimento celular e produção de PHB. Os objetivos específicos do estudo envolveram:

1. estudar a influência da concentração inicial de glicerol sobre a velocidade específica de crescimento;
2. obter os dados cinéticos de crescimento e de produção de PHB;
3. modelar matematicamente e simular o crescimento celular e a produção de PHB baseado nos dados cinéticos obtidos;
4. avaliar a transferência e o consumo de oxigênio ao longo do cultivo em diferentes condições operacionais;
5. aperfeiçoar a capacidade preditiva o modelo desenvolvido por meio de otimização computacional.



## Capítulo 2

# Revisão da literatura

Plásticos de origem petroquímica apresentam qualidades polivalentes, como leveza, resistência mecânica e durabilidade. Dessa forma, são utilizados em inúmeras áreas, aprimorando a qualidade de vida humana. Em 2017, foram produzidos globalmente 348 milhões de toneladas de plásticos (PLASTIC-EUROPE, 2018). Apesar das abundantes aplicações, o uso de plásticos derivados do petróleo e seu descarte incorreto se tornaram problemáticos em todo o mundo, aumentando a concentração de dióxido de carbono na atmosfera e acumulando no meio ambiente (CHAE, AN, 2018). A produção biotecnológica de biopolímeros a partir de fontes renováveis propicia uma alternativa sustentável aos plásticos comuns. Além disso, diminui a dependência mundial de polímeros sintéticos, os quais são provenientes de recurso natural limitado (GAHLAWAT, SONI, 2017). Entre estes biopolímeros, os polihidroxicanoatos se destacam devido a sua completa biodegradabilidade em menos de um ano, tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas (PAGLIANO et al., 2017).



## 2.1 Polihidroxicanoatos

Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres alifáticos acumulados intracelularmente por diversos microrganismos como material de reserva energética, sendo produzidos a partir de diferentes substratos. Estes biopolímeros foram identificados tanto em microrganismos nativos quanto em geneticamente modificados e apresentam uma vasta composição monomérica (SINGH SAHARAN; GREWAL, KUMAR, 2014; VELAZQUEZ et al., 2007).

Quanto ao número de átomos de carbono presentes no monômero, os PHAs podem ser divididos em dois grupos principais. Os PHAs de cadeia curta compreendem monômeros de 3 a 5 átomos de carbono como, por exemplo, polihidroxibutirato (PHB) (URTUVIA et al., 2014). O segundo grupo é chamado de PHAs de cadeia média, do qual fazem parte os biopolímeros contendo de 6 a 14 átomos de carbono em suas unidades monoméricas, tais como poli-3-hidroxihexanoato (P(3HHx)) e poli-3-hidroxiocetanoato (P(3HO)) (WALLE et al., 2001). A composição estrutural do monômero produzido depende, principalmente, da espécie de microrganismo, do substrato utilizado e das condições de cultivo (FRITZSCHE; LENZ, FULLER, 1990; WANG et al., 2011). Quando diferentes substratos são utilizados simultaneamente, pode ocorrer a produção de copolímeros, como polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato (P(HB-co-HV)) ou poli(hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato) (P(HB-4HB)) (HASSAN et al., 2013).

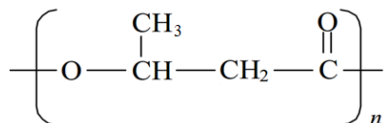
Bactérias podem acumular PHAs sob condições de excesso da fonte de carbono e carência de nutrientes como nitrogênio, fósforo, magnésio ou oxigênio. Outro grupo de bactérias não requer a limitação de nutrientes para síntese de biopolímero, acumulando-o durante a fase de crescimento (LEE, 1996). As características desejáveis para microrganismos produtores de PHA abrangem: elevada velocidade específica de crescimento e de conversão de substrato a produto, alta capacidade de acúmulo de PHA, capacidade de utilização de substratos de baixo custo e alta resistência à pressão osmótica (permitindo operar com substrato concentrado) (RAMSAY, 1994). Diversas bactérias de origem natural ou geneticamente modificada dos gêneros *Cupriavidus* (anteriormente denominado *Ralstonia*), *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Escherichia coli* recombinante foram identificadas como pro-

dutoras de PHAs. Entretanto, a maior parte delas não são consideradas aptas à produção industrial devido à baixa capacidade de acúmulo. As que são capazes de produzir PHAs em quantidades significativas são dos gêneros *Pseudomonas* e *Cupriavidus* (GUMEL; ANNUAR, CHISTI, 2012).

A bactéria *C. necator* é o microrganismo mais utilizado na produção de PHA (KHANNA, SRIVASTAVA, 2005). Sua ampla utilização se dá, principalmente, devido à sua elevada velocidade de crescimento e alta capacidade de acúmulo, podendo apresentar um percentual maior que 80% em relação à matéria seca total, além de produzir um biopolímero de elevada massa molar (entre 200 kDa e 3.000 kDa). Entre os PHAs, os mais estudados são o PHB e o copolímero (P(HB-co-HV)), apresentando, além de biodegradabilidade, propriedades termoplásticas e mecânicas próximas às do polipropileno (SAITO, DOI, 1994; SINGH SAHARAN; GREWAL, KUMAR, 2014). O PHB é insolúvel em água, possui temperatura de transição vítrea que varia de  $-5$  a  $5$  °C e a temperatura de fusão entre  $160$  e  $180$  °C, próxima à do polipropileno, de  $174 - 178$  °C. Entretanto, sua alta cristalinidade o torna mais rígido e quebradiço (LEE, 1996). A estrutura monomérica do PHB pode ser vista na Figura 2.1.

Esse biopolímero pode ser processado como um termoplástico convencional em processos industriais, incluindo extrusão, injeção e termoprensagem. PHB já foi aplicado como componente de equipamentos eletrônicos, copos e talheres descartáveis e aditivo de tintas para revestimento (ALBUQUERQUE, MALAFAIA, 2018). Estudos mostram que o PHB apresenta excelentes propriedades para ser utilizado na área médica, como fabricação de fármacos com liberação controlada de drogas e hormônios, próteses e fio de sutura, uma vez que, quando degradado, produz ácido 3-hidroxi-butírico, um constituinte comum no sangue humano (CHEN, 2005; REHM, 2007).

Figura 2.1: Composição monomérica do PHB;  $n$  é inteiro e varia de 1 a milhares.



Fonte: adaptado de Rehm (2010).

A Tabela 2.1 apresenta estudos com diversos microrganismos produtores de PHB, indicando o substrato utilizado e a fração de biopolímero acumulado.

De maneira geral, o processo produtivo de PHB por *C. necator* contempla as seguintes etapas: a) pré-cultivo, visando aumentar a concentração celular; b) cultivo celular no biorreator principal, onde ocorre o crescimento celular e acúmulo de PHB; c) separação das células contendo polímero do caldo de cultivo; d) rompimento da parede celular e extração do polímero; e) solubilização do polímero e separação dos resíduos celulares; f) precipitação do PHB solubilizado e, finalmente, secagem do PHB extraído (GAHLAWAT, SONI, 2017). O processo de rompimento celular e extração pode ser realizado por diferentes metodologias, como o emprego de solventes, enzimas, métodos mecânicos e térmicos (HAND; GILL, CHU, 2016; PRADHAN et al., 2017). Contudo, a estratégia utilizada deve ser definida com cautela, já que pode elevar significativamente o custo de produção (PAVAN, 2015).

Atualmente, PHAs são vendidos sob as marcas Biopol (EUA), Biomer (Alemanha), Biocycle (Brasil), Minerv (Itália) e Jiangsu Nantian (China). A capacidade produtiva global de PHAs em 2013 foi de 32 mil toneladas. É estimado que a demanda de PHAs cresça dez vezes até 2020, em comparação com demanda apresentada em 2013 (AESCHELMANN, CARUS, 2015).

Tabela 2.1: Microrganismos produtores de PHB a partir de diferentes fontes de carbono e porcentagem de polímero acumulado.

Cepa	Fonte de carbono	Biomassa final (g L <sup>-1</sup> )	Conteúdo de PHB (%)	Produtividade (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Referência
<i>Bacillus megaterium</i> uyuni S29	Glicerol	7	70	0,45	(RODRIGUEZ-CONTRERAS et al., 2013)
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	Glicose	164	74	2,42	(KIM et al., 1994)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Glicose e frutose	62	69	1,0	(IENCZAK et al., 2016)
<i>Cupriavidus necator</i> glpFK	Glicose e glicerol	15	73	0,41	(GOULARTE, 2018)
<i>Escherichia coli</i> arcA	Amino ácidos de caseína e glicerol	21	51	0,18	(NIKEL et al., 2008)
<i>Escherichia coli</i> recombinante	Glicerol	22	46	0,12	(WANG, Q. et al., 2013)
<i>Escherichia coli</i> recombinante	Amido	2	57	1,24	(BHATIA et al., 2015)
<i>Pseudomonas multivorans</i>	Glicerol	24	32	0,06	(ZHU et al., 2010)

Fonte: autor (2019).

## **2.2 Estratégias para melhorar a produção de PHAs**

Quando comparado com polímeros de origem petroquímica, os polihidroxialcanoatos apresentam elevado custo de fabricação, sendo um obstáculo para a aplicação em escala industrial (NARANJO et al., 2013). São reportados na literatura valores de 3 a 6 dólares por quilo para diferentes PHAs, enquanto que o polipropileno é vendido a US\$1,30 por quilo (DE MATOS et al., 2015). Dessa forma, diversas estratégias são empregadas buscando tornar sua produção mais eficiente. Os métodos que se destacam são a utilização de substratos de origem renovável e de baixo custo, como subprodutos e resíduos industriais, o desenvolvimento de melhores cepas por meio de engenharia genética e a aperfeiçoamento das estratégias de cultivo (LIU et al., 2016; SINGH SAHARAN; GREWAL, KUMAR, 2014).

Outra maneira de reduzir o custo de fabricação é integrar a planta de produção de PHAs a outras instalações como, por exemplo, uma usina de biodiesel ou açúcar e álcool, onde a economia se dá pelo compartilhamento de equipamentos, materiais e excesso de eletricidade produzida na usina (BHATTACHARYYA et al., 2012; PAGLIANO et al., 2017).

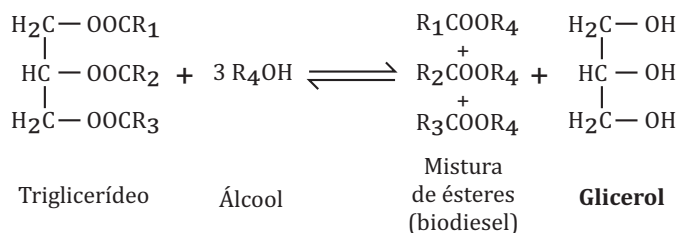
### **2.2.1 Fornecimento de substratos de baixo custo**

Aproximadamente 50% do custo de produção de PHA é constituído pelo consumo de matéria-prima, em especial a fonte de carbono utilizada no cultivo. Visto que substratos de alto valor nutricional amplamente utilizados como glicose, amido e óleos comestíveis, acarretam no encarecimento do produto final, o fornecimento de substratos de origem renovável e de baixo custo surgiu como uma alternativa ambientalmente sustentável e economicamente viável para a redução do custo de produção (GOMEZ et al., 2012). Diversos resíduos agrícolas, efluentes industriais e municipais se mostraram fontes de carbono promissoras, uma vez que podem reduzir o custo de produção com matéria-prima e o consumo energético do processo (SUWANNASING; IMAI, KAEWKANNETRA, 2015). A utilização de resíduos celulósicos como palha de trigo e bagaço, demonstrou ser uma alternativa ao uso de glicose na produção de PHAs (ALVA MUNOZ, RILEY, 2008; CESARIO et al., 2014). Resíduos lipídicos como óleo de palma saponificado e óleo

de cozinha usado foram também utilizados com sucesso como substrato, acumulando 43 e 62% em massa de PHAs, respectivamente (CRUZ et al., 2016; MOZEJKO, CIESIELSKI, 2013). Dos resíduos industriais empregados como substrato, destaca-se a utilização de efluentes e coprodutos da indústria têxtil e de laticínios, assim como da produção de biodiesel (BOSCO, CHIAMPO, 2010; TAMBOLI et al., 2010; NARANJO et al., 2013; SHAHZAD et al., 2013). Em especial, o glicerol, coproduto na fabricação do biodiesel, apresenta resultados promissores na produção de PHAs (CIESIELSKI; MOZEJKO, PISUTPAISAL, 2015).

O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel no mundo, com uma produção, em 2016, de 3,8 milhões de m<sup>3</sup> e com capacidade nominal para 7,4 milhões de m<sup>3</sup> (ANP, 2017). O principal coproduto da produção de biodiesel é o glicerol, gerado a partir da transesterificação de óleos e gorduras tanto animais quanto vegetais, na presença de álcool e catalisador, como apresentado na Figura 2.2. Para cada 100 kg de biodiesel produzido via transesterificação, aproximadamente 10 kg de glicerol bruto, contendo 85% de glicerol, é gerado (CHOI, 2008).

Figura 2.2: Equação geral da transesterificação de triglicerídeos.



Fonte: adaptado de Meher, Vidyasagar e Naik (2006).

O glicerol é amplamente utilizado na indústria farmacêutica, na fabricação de tintas e resinas e no processamento de tabaco. Entretanto, o glicerol diretamente obtido no processo de produção do biodiesel por transesterificação contém diversas impurezas, como metanol, cloreto de sódio, ácidos graxos e sabões (MENDES, SERRA, 2012). Desse modo, para ser utilizado na indústria, deve ser submetido a uma série de tratamentos

visando aumentar sua pureza. Existem diferentes processos de purificação que podem ser empregados. Assim a escolha do método dependerá da pureza almejada, que por sua vez, depende da aplicação desejada (LUO et al., 2016).

Após ser separado do biodiesel por decantação, o glicerol obtido é denominado de glicerina bruta (*crude glycerol*). Este é destilado, visando a remoção da água e do álcool e, em seguida, é realizado a destilação *flash* com arraste de vapor, com o objetivo de remover odores, e clarificação com carvão ativado. Neste processo, o glicerol obtido apresenta até 99% de pureza e é denominado glicerol bidestilado ou industrial (*technical grade glycerol*) (ARDI; AROUA, HASHIM, 2015). Outra rota de purificação pode ser realizada por meio da passagem da glicerina bruta por leitos de troca iônica, seguido por evaporadores de múltiplos estágios e passagem por carvão ativado. Desse modo, o glicerol obtido possui pureza maior que 99% e é chamado de glicerol farmacêutico ou puro (*United States Pharmacopeia standard glycerol*) (ARDI; AROUA, HASHIM, 2015).

Dada a notável produção nacional de biodiesel, o glicerol é considerado uma fonte de carbono abundante e de baixo custo. Entretanto, não é comumente empregado na produção de PHAs, dado que, em relação à glicose, a velocidade específica de crescimento celular por *C. necator* é significativamente menor (CAVALHEIRO et al., 2009; REINECKE, STEINBUCHER, 2009). O glicerol puro, quando empregado como fonte de carbono, permite gerar dados experimentais sem a introdução das perturbações causadas pelos resíduos presentes na glicerina bruta.

Os carbonos da molécula de glicerol possuem número de redução maior que os de carbono da glicose (4, 67 e 4, 00, respectivamente) e, em virtude disso, armazenam mais energia em suas ligações. Desse modo, o glicerol é um dos substratos mais adequados na geração de acetil-CoA, precursor do PHB, favorecendo a síntese do biopolímero (HERMANN-KRAUSS et al., 2013). O uso de glicerol na síntese de PHAs foi explorado em diversos microrganismos, tais como *Haloferax mediterranei*, resultando em 75% de acúmulo de P(HB-co-HV), *Bacillus megaterium*, com 60% de PHB e *Cupriavidus necator*, acumulando 62% de PHB (HERMANN-KRAUSS et al., 2013; IBRAHIM, STEINBUCHER, 2009; NARANJO et al., 2013). Entretanto, os autores reportam baixa concentração final de biomassa.

Na Tabela 2.2 são apresentados os resultados reportados na lite-

ratura acerca da produção de PHB utilizando tanto glicerol puro quanto bruto, sendo que, com a utilização do primeiro, Mozumder et al. (2014a) alcançaram a mais elevada concentração de polímero. A estratégia de alimentação de substrato empregada pelos autores foi a alimentação exponencial de glicerol nas primeiras horas de cultivo, seguida pela alimentação em função do consumo de base (relacionada indiretamente ao crescimento celular) e ao final do cultivo foi feita à vazão constante. Os autores reportam a produtividade em biopolímero de  $1,36 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . No entanto, para que a cepa *C. necator* DSM 545 crescesse utilizando glicerol, uma fase de adaptação antes do cultivo em biorreator foi necessária. No estudo citado, a cepa foi submetida a cinco pré-cultivos em reator orbital, de modo que a produtividade real do cultivo seria significativamente menor. Além do mais, pode-se imaginar os problemas logísticos e custos envolvidos de um processo longo como este em grande escala. O mesmo procedimento de adaptação foi realizado por Cavalheiro et al. (2009). Assim o valor de produtividade apresentado deve ser avaliado com cautela.



Tabela 2.2: Comparação da produção de PHB e produtividade de cultivos utilizando glicerol puro e bruto em modo batelada alimentada, sendo  $X_t$  a concentração de biomassa total

Substrato	Cepa	$X_t$ g L <sup>-1</sup>	Conteúdo em PHB (%)	Produtividade em PHB g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Referência
Glicerol puro	<i>C. necator</i> DSM 545	82,5	62	1,50	(CAVALHEIRO et al., 2009)
Glicerol puro	<i>C. necator</i> JMP 134	91,5	62	1,31	(POSADA et al., 2011)
Glicerol puro	<i>C. necator</i> H16	75	71	1,09	(TANADCHANGSAENG, YU, 2012)
Glicerol puro	<i>Zobellella denitrificans</i> MW1	81,2	67	1,09	(IBRAHIM, STEINBUCHER, 2009)
Glicerol bruto	<i>C. necator</i> DSM 545	104,7	63	1,36	(MOZUMDER et al., 2014b)
Glicerol bruto	<i>C. necator</i> DSM 545	68,8	38	0,84	(CAVALHEIRO et al., 2009)

Fonte: autor (2019).

## 2.2.2 Modificação genética de cepas

Uma parte representativa das pesquisas publicadas na área de biotecnologia envolve a alteração genética da célula utilizada para a produção de um dado produto de interesse (CARROLL, ZHOU, 2017). Neste sentido, diversos estudos foram realizados para modificar geneticamente cepas que naturalmente não acumulam PHAs, ou aperfeiçoar a biossíntese em microrganismos já produtores. Modificações genéticas visando ampliar o espectro de possíveis substratos foram estudadas por diversos autores. Em *C. necator* W50, foram desenvolvidas as rotas metabólicas e expressão dos genes responsáveis pelo consumo de D-xilose e L-arabinose (LIU et al., 2016). *Escherichia coli* foi modificada, sendo capaz de utilizar soro de queijo como fonte de carbono para a produção de PHB (PAIS et al., 2014).

Eggers e Steinbuchel (2014) demonstraram que a ausência do sistema depolimerase (codificado pelo gene *phaZ*) contribuiu para maiores rendimentos em PHA, sugerindo que *phaZ* é um alvo importante quando se busca modificar geneticamente microrganismos para a produção de PHA. A superexpressão da enzima PHA sintase (codificado pelo gene *phaC*) resultou em maior produtividade de PHA em *Rhodospirillum rubrum* (JIN, NIKOLAU, 2014). Alocar os genes responsáveis pela rota metabólica de PHAs em *E. coli* recombinante é uma estratégia que gera vantagens como elevada produtividade em biopolímero e alta concentração celular (WANG et al., 2014). Os genes responsáveis pela biossíntese de PHA de diversos microrganismos, como *C. necator*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptomyces aureofaciens*, já foram introduzidos com sucesso em *E. coli*, tornando esse microrganismo um produtor de PHAs (HORNG et al., 2010; LANGENBACH; REHM, STEINBUCHEL, 1997; MAHISHI; TRIPATHI, RAWAL, 2003).

### 2.2.2.1 *Cupriavidus necator* *glpFK*

Estudos mostram que glicerol pode ser utilizado no cultivo de *C. necator*. Entretanto, sem um longo período de adaptação, a velocidade específica de crescimento é significativamente menor quando comparada com glicose (CAVALHEIRO et al., 2009). Essa menor velocidade de crescimento se deve à baixa atividade das enzimas aquaporina, glicerol quinase e glicerol-3P dehidrogenase (FUKUI et al., 2014). Em *E. coli*, os genes *glpF* e *glpK* codificam as mesmas enzimas, porém estas apresentam atividade

cinética superior (Tabela 2.3). Desse modo, no grupo em que este trabalho está inserido, foi desenvolvida uma cepa geneticamente modificada a partir de *C. necator* DSM 545, visando tornar o consumo de glicerol mais eficiente. A partir da expressão heteróloga dos genes *glpF* e *glpK* de *E. coli* em *C. necator* foi possível aumentar a velocidade específica de crescimento nesta fonte de carbono (ZANFONATO, 2016). A autora reporta que o glicerol foi mais rapidamente consumido e com rendimentos maiores na produção de PHB em comparação ao obtido utilizando a cepa parental (DSM 545).

### 2.2.3 Aperfeiçoamento do *upstream* do processo

A biossíntese de PHA pode ser aprimorada por meio de melhorias nas condições e procedimentos de cultivo. A escolha do regime de operação, temperatura, pH, assim como o fornecimento de precursores e substrato, deve buscar a otimização dos parâmetros cinéticos do processo, tendo influência direta na produção de PHA (ANJUM et al., 2016). A escolha do *upstream* como foco de estudo se dá pela limitação intrínseca do *downstream* do processo, isto é, a máxima quantidade de PHB possível de ser extraída é limitada pela quantidade produzida. Dessa forma, apesar de serem complementares, o aperfeiçoamento do *upstream* do processo pode gerar resultados mais expressivos do que quando estas melhorias são direcionadas para o *downstream*.

A escolha do modo de cultivo depende geralmente da característica do microrganismo utilizado. O método empregado com mais frequência

Tabela 2.3: Genes que codificam as enzimas aquaporina, glicerol quinase e glicerol-3P dehidrogenase em *C. necator* e *E. coli*

Enzima	Gene		Identidade
	<i>C. necator</i>	<i>E. coli</i>	
Aquaporina (facilitador de glicerol)	H16_A3690	<i>glpF</i>	25%
Glicerol quinase	H16_A2507	<i>glpK</i>	52%
Glicerol-3P dehidrogenase	H16_B1198	<i>gplD</i>	27%

Fonte: autor (2019).

na produção de PHB é o cultivo em duas etapas. A primeira consiste em uma etapa de crescimento celular sob condições nutricionais balanceadas e a segunda etapa é composta por uma fase de síntese e acúmulo de biopolímero desencadeada pela limitação de algum nutriente, como nitrogênio, fósforo ou oxigênio (DAVIS et al., 2015; RYU et al., 1997). Outra estratégia utilizada é o cultivo em uma única fase, no qual o acúmulo de PHB é feito de maneira associada ao crescimento. Contudo, baixas frações de PHB e velocidade de crescimento celular são reportadas (ACKERMANN, BABEL, 1997).

Alta densidade celular é pré-requisito para maximizar a produtividade de um cultivo, ou seja, a quantidade de produto sintetizado em um dado volume e em um dado tempo ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). A concentração em base seca a partir da qual um cultivo pode ser qualificado como de alta densidade celular varia com o microrganismo empregado. Para cultivos de *C. necator* é comum esta denominação ser empregada a partir de  $80 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa total (MOZUMDER, 2015). Apesar das vantagens, a alta densidade celular pode gerar problemas de solubilidade de gases, acúmulo de produtos ou co-produtos do metabolismo celular a níveis inibitórios ao crescimento, acúmulo de  $\text{CO}_2$  e de calor no meio, elevada demanda de oxigênio e aumento da viscosidade do meio, o que afeta a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida (RIESENBERG, GUTHKE, 1999).

Visando evitar a inibição do crescimento celular devido à elevada concentração da fonte de carbono no meio, duas estratégias se destacam: vazão de alimentação crescente e controle *feedback*. Na primeira, inicia-se o cultivo com a concentração de substrato que permite o máximo crescimento celular. Com base na velocidade específica de crescimento na fase exponencial (previamente determinada a partir de cultivo nas condições ótimas), adiciona-se a fonte de carbono a uma vazão exponencialmente crescente para manter a sua concentração no meio aproximadamente constante (KORZ et al., 1995). Já no controle *feedback* a alimentação de substrato se dá em função de alguma variável de controle, como pH ou oxigênio dissolvido (RIESENBERG, GUTHKE, 1999).

Quando se utiliza substratos com baixa concentração de carbono, pode-se atingir elevada concentração celular por meio de uso de membranas de reciclo (IENCZAK et al., 2016). Neste estudo, utilizando *C. necator* DSM 545 para produção de PHB, os autores atingiram uma concentração

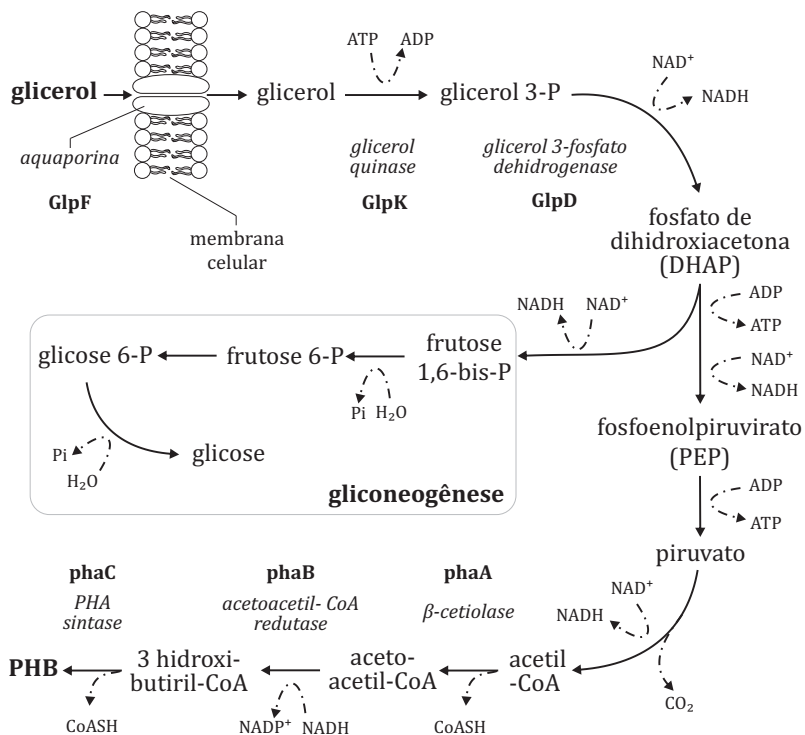
celular de  $61,6 \text{ g L}^{-1}$  contendo 68,8% em massa seca de biopolímero a partir de um substrato contendo  $90 \text{ g L}^{-1}$  de açúcares redutores totais. Além do mais, PHA foi produzido com sucesso utilizando um sistema de reatores em batelada em série e também em reatores do tipo *air-lift* (AMULYA; JUKURI, VENKATA, 2015; RIVERA-TERCEROS et al., 2015).

## 2.3 Síntese de PHB a partir de glicerol

A produção de PHB abrange uma série de etapas complexas que inclui a produção de biomassa, manutenção celular e acúmulo intracelular de polímero (PENLOGLOU; CHATZIDOUKAS, KIPARISSIDES, 2012).

A via metabólica do consumo de glicerol por *C. necator* foi proposta por Tanadchangsang e Yu (2012) e é apresentada na Figura 2.3. Ao contrário da glicose, que é ativamente transportada para o interior da célula pelo sistema fosfoenolpiruvato-carboidrato fosfotransferase (PEP-PTS), o glicerol atravessa a membrana celular por difusão facilitada (SWEET et al., 1990). Uma vez dentro da célula, o glicerol é fosforilado a glicerol 3-fosfato pela enzima glicerol quinase e é oxidado a dehidroxiacetona fosfato (DHAP). Neste instante, duas vias podem ser tomadas, a gliconeogênese, a qual produz precursores (como glicose) para a geração de biomassa e manutenção das atividades celulares, ou o DHAP pode ser convertido em fosfoenolpiruvado (PEP). O grupo enol da molécula de PEP ativa o grupamento fosfato que é transferido para um ADP, formando ATP e permitindo o enol sofrer isomerização para carbonila, tornando-se uma molécula de piruvato (HASSETT; BLAETTLER, KNOWLES, 1982). O piruvato é oxidado a acetil-CoA, produzindo dióxido de carbono, enquanto na fase de crescimento celular o acetil-CoA entra no ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) produzindo novamente dióxido de carbono e energia na forma de ATP. Quando ocorre limitação nutricional, o ciclo é interrompido devido às elevadas concentrações de NADH e NADPH e o acetil-CoA é direcionado à via de biossíntese de PHB. Nesta via, o acetil-CoA é transformado em acetoacetil-CoA pela enzima  $\beta$ -cetiólase (codificada pelo gene *phaA*) e por meio da enzima acetoacetil-CoA redutase (*phaB*) é reduzido a hidroxibutilil-CoA. Em seguida, hidroxibutilil-CoA é transformado em PHB pela PHA sintase (*phaC*) (MOZEJKO-CIESIELSKA, KIEWISZ, 2016; REHM, STEINBÜCHEL, 2005).

Figura 2.3: Rota metabólica simplificada da produção de PHB por glicerol.



Fonte: adaptado de Penloglou, Chatzidoukas e Kiparissides (2012) e Tanadchangsang e Yu (2012).

## 2.4 Modelagem matemática

Um modelo matemático é uma representação da realidade passível de análise, onde suas soluções podem ser calculadas por meio de simulação e, logo, representar uma realidade física (ALLAIRE, CRAIG, 2007). Em sistemas biológicos, modelos matemáticos são ferramentas úteis na otimização e no controle do metabolismo celular e formação de produtos, abordando desde o modo de operação de um cultivo e o comportamento de uma população celular inteira, até o metabolismo de uma única célula. Diversas

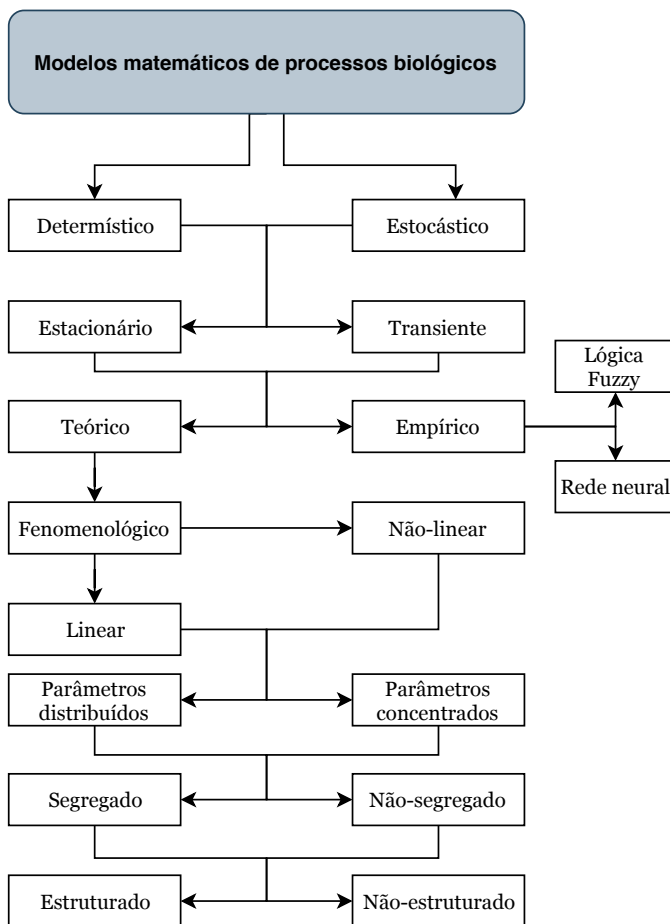
classificações podem ser atribuídas a modelos matemáticos de processos biológicos, conforme a representação esquemática apresentada na Figura 2.4 (FISCHER, 2008; MOTTA, PAPPALARDO, 2013). Em modelos determinísticos, cada condição de entrada gera um resultado bem definido, enquanto que os estocásticos indicam a probabilidade de um resultado ocorrer. Ambos os modelos podem ser estacionários ou transientes, lineares ou não-lineares, fundamentados em uma base teórica ou em observações experimentais (assim como em uma combinação dos dois). As grandezas dos modelos a parâmetros concentrados não variam espacialmente, como as dos modelos a parâmetros distribuídos. Se a população celular é considerada heterogênea, o modelo denomina-se segregado, já se os processos metabólicos no interior das células são diferenciados entre si, trata-se de um modelo estruturado. Outras classificações não contempladas na Figura 2.4 podem ser atribuídas a modelos matemáticos, porém não estão no escopo do presente trabalho.

Um modelo específico pode ser classificado em mais de uma das categorias descritas como, por exemplo, o modelo de Monod que é determinístico, a parâmetros concentrados, não-segregado e não-estruturado.

Diversos estudos já buscaram produzir modelos matemáticos para descrever o crescimento celular e a produção de PHAs. Heinze e Lafferty (1980) introduziram a ubíqua distinção entre biomassa residual e a fração polimérica da célula. Para meios com mais de uma fonte de carbono, a equação de Monod expressa para múltiplos substratos foi empregada (KOLLER et al., 2006). A inibição do crescimento por substratos, como o efeito da pressão osmótica causado pelo excesso de açúcares, ou alteração do pH pela presença de ácidos orgânicos já foi explorada (MULCHANDANI; LUONG, GROOM, 1989). Tohyama et al. (2002) considerou o efeito da concentração de oxigênio dissolvido no crescimento celular. Outro termo de grande relevância é a inibição pelo elevado acúmulo de produto (KATO et al., 1999). A conversão de PHB em biomassa residual foi explorada por Mozumder et al. (2014a).

O uso do modelo logístico para o crescimento celular e formação de PHB foi explorado por Ocampo-López, Colorado-Arias e Ramírez-Carmona (2015) e Pérez Rivero et al. (2016). Modelos pouco-estruturados geralmente descrevem a evolução da concentração da co-enzima acetil-CoA e produtos originados por ela, sendo estes, precursores do PHB (NOVAK,

Figura 2.4: Classificações de modelos matemáticos biológico.



Fonte: autor (2019).

2015).

Além dos estudos citados, destaca-se o trabalho de Penloglou et al. (2010), onde os autores desenvolveram um modelo integrado metabólico-polimérico para a predição da concentração e distribuição de peso molecular de PHB por *C. necator*. Spoljaric et al. (2013b) obtiveram o aumento



da produtividade em PHB por meio da otimização em computador de seu modelo cinético. Um compêndio de modelos que descrevem diferentes modos de operação de cultivo, tanto para cultura pura quanto para culturas mistas pode ser encontrado em Patnaik (2005).

Modelos metabólicos visam descrever as concentrações de metabólitos intracelulares, refletindo, dentro das considerações tomadas, a fisiologia celular real. Os mecanismos regulatórios celulares ainda não são completamente elucidados. Dessa forma, ainda não é possível uma completa descrição metabólica da célula. Entretanto, modelos matemáticos metabólicos da produção de PHAs são fundamentais para a ampliação de seu entendimento. Uma ampla discussão a este respeito pode ser encontrada em Novak (2015).

Além dos modelos que descrevem o comportamento celular, a descrição quantitativa da mistura é de grande importância na avaliação de um cultivo biológico em reator agitado e aerado.

## 2.5 Agitação e mistura em biorreatores agitados e aerados

A fim de se induzir o movimento necessário de líquido para que haja a distribuição de substrato em todo o biorreator e fornecimento adequado de oxigênio ao sistema, alguma forma de agente de mistura é requerida. Geralmente, a mistura é atingida utilizando um ou mais impelidores mecânicos montados em um eixo de rotação. O tipo de impelidor empregado é de fundamental importância e define o padrão de movimento do fluido no interior do reator, podendo ser classificado como impelidor de escoamento radial, axial ou misto (RUDOLPH et al., 2007; SHULER, KARGI, 2002). Os tipos de impelidores comumente utilizados em bioprocessos são turbinas disco com 6 pás planas, também conhecidos como turbina *Rushton*, e os de pás inclinadas (*pitched blade*) (GARCIA-OCHOA, GOMEZ, 2009).

A velocidade com que os impelidores operam influencia as condições do cultivo celular. Se a frequência de rotação é muito baixa, o gás proveniente dos aspersores (geralmente posicionados logo abaixo do impelidor inferior) não será dispersado. Por consequência, ocorre inundação (*flooding*) e prejuízo à transferência de oxigênio para a fase líquida, o que deve

ser evitado em todos os casos (BAKKER; SMITH, MYERS, 1994; COUPER et al., 2012). Por outro lado, se a frequência for muito alta, as elevadas tensões de cisalhamento podem danificar as células e afeta a viabilidade celular (GARCIA-BRIONES, CHALMERS, 1994).

Reatores agitados por um único impelidor são geralmente criticados pela distribuição de cisalhamento de forma desigual e pela dissipação de energia cinética, o que é prejudicial, principalmente no caso de microrganismos em biorreatores. Dessa maneira, empregar mais de um impelidor no mesmo eixo fornece vantagens, como maior tempo de residência das bolhas de ar no interior do sistema, maior área superficial, favorecendo um controle mais preciso da temperatura e menor taxa de cisalhamento para a mesma potência fornecida (menor frequência de agitação) (GOGATE; BEENACKERS, PANDIT, 2000).

Em sistemas aerados, deve-se primeiramente conhecer o padrão de escoamento dessas bolhas no interior do reator. Lu e Chen (1986) identificaram três regimes de escoamento relacionados à interação gás-impelidor: a) o impelidor se encontra sobrecarregado de gás (tanto pela baixa frequência de rotação quanto pela alta vazão de aeração) resultando em uma mistura pobre em que o gás segue um caminho helicoidal ascendente ao longo do eixo de rotação dos impelidores; b) carga (*loading*), o gás é disperso apenas na parte superior do reator; c) completa dispersão, as bolhas de ar são distribuídas ao longo do reator e uma considerável quantidade de ar recircula pelos impelidores. Define-se como frequência crítica de dispersão ( $N_{cr}$ ) a frequência de rotação em que o regime de escoamento do gás passa a ser completamente distribuído (LU, CHEN, 1986). A determinação de  $N_{cr}$  pode ser feita por inspeção visual, onde a frequência de agitação é progressivamente aumentada de zero até velocidade em que as bolhas de ar atinjam o fundo do reator (ZHENG et al., 2018).

A potência necessária para se agitar um meio de cultivo em um processo industrial é uma importante grandeza que afeta o investimento em equipamentos e custos operacionais (TERVASMÄKI et al., 2016). A potência requerida em um sistema não é apenas relacionada ao tipo e tamanho dos impelidores, mas também de fatores como as dimensões relativas do reator e as propriedades físico-químicas do meio. Para sistemas não aerados, a potência transferida foi relacionada com o adimensional número de potência,  $N_p$ , o qual é dependente do número de Reynolds, representados pelas

Equações 2.1 e 2.2, respectivamente (RUSHTON, 1950).

$$N_p = \frac{P_t}{\rho N_{rot}^3 D_i^5} \quad (2.1)$$

$$N_{Re} = \frac{N_{rot} D_i^2 \rho}{\mu_l} \quad (2.2)$$

Sendo:

- $N_p$  número de potência (-);
- $N_{Re}$  número de Reynolds (-);
- $P_t$  potência transferida ao meio não aerado(W);
- $\rho$  massa específica do meio ( $\text{kg m}^{-3}$ );
- $N_{rot}$  frequência de rotação do impelidor ( $\text{s}^{-1}$ );
- $D_i$  diâmetro do impelidor (m);
- $\mu_l$  viscosidade do meio ( $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ).

Em seu trabalho, Bakker, Smith e Myers (1994) avaliaram a relação de  $N_p$  e  $N_{Re}$ , observando que, para impelidores Rushton, o número de potência permanece constante e igual a 5,5 quando em regime turbulento completamente estabelecido ( $N_{Re} > 104$ ).

O padrão de escoamento do líquido tem muita importância na eficiência da mistura, especialmente quando se utiliza mais de um impelidor. O espaçamento entre os impelidores,  $\Delta C$ , determina o grau de interação entre as linhas de corrente geradas por estes (PAN et al., 2008). Hudcova, Machon e Nienow (1989) mostraram que, para um sistema contendo duas turbinas *Rushton*, a potência total transferida ao líquido aumenta e atinge valor máximo quando a distância entre os impelidores ( $\Delta C$ ) é igual ou superior a duas vezes seu diâmetro ( $D_i$ ), ou seja, cada impelidor desenvolve os padrões de escoamento característicos de um sistema contendo um único impelidor. Neste caso, a potência total transferida ( $P_2$ ) é o dobro da potência transferida por um único impelidor ( $\frac{P_2}{P_1} = 2$ ). Quando o espaçamento entre os impelidores é igual ao diâmetro do impelidor ( $\Delta C = D_i$ ),  $\frac{P_2}{P_1}$  é igual a 1,5. Já em sistemas aerados, a presença de bolhas de ar no líquido leva à redução de densidade aparente da dispersão, provocando uma redução da potência transmitida.

Na situação em que o biorreator é equipado com múltiplos impelidores, o impelidor superior não é afetado pelas bolhas de gás na mesma

intensidade que o impelidor inferior, uma vez que estas já se encontram dispersas no meio (desde que o impelidor inferior não se encontre sob ação de muitas bolhas de ar) (BAKKER; SMITH, MYERS, 1994). Consequentemente, o impelidor superior raramente se encontra submetido a ação de excesso de bolhas de ar.

Em condições de turbulência bem definida, o tipo de regime a que o sistema está submetido pode ser analisado por meio da velocidade superficial do gás,  $v_s$  (Equação 2.3). Para valores de  $v_s$  menores que  $0,02 - 0,03 \text{ m s}^{-1}$ , considera-se que as bolhas estão distribuídas de forma homogênea no reator, onde a frequência de rotação do impelidor controla o padrão de escoamento do gás e tamanho de bolhas. Já para valores maiores que  $0,02 - 0,03 \text{ m.s}^{-1}$ , o regime de bolhas é heterogêneo e o escoamento é controlado pela velocidade do gás (PAUL; ATIEMO-OBENG, KRESTA, 2004).

$$v_s = \frac{Q}{\left(\frac{\pi D_i^2}{4}\right)} \quad (2.3)$$

Sendo:

- $v_s$  velocidade superficial do gás ( $\text{m s}^{-1}$ );
- $Q$  vazão de ar nas condições de operação do sistema ( $\text{m}^3 \text{ s}^{-1}$ );
- $D_i$  diâmetro do impelidor (m).

Diversos autores realizaram estudos no sentido de relacionar a potência transferida em sistemas não aerados ( $P$ ) e aerados ( $P_g$ ) (HUDCOVA; MACHON, NIENOW, 1989; MICHEL, MILLER, 1962).

A relação apresentada na Equação 2.4 foi determinada a partir dos dados de Michel e Miller (1962) para turbinas Rushton, sendo válida para meios com densidade entre  $0,87$  e  $1,6 \text{ g.mL}^{-1}$ , viscosidade de  $0,8$  a  $28 \text{ cP}$  e velocidade superficial de gás de até  $5,3 \text{ cm.s}^{-1}$ . Para melhor correlação, o diâmetro máximo do biorreator deve ser  $0,30 \text{ m}$  e a razão entre o diâmetro do impelidor e do tanque deve estar no intervalo de  $0,25$  a  $0,46$  (HUGHMARK, 1980).

$$\frac{P_g}{P_t} = 0,10 \left( \frac{Q}{N_{rot} V_l} \right)^{-\frac{1}{4}} \left( \frac{N_{rot}^2 D_i^4}{g W_i V_l^{2/3}} \right)^{-\frac{1}{5}} \quad (2.4)$$

Sendo:

- $P_g$  potência transferida ao meio sob aeração (W);  
 $P_t$  potência transferida ao meio sem aeração (W);  
 $Q$  vazão de alimentação de ar ( $m^3 s^{-1}$ );  
 $N_{rot}$  frequência de rotação dos impelidores ( $s^{-1}$ );  
 $V_l$  volume de líquido ( $m^3$ );  
 $D_i$  diâmetro dos impelidores (m);  
 $g$  aceleração devido à gravidade ( $m s^{-2}$ );  
 $W_i$  largura das pás dos impelidores (m).

Baseado em dados experimentais e simulações utilizando fluidodinâmica computacional, a Equação 2.5 contém tanto os parâmetros operacionais quanto os geométricos para tanques contendo dois impelidores do tipo *Ruston*, sendo válida para sistemas de 0,20 a 0,45 m de diâmetro (TAGHAVI et al., 2011).

$$\frac{P_g}{P} = 0,19 N_{rot}^{-0,28} N_{Fr}^{0,127} \left( \frac{W_i}{D_i} \right)^{0,18} \left( \frac{D_i}{D_t} \right)^{-0,65} \quad (2.5)$$

Sendo:

- $N_A$  número de aeração (-);  
 $N_{Fr}$  número de Froude (-)  $N_{Fr} = \frac{N^2 D_i}{g}$ .

Abardi (1988) apresentou a Equação 2.6 para sistemas contendo dois impelidores do tipo Rushton operando com frequência de agitação entre 180 e 960 rpm e velocidade superficial do gás de 0,42 a 1,67  $cm.s^{-1}$ .

$$P_g = 1,224 \left( \frac{P_i^2 N_{rot} D_i^3}{Q^{0,56}} \right)^{0,432} \quad (2.6)$$

### 2.5.1 Tempo de mistura

De maneira geral, o tempo de mistura é definido como o tempo requerido para atingir um certo grau de homogeneização de um determinado marcador inserido no meio (como um corante ou uma solução salina) (ASCANIO, 2015). A modelagem matemática da mistura de fluidos é geralmente realizada considerando-se compartimentos de mistura dentro do próprio reator. A quantidade de compartimentos a ser considerada depende da aplicação e da configuração do sistema. Em reatores que possuem mais de um impelidor, é comum se considerar uma câmara de mistura por impelidor (BADER, 1987; MANFREDINI et al., 1983; OOSTERHUIS, KOSSEN, 1984). No interior de cada câmara é formada uma zona de circulação de fluido onde há troca de massa com a câmara adjacente (JAHODA, MACHOŇ, 1994).

Para sistemas aerados contendo dois impelidores turbina do tipo Rushton, a Equação (2.7) pode ser empregada na determinação do tempo de mistura para 95% de homogeneização (VASCONCELOS et al., 2000).

$$t_{0,95} = 150 \left( \frac{P_g}{V_l} \right)^{-0,27} \quad (2.7)$$

Sendo:

- $t_{0,95}$  tempo para atingir 95% de mistura (s);
- $P_g$  potência transferida ao meio aerado (W);
- $V_l$  volume de líquido ( $m^3$ ).

### 2.5.2 Transferência de oxigênio

Em bioprocessos aeróbios, oxigênio é utilizado pelo microrganismo como acceptor final de elétrons na cadeia respiratória, de modo a gerar energia para seu crescimento e multiplicação, manutenção celular e em outras rotas metabólicas, incluindo a síntese de produtos. Devido à sua baixa solubilidade em meios aquosos ( $7,6 \text{ mg L}^{-1}$  em água a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ), como em meios de cultura, oxigênio deve ser continuamente suprido e, desse modo, a velocidade de transferência da fase gasosa para a fase líquida,  $n_{O_2}$ , deve ser estudada (GARCIA-OCHOA, GOMEZ, 2009; SINCLAIR, RYDER, 1975). Em cultivos sob alta concentração celular, oxigênio frequentemente se torna um fator limitante no crescimento. Uma alternativa é o enriquecimento

do ar introduzido em oxigênio. Em contrapartida, tal medida resulta na elevação dos custos de produção.

Na literatura a velocidade de transferência de oxigênio é usualmente descrita conforme apresentado na Equação 2.8 (GARCIA-OCHOA, GOMEZ, 2009).

$$n_{O_2} = k_L a (C_s - C) \quad (2.8)$$

Sendo:

- $n_{O_2}$  velocidade de transferência de oxigênio ( $mg_{O_2} L^{-1} s^{-1}$ );
- $k_L a$  coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $s^{-1}$ );
- $C_s$  concentração de oxigênio dissolvido na saturação ( $mg L^{-1}$ );
- $C$  concentração de oxigênio dissolvido num dado instante  $t$  ( $mg L^{-1}$ ).

O termo  $k_L a$  é o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio e quantifica a capacidade de transferência de oxigênio do sistema. Enquanto  $(C_s - C)$  é a diferença de concentração entre as fases gasosa e líquida (OOSTERHUIS, KOSSEN, 1984).

Diferentes correlações são encontradas na literatura para a determinação do  $k_L a$  (GOGATE; BEENACKERS, PANDIT, 2000; SCHAEPE et al., 2013). A correlação baseada na teoria da turbulência isotrópica é a mais frequente, a qual é apresentada na Equação 2.9 (COOPER; FERNSTROM, MILLER, 1944).

$$k_L a = c \left( \frac{P_g}{V_l} \right)^\alpha (v_s)^\beta \quad (2.9)$$

Sendo:

- $k_L a$  coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $s$ );
- $c$  constante de proporcionalidade (-);
- $P_g$  potência dissipada sob condições de aeração ( $W$ );
- $V_l$  volume de líquido ( $m^3$ );
- $v_s$  velocidade superficial do gás ( $m s^{-1}$ ).

Os valores de  $c$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  são atribuídos às diferenças nas configurações do impelidor e condições de operação, bem como à composição e propriedades físico-químicas do meio (SRIVASTAVA; MISHRA, SURESH, 2011).

Dessa maneira, a escolha da correlação utilizada para a estimativa do  $k_L a$  deve considerar similitudes nas condições operacionais, bem como as variações físico-químicas do meio de cultivo ao longo do processo devem estar restritas ao intervalo de validade da equação (SCHAEPE et al., 2013).

Vasconcelos et al. (2000) encontraram os valores 0,0083, 0,62 e 0,49 para os parâmetros  $c$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente, enquanto que Schaepe et al. (2013) no cultivo de *E. coli* modificada em biorreator de 15 L, ajustaram a correlação padrão (Equação 2.9) aos dados experimentais, encontrando os valores de  $c$  : 1.027;  $\alpha$  : 0,74 e  $\beta$  : 0,31 ( $V_L$  em L e  $k_L a$  em  $h^{-1}$ ). Classificando os dados presentes na literatura para soluções eletrolíticas, Van't Riet (1979) encontrou os valores 0,002; 0,7; 0,36 para coeficientes citados ( $2 < V_L < 4.400$  L,  $v_s < 0,005$  m s<sup>-1</sup> e  $500 < \frac{P}{V_L} < 10.000$  W m<sup>-3</sup>).

Dado que a formação de espuma é muito frequente em bioprocessos, o uso de agentes antiespumantes é empregado para controlar esse comportamento. Antiespumantes agem alterando a tensão superficial do meio, aumentando a coalescência da fase gás que, por sua vez, influencia a fração volumétrica de gás e, portanto, o  $k_L a$  (GOGATE; BEENACKERS, PANDIT, 2000). Kawase e Moo-Young (1990) quantificaram essa influência, observando a redução de 33% no valor do  $k_L a$  quando se adiciona anti-espumante no meio até atingir a concentração de 0,002%. Desse modo, recomenda-se minimizar a adição destes agentes (SRIVASTAVA; MISHRA, SURESH, 2011).

As células podem afetar a velocidade de transferência de oxigênio por três mecanismos: a) consumo de oxigênio na interface gás-líquido; b) presença como uma partícula sólida e c) modificação do meio devido ao metabolismo celular (JU, SUNDARARAJAN, 1995).

Conforme mencionado anteriormente, as propriedades físico-químicas do meio de cultura são constantemente alteradas devido aos produtos excretados pelas células. Essas alterações se devem, principalmente, à excreção de metabólitos celulares e consumo dos sais minerais presentes no meio. A adição de sais modifica a força iônica do sistema causando redução no tamanho das bolhas e favorecendo a transferência de oxigênio para a fase líquida. Logo, seu consumo prejudicaria tal transferência (ROBINSON, WILKE, 1974). Para situações onde não há influência da viabilidade celular, ou seja, a célula age como uma partícula sólida, Andrews et al. (1984)



propuseram que o arrasto hidrodinâmico gerado pelas células aderidas às bolhas faz com que a interface se mova. Além disso, mostraram que a interface em movimento apresenta uma eficiência de adesão celular maior que a interface estacionária, acumulando mais células, levando ao aumento da adesão celular e assim por diante. Este fenômeno leva ao aumento do coeficiente de transporte na película líquida ( $k_L$ ), favorecendo a transferência de oxigênio. Por outro lado, as células acumuladas na interface podem retardar o transporte de oxigênio para a fase líquida devido ao impedimento estérico causado pela camada celular (JU, SUNDARARAJAN, 1995).

Quando o transporte do substrato até o sítio intracelular onde será consumido é consideravelmente mais rápido que a velocidade das reações, a velocidade global de consumo deste substrato é governada apenas pela cinética das reações. Entretanto, quando a velocidade de transporte é menor, esta pode sofrer influência das reações bioquímicas. No caso de biorreatores, o oxigênio pode ser consumido enquanto se difunde ao longo do filme de líquido estagnado ao redor da bolha de gás, provocando um aumento na força motriz e, conseqüentemente, aumentando a velocidade de transferência (GARCIA-OCHOA, GOMEZ, 2005; TSAO, 1969). Neste sentido, em um estudo envolvendo a produção de goma xantana, foi observado um incremento substancial na transferência de oxigênio causado pela elevada velocidade específica de consumo de oxigênio pelos microrganismos (GARCIA-OCHOA, GOMEZ, 2005).

Ju e Sundararajan (1995) avaliaram cada uma das proposições citadas acima no cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em reator aerado e agitado por impelidor magnético. Os autores concluíram que a presença das células favorecia a transferência de oxigênio, sendo as alterações no meio causadas pela excreção de metabólitos celulares o fator que mais influenciou positivamente neste resultado. É ressaltado que as contribuições quantitativas de cada mecanismo devem variar em diferentes sistemas, mas a intensificação da transferência de oxigênio causada pela respiração celular deve perdurar em outros cultivos biológicos.

## 2.6 Análise de sensibilidade

Saltelli (2004) define análise de sensibilidade (AS) como sendo um método de quantificar quanto das incertezas de um modelo são provenientes das incertezas de seus parâmetros. Estas grandezas de entrada podem não ser conhecidas com determinado grau de certeza devido a variações naturais, erro na quantificação ou simplesmente falta de técnica de medida. Por meio da AS é possível identificar os fatores mais importantes na determinação do comportamento de um modelo. Os métodos de realização de AS podem ser classificados em dois grupos: local e global. Os métodos de AS local variam uma única grandeza por vez, enquanto os outros parâmetros são mantidos constantes. A vantagem desses métodos é o baixo poder computacional requerido, entretanto, só podem ser empregados em modelos em que os parâmetros de entrada produzam respostas (*outputs*) lineares. Já na AS global, ocorre a variação simultânea de todos os parâmetros, sendo a mais adequada para sistemas biológicos (SUMMER, 2010).

O comportamento do modelo pode ser explorado pela discretização dos parâmetros de entrada em diferentes níveis. Esta amostragem pode ser realizada de forma aleatória ou quase-aleatória dentro de uma distribuição de probabilidade atribuída para cada parâmetro. Distintas técnicas de amostragem são encontradas na literatura, sendo as mais comuns: método de Monte-Carlo, *Latin hypercube* (LHS) e método de Sobol (MARINO et al., 2008; PLISCHKE; BORGONOVO, SMITH, 2013). Para mapear o comportamento do modelo, um número de amostra na ordem de milhares é necessário.

No método LHS, a distribuição de probabilidade é estratificada em intervalos iguais e a amostragem é realizada a partir de cada intervalo. Dessa maneira, é possível recriar uma distribuição de probabilidade utilizando menos amostras que no Monte Carlo, mantendo a mesma precisão.

Havendo criado a amostragem dos parâmetros de entrada, o modelo é executado  $n$  vezes ( $n$  sendo proporcional à quantidade de variáveis do modelo,  $k$ ) gerando os dados de saída. Não existe uma maneira quantitativa de se determinar  $n$ , todavia, recomenda-se  $n > 10k$  para um bom valor de significância do resultado (BLOWER, DOWLATABADI, 1994).

Este conjunto de dados pode ser explorado de diversas maneiras

para determinar a sensibilidade do modelo. As técnicas de AS global empregadas dependem do tipo de modelo matemático a ser analisado e , principalmente, da relação entre os parâmetros de entrada e as grandezas de saída. Para tendências lineares, pode-se empregar o coeficiente de correlação de Pearson. Já para modelos não-lineares, mas monotônicos, recomenda-se técnicas baseadas em *rankings*, como o coeficiente de correlação de Spearman e o coeficiente de correlação parcial de postos (PRCC). Para modelos não-monotônicos e não-lineares, métodos que utilizam a decomposição da variância da grandeza de saída, como o teste de sensibilidade de amplitude de Fourier (FAST) e sua variação, eFAST, ou Sobol, são adequados (SALTELLI, 2004; MARINO et al., 2008; CANNAVÓ, 2012)

O coeficiente de correlação de Pearson é determinado a partir da Equação 2.10 e assume qualquer valor no intervalo  $[-1, 1]$ , sendo que os extremos demonstram uma boa correlação e o valor 0 indica que não há correlação entre as grandezas.

$$r_{x_j y} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_{ji} - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_{ji}^2 - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i^2 - \bar{y})^2}} \quad (2.10)$$

Sendo:

- $r_{x_j y}$       coeficiente de Pearson;
- $n$             número de execuções do modelo (amostra);
- $x_j$           grandeza de entrada do modelo ( $j=1,2,\dots,k$ );
- $y$             grandeza de saída do modelo;
- $\bar{x}$  e  $\bar{y}$       média aritmética de  $x$  e  $y$ , respectivamente.

Já o coeficiente de correlação parcial mede a sensibilidade da grandeza de saída a um dado parâmetro de entrada quando os efeitos dos demais são cancelados (HELTON, DAVIS, 2002). Sua determinação se dá pela Equação 2.10, porém substituindo  $x$  e  $y$  pelos residuais  $(x_j - \hat{x}_j)$  e  $(y - \hat{y})$ , onde  $\hat{x}_j$  e  $\hat{y}$  são as regressões lineares apresentadas nas Equações 2.11 e 2.12.

$$\hat{x}_j = c_0 + \sum_{p=1; p \neq j}^k c_p x_p \quad (2.11)$$

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{p=1; p \neq j}^k b_p x_p \quad (2.12)$$

Sendo:

$c_0$  e  $b_0$  coeficientes lineares das regressões lineares

$c_p$  e  $b_p$  coeficientes angulares das regressões lineares

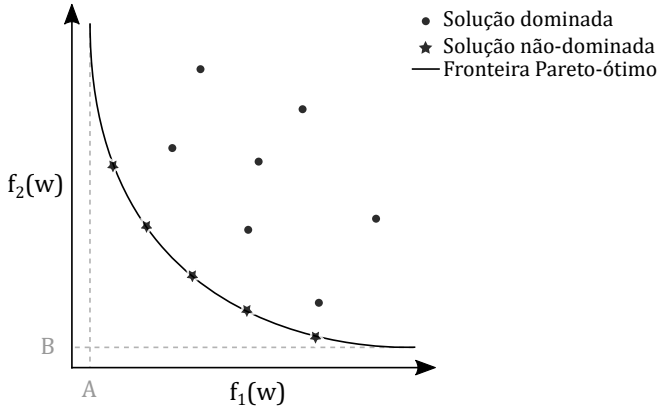
Se as grandezas  $x$  e  $y$  forem transformadas em postos, ou seja, o menor valor assume valor numérico 1, o segundo menor valor, 2, e assim sucessivamente,  $r_{x,y}$  passa a ser chamado de coeficiente de correlação parcial de postos. PRCC é uma medida de sensibilidade para modelos não-lineares e com relacionamento monotônico entre as grandezas de entrada e de saída (MARINO et al., 2008).

## 2.7 Otimização de problemas

O processo de otimização busca encontrar o valor ótimo ou a melhor solução de um dado problema e, em geral, envolve a busca por máximos e mínimos da chamada função objetivo. Problemas que possuem mais de um objetivo são denominados de problemas de otimização multiobjetivo. Contrariamente à otimização monoobjetivo, em que o resultado é uma única solução, problemas multiobjetivo geralmente apresentam um conjunto de soluções. Quando as soluções não são as ótimas para nenhum objetivo proposto, estas são chamadas de soluções dominadas. Já quando a solução ótima para um dado objetivo não é a ótima para outro, os objetivos são ditos conflitantes, ou seja, a melhora de um acarreta na deterioração dos demais. Assim, quando todos os objetivos são considerados simultaneamente, o conjunto de soluções ótimas encontrado no espaço de busca é chamado de *Pareto-ótimo* e as soluções são ditas não-dominadas. As soluções localizadas na fronteira Pareto-ótimo não são melhores nem piores entre si, sendo necessário um critério de decisão para escolha da solução mais adequada ao problema. Um esquema ilustrativo das possíveis soluções

em um problema genérico de otimização de dois objetivos (minimização simultânea de  $f_1(w)$  e  $f_2(w)$ ) é apresentado na Figura 2.5. O menor valor possível para  $f_1(w)$  é indicado por A e, da mesma maneira para  $f_2(w)$ , B.

Figura 2.5: Pareto-ótimo em um problema com dois objetivos.



Fonte: autor (2019).

Problemas reais, no entanto, não apresentam comportamento suave e nem são bem delimitados como no exemplo apresentado. As dificuldades em problemas multiobjetivos incluem descontinuidades, imposição de restrições, múltiplas fronteiras (mínimos locais *versus* globais) e uniformidade das soluções. Logo, a correta determinação do conjunto de soluções não-dominadas é de grande importância no entendimento do comprometimento entre os objetivos e, portanto, o comportamento do problema (GEN; CHENG, LIN, 2010).

Cada metodologia de otimização possui seus próprios mecanismos de exploração do espaço de busca, os quais são dependentes das condições iniciais e dos parâmetros de controle. As condições iniciais podem ser os valores iniciais das grandezas e limites do domínio de busca. Já os parâmetros de controle abrangem a direção de busca e o número de iterações. Os métodos de otimização podem ser determinísticos ou estocásticos. O primeiro abrange métodos que se fundamentam no gradiente da função a ser minimizada. No entanto, o estado-da-arte em otimização multiobjetivo

são os métodos estocásticos, tais como algoritmos genéticos, que empregam busca por populações (COELLO; LAMONT, VAN VELDHUIZEN, 2007). Ainda assim, métodos determinísticos são amplamente utilizados.

Os métodos determinísticos do tipo busca direta se baseiam na avaliação sequencial do valor da função objetivo, sem empregar suas derivadas. Assim, a partir da comparação entre a tentativa atual de solução e o melhor valor já obtido, a próxima solução de valores é determinada. O tipo de avaliação realizada define os diferentes métodos de busca direta. O método denominado busca padronizada (*Pattern Search*) é caracterizado pela exploração da função objetivo numa malha de pontos pré-definida (CUSTÓDIO et al., 2011). Esta exploração visa conhecer o comportamento da malha da função objetivo ao redor do ponto atual antes de definir o próximo ponto de análise. Ao mesmo tempo que este novo ponto é definido, as informações associadas à malha, como dimensão e tamanho do passo, são atualizadas. Um problema de otimização multiobjetivo por busca padronizada pode ser representado na forma (CUSTÓDIO et al., 2011):

$$\min_{w \in \Omega} F(w) = (f_1(w), f_2(w), \dots, f_m(w))^T; \quad f_u: \mathbb{R}^k \rightarrow \mathbb{R}$$

$$\Omega = \{w \in \mathbb{R}^k : I \leq w \leq S\}; \quad I, S \in \mathbb{R}^k$$

Sendo:

- F conjunto de funções objetivo;
- $f_u$  função objetivo, sendo  $m$  a quantidade de objetivos;
- $w$  variáveis de decisão (vetor  $k$ -dimensional contendo grandezas a serem otimizadas);
- $k$  quantidade de grandezas de entrada;
- $T$  indica a transposição do vetor coluna a vetor linha;
- $\Omega$  universo de valores contendo todos os possíveis  $w$  que podem ser usados para satisfazer a avaliação de  $F(w)$ ;
- $I$  e  $S$  vetor contendo os menores e maiores valores aceitáveis para  $w$ , respectivamente.

## 2.8 Avaliação da precisão

Existem metodologias distintas para avaliação quantitativa de um modelo matemático, dentre as quais o erro quadrático médio (MSE, Equação 2.13) é a mais utilizada (WALLACH et al., 2019). Como o MSE é a média do erro ao quadrado, pontos em que as diferenças entre o valor previsto e medido são grandes implicam no aumento significativo de MSE. Neste caso, o emprego do RMSE, ou seja, a raiz quadrada de MSE, é mais apropriada. Contudo, a unidade do RMSE é a mesma do valor medido, ou seja, sua unidade se altera de acordo com o que está sendo avaliado e, portanto, não é útil para comparações entre erros de diferentes conjuntos de dados. Assim, uma medida de avaliação adimensional, como o rRMSE, é mais adequada, a qual é definida pela Equação 2.14.

$$\text{MSE} = (1/n) \sum_{i=1}^n (y_i^* - y_i)^2 \quad (2.13)$$

$$\text{rRMSE} = \frac{\sqrt{\text{MSE}}}{\bar{y}^*} \quad (2.14)$$

Sendo:

- MSE erro quadrático médio;
- n número de medidas experimentais;
- $y_i^*$  valor experimental;
- $y_i$  valor previsto;
- $\bar{y}^*$  média dos valores experimentais.

## 2.9 Considerações finais

Tendo em vista as considerações anteriores, poli-hidroxibutirato é uma alternativa promissora aos plásticos de origem petroquímica. Sua produção a partir de fontes de carbono de baixo custo, como resíduos industriais e, em especial, glicerol, visa tornar este biopolímero economicamente competitivo. Neste sentido, outras ferramentas de grande importância são: o emprego de microrganismos geneticamente modificados e a avaliação matemática do processo produtivo. Por meio destes recursos, deve-se buscar aumentar a velocidade de crescimento da cepa e a atingir alta produtividade em PHB.

## Capítulo 3

# Material e Métodos

Os cultivos foram realizados em microplaca, agitador orbital e reator agitado e aerado empregando cultura pura de microrganismo. As estratégias de operação foram batelada simples e alimentada. O microrganismo utilizado nos cultivos foi a bactéria heterotrófica *Cupriavidus necator* glpFK, exceto nos cultivos iniciais, em que a cepa *C. necator* DSM 545 foi empregada. O microrganismo foi mantido congelado em caldo nutriente (Difco) (contendo  $5,0 \text{ g L}^{-1}$  de peptona de carne e  $3,0 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de carne) e glicerol (1 : 1 v/v) a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . O estoque de cepa congelada era refeito a cada 3 meses.

Todos os experimentos foram realizados a partir de dois pré-cultivos. No primeiro, a reativação da cepa congelada foi realizada utilizando caldo nutriente. Já o segundo pré-cultivo foi realizado utilizando a cultura em caldo nutriente como inóculo (10% v/v) e o meio mineral descrito por Aragão (1996) com modificações. A composição do meio mineral utilizado é mostrada na Tabela 3.1.

A composição da solução de elementos traço foi (em  $\text{g.L}^{-1}$ ):  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,3;  $\text{CoCl}_2$  0,2;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,1;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  0,03;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0,03;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0,02 e  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  0,01.

Glicerol puro (pureza > 99,7%, Neon Comercial Ltda) foi utilizado como fonte de carbono em todos os experimentos e as concentrações iniciais utilizadas foram diferentes para cada experimento.



Tabela 3.1: Composição do meio mineral.

Componente	Concentração no meio (g L <sup>-1</sup> )
Ácido nitriloacético (NTA)	0,19
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,50
Citrato de amônio e ferro III	0,06
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,01
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00
Elementos traço (mL L <sup>-1</sup> )	1,00

Fonte: autor (2019)

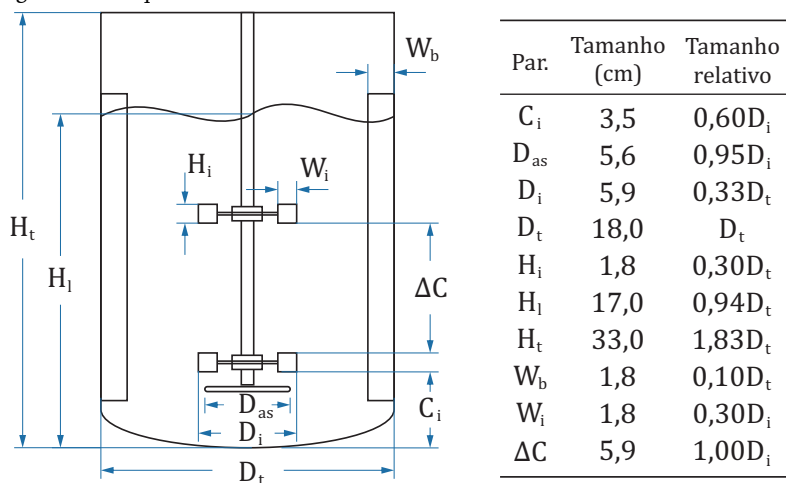
O primeiro pré-cultivo foi realizado em frascos erlenmeyer aletados de 500 mL, contendo 150 mL de caldo nutriente. O segundo, em frascos erlenmeyer aletados de 1.000 mL, contendo 400 mL de meio mineral, ureia na concentração de 2,6 g.L<sup>-1</sup> (correspondente a 1,2 g.L<sup>-1</sup> de nitrogênio). Ambos foram incubados em agitador orbital, mantidos a 30 ou 35 °C (dependendo do que foi estabelecido para cada experimento) e 150 rpm. Os pré-cultivos foram conduzidos em modo descontínuo até concentração celular total (biomassa mais conteúdo de PHB) tal que, quando inoculado no biorreator principal, a concentração celular inicial fosse de aproximadamente 0,26 ou 0,50 g.L<sup>-1</sup>. A quantificação da concentração de biomassa nos pré-cultivos foi baseada na leitura da absorbância a 600 nm (OD<sub>600</sub>) em correlação previamente estabelecida (Figura A.1, página 183).

Os cultivos em microplaca foram realizados em placas de 96 poços (Kasvi, K12-096) com 0,3 mL cada e 0,2 mL de meio mineral como meio de cultura. Foram preparados 50 mL de solução de meio mineral e inoculados com suspensão celular proveniente de pré-cultivo em caldo nutriente (7, 5% v/v). Os cultivos foram operados a 30 °C e incubados em espectrômetro leitor de placas modelo SpectraMax M5e (Molecular Devices). A concentração celular foi estimada a partir de sua relação com a absorbância e leituras automatizadas foram realizadas em cada poço com intervalo de 1 h ao longo de 24 h. A agitação neste dispositivo é padrão e sem definição de intensidade, sendo interrompida somente para leitura da densidade ótica.

O biorreator agitado e aerado empregado foi da marca New Brunswick,

modelo BioFlo 110 de 7,5 L de capacidade total, podendo operar com até 5 L de meio. As dimensões do tanque e de seus componentes são apresentadas na Figura 3.1. Este reator é encamisado, autoclavável e conta com dois impelidores do tipo Rushton de 6 pás planas. O aspensor de ar é de metal na forma de anel com perfurações de 1,0 mm de diâmetro na parte inferior e superior e é posicionado logo abaixo do impelidor inferior.

Figura 3.1: Esquema ilustrativo das dimensões do reator utilizado.

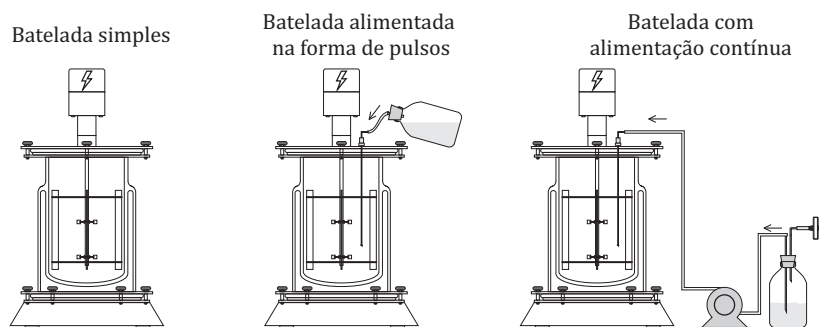


Fonte: autor (2019).

Nos cultivos em biorreator, a composição nutricional do meio mineral foi a mesma apresentada na Tabela 3.1 e as concentrações iniciais de nitrogênio e glicerol foram determinadas experimentalmente. O volume inicial de todos os cultivos foi de 4 L, o pH foi monitorado e ajustado ao longo do cultivo por meio de soluções de NaOH ( $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $1,25 \text{ mol.L}^{-1}$ ) em  $7,00 \pm 0,03$ . O biorreator era equipado com sistema de monitoramento e controle da frequência de agitação e temperatura. A concentração de oxigênio dissolvido foi constantemente monitorada por eletrodo polarográfico (Mettler-Toledo, modelo InPro 6800). As condições iniciais de agitação e aeração foram de 450 rpm e 0,05 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) respectivamente, sendo controladas manualmente ao longo do cultivo para que a concentração de oxigênio

dissolvido fosse superior a 30% da saturação com ar atmosférico. A síntese de PHB foi estimulada por meio da limitação da fonte de nitrogênio na presença da fonte de carbono. Definiu-se o período que consiste na presença de apenas  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de nitrogênio até o final do cultivo como fase de produção de PHB. Esse valor foi definido anteriormente pelo grupo de pesquisa como sendo a concentração limitante de nitrogênio para início da fase de produção. O restante do cultivo é denominado fase de crescimento celular. Os cultivos foram conduzidos na forma de batelada simples, batelada alimentada em glicerol na forma de pulsos e batelada alimentada (em nitrogênio e/ou glicerol) de forma contínua, como ilustra a Figura

Figura 3.2: Esquema ilustrativo dos modos de operação dos cultivos em biorreator.



Fonte: autor (2019).

Todos os cultivos foram realizados no LIEB - Laboratórios Integrados de Engenharia Biológica do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

No intuito de auxiliar no entendimento deste estudo, na Tabela 3.2 é apresentado um compêndio das atividades realizadas e seus objetivos.

Tabela 3.2: Síntese das atividades realizadas neste estudo.

Item	Condições	Objetivo
Cultivos em microplaca	$N_0: 1, 1 \text{ g L}^{-1}$ ; $S_0: 7 \text{ a } 59 \text{ g L}^{-1}$	Comparar $\mu_{X_{\max}}$ entre a cepa parental e a modificada em diferentes $S_0$ .
Cultivos em microplaca	$S_0: 19 \text{ g L}^{-1}$ ; $N_0: 0, 5 \text{ a } 3, 2 \text{ g L}^{-1}$	Comparar $\mu_{X_{\max}}$ entre a cepa parental e a modificada em diferentes $N_0$ .
Cultivos em agitador orbital	$N_0: 1, 2 \text{ g L}^{-1}$ ; $S_0: 25 \text{ a } 90 \text{ g L}^{-1}$	Avaliar $\mu_{X_{\max}}$ sob diferentes valores de $S_0$
Determinação da vel. crítica de dispersão	Vazão de aeração entre 0, 05 e 1 vvm em meio mineral	Verificar a qualidade da dispersão de gás no meio
Determinação de $C_s$	Meio mineral contendo glicerol e ureia a $35^\circ\text{C}$	Aumentar a precisão do cálculo da vel. de consumo de oxigênio
Modelagem matemática	-	Predizer o comportamento de cultivos em termos de concentração celular, PHB e consumo de substratos
Análise de sensibilidade	-	Avaliar a influência dos parâmetros do modelo sobre as grandezas de saída
Otimização de parâmetros	-	Aprimorar a capacidade preditiva do modelo desenvolvido
Maximização da produtividade	-	Utilizar ferramentas de otimização para propor um cultivo de máxima produtividade em PHB

sendo:  $N_0$ ,  $S_0$ ,  $C_s$  e  $\mu_{X_{\max}}$  a concentração inicial de nitrogênio, de glicerol, de saturação de oxigênio dissolvido e a velocidade específica de crescimento na fase exponencial, respectivamente.

Fonte: autor (2019).

Tabela 3.3: Continuação - Síntese das atividades experimentais realizadas neste estudo.

Cultivos em biorreator agitado e aerado						
Item	Operação Batelada	T (°C)	Condições			Objetivo
			N <sub>0</sub>	S <sub>0</sub>	Pulso	
A	simples	30	4,1	37,8	-	Avaliar a cinética de crescimento
B	simples	30	1,3	44,7	-	Avaliar a capacidade de acúmulo de PHB
C	alimentada	30	1,3	22,7	20	Verificar a influência da concentração inicial de glicerol em parâmetros cinéticos
D	alimentada	35	1,2	24,2	20	Avaliar alteração na temperatura de cultivo
E	alimentada	35	1,2	16,4	0,3	Avaliar a cinética de crescimento após adaptação em glicerol.
F	simples	35	1,9	25	-	Verificar manutenção no aumento de $\mu_{X_{rmax}}$ após congelamento da cepa
G	alimentada	35	1,1	20,1	20 + 25+15	Obter elevada concentração de PHB intracelular
H	alimentada	35	0,8	22,9	*	Avaliar efeito da alimentação contínua de nitrogênio
I	alimentada	35	2,0	18,4	*	Atingir elevada concentração celular e produtividade em PHB

\*alimentação de glicerol e nitrogênio de forma contínua. Sendo: T, N<sub>0</sub>, S<sub>0</sub> e "Pulso" a temperatura de cultivo, concentrações iniciais de nitrogênio e de glicerol e a adição de solução de glicerol na forma de pulso, respectivamente.

Fonte: autor (2019).

## **3.1 Determinações analíticas**

Amostras foram coletadas em intervalos regulares de aproximadamente 3 h. Em cada amostra, seis alíquotas de 2 mL foram retiradas do biorreator e transferidas para microtubos de plástico, sendo centrifugadas por 3 min a 12.100xg. Os sobrenadantes foram congelados a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  e os precipitados reservados.

### **3.1.1 Concentração de biomassa**

Além dos 12 mL coletados por ponto de amostra, retirou-se 1 mL adicional para determinação indireta da concentração celular por meio da aferição da absorbância do meio. Após diluição apropriada para que o valor da absorbância estivesse entre 0,200 e 0,700, a amostra foi introduzida no espectrofotômetro modelo SF325NM (Tecnal Equipamentos para Laboratório) e a leitura foi realizada a 600 nm. A curva de calibração utilizada que correlaciona o valor da absorbância lida com a concentração celular no meio determinada por gravimetria é apresentada na Figura A.1 (página 183). A concentração da biomassa foi determinada por análise gravimétrica, onde três dos seis tubos coletados contendo o precipitado foram lavados com 1 mL de água destilada, centrifugados novamente e colocados em estufa a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h. As amostras foram então colocadas em dessecador por 20 min e pesadas em balança analítica. A massa de biomassa foi dada pela média das diferenças de massa entre os tubos vazios e secos (previamente determinada) e dos mesmos tubos contendo biomassa seca. Relacionando-se o valor encontrado com o volume de amostra, tem-se a concentração celular.

### **3.1.2 Concentração de proteína celular**

A concentração de proteína celular foi determinada pelo método do biureto com modificações, apresentado em Aragao et al. (1996). O método se deu como segue: a) após ressuspensão com água destilada e centrifugação de um dos tubos contendo o precipitado por um total de quatro vezes, a biomassa foi ressuspensa em 5,5 mL de água destilada, adicionou-se 1,0 mL de NaOH (2,5 M) e incubou-se em banho-maria a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos; b) após resfriamento, 170  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuSO}_4$  1,57 M

foi introduzido e o conteúdo foi centrifugado por 5 min a 15.000xg; c) mediu-se a absorvância do sobrenadante a 560 nm. A curva padrão foi realizada a partir de soluções com concentrações conhecidas de albumina bovina (*Bovine Serum Albumine* – Sigma-Aldrich). Dado que a composição das proteínas celulares é diferente da composição da albumina bovina, uma correção considerando o número de ligações peptídicas por grama de proteína foi realizada (0,88 e 0,94 ligações.g<sup>-1</sup>) (ARAGAO et al., 1996; FRIEDLI, 1996).

### 3.1.3 Concentrações de glicerol e nitrogênio

Para a determinação tanto da concentração de glicerol, quanto da de nitrogênio, foram utilizados os sobrenadantes congelados a -18 °C. Além disso, ambas caracterizações empregaram métodos enzimático-colorimétricos. O kit Ureia ES (Gold Analisa) foi usado para o nitrogênio e o kit de análise de triglicerídeos (Labtest Diagnóstica) para a determinação da concentração de glicerol. Em cada uma das determinações se correlacionou o valor encontrado com ajustes lineares de amostras com concentração previamente conhecida (Figuras A.5a e A.5b, página 185).

### 3.1.4 Concentração de PHB

A amostra foi submetida à metanólise, análise a qual se emprega clorofórmio no tratamento da biomassa, seguido pela adição de metanol contendo 0,4 g L<sup>-1</sup> de ácido benzoico (padrão interno) e 276 g L<sup>-1</sup> de ácido sulfúrico. A amostra é submetida a banho a 100 °C por 140 min e separação de fases com água destilada, conforme descrito por Brandl et al. (1988). A quantificação foi determinada por cromatografia gasosa em coluna capilar com sílica fundida Rtx®-Wax (Crossbond® polietileno glicol – 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O cromatógrafo empregado foi do modelo GC-14B, Shimadzu, equipado com detector de ionização de chama (FID ar-hidrogênio) utilizando nitrogênio como gás de arraste. As condições de operação foram: vazão do gás de arraste de 40 mL min<sup>-1</sup>; temperatura do injetor de 250 °C; temperatura da coluna variando de 60 a 141 °C e temperatura do detector de 300 °C. Os valores obtidos foram relacionados com a curva de calibração construída a partir da concentração

de amostras de PHB PA (Sigma-Aldrich) de massa conhecida submetidas às mesmas condições do ensaio e seus respectivos valores de área. O ajuste do modelo linear utilizado para construção da curva de calibração se encontra na Figura A.4a (página 185).

De forma alternativa, foi utilizada cromatografia líquida (HPLC) na quantificação de PHB. Às amostras de biomassa (precipitado da centrifugação) foram adicionados 2 mL de ácido sulfúrico PA seguido por banho a 98 °C por 30 minutos visando formar ácido crotônico, conforme metodologia proposta em Karr, Waters e Emerich (1983). As amostras eram então diluídas com uma solução de ácido sulfúrico 5 mM (0,49 g L<sup>-1</sup>). O fracionamento da solução diluída foi realizado em coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H a 60 °C e 0,7 mL min<sup>-1</sup> e o ácido crotônico foi identificado a 210 nm. O equipamento utilizado na análise era da marca Perkin Elmer modelo 200. Os valores de área obtidos foram relacionados com os de amostras de PHB PA (Sigma-Aldrich) de concentração conhecida. A curva de calibração utilizada é apresentada na Figura A.4b (página 185).

### **3.2 Extração e caracterização do polímero produzido**

O PHB produzido no cultivo D foi extraído pelo método proposto por Quines (2015), como segue:

1. aquecimento da biomassa 95 °C por 45 min;
2. centrifugação a 2.000xg por 15 min, lavagem com água destilada e repetição da centrifugação;
3. secagem do precipitado a 65 °C por 24 h;
4. solubilização do PHB utilizando carbonato de propileno a 150 °C na proporção 6,66 mL de solvente por grama de célula em rotaevaporador por 45 min;
5. filtração a vácuo com filtro com tamanho de poro de 14 µm ;
6. lavagem do retido no filtro com carbonato de propileno a 150 °C;



7. repouso do permeado por 30 min;
8. adição de água ao permeado na proporção 4 : 1 (água:solvente) a temperatura ambiente;
9. agitação constante por 30 minutos;
10. filtração a vácuo com filtro com tamanho de poro de 14  $\mu\text{m}$  ;
11. lavagem do retido no filtro (PHB) com água destilada;
12. secagem do filtro contendo PHB extraído a 65 °C por 24 h.

O biopolímero extraído foi submetido às seguintes análises na Central de Análises do EQA-UFSC:

a) **Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**. Para tal, o equipamento modelo Cary série 600 (Agilent Technologies) foi utilizado no intervalo de 4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  pela técnica da refletância difusa.

b) **Análise termogravimétrica (TGA)**. A análise foi realizada no equipamento modelo STA 449 F3 Jupiter (Netzsch) em uma faixa de temperatura de 23 a 790 °C com razão de aquecimento de 10 °C  $\text{min}^{-1}$  sob atmosfera de nitrogênio.

c) **Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**. Amostras de biopolímero foram colocadas em cápsulas de alumínio e analisadas no equipamento de modelo Jade-DSC (Perkin Elmer) sob atmosfera de nitrogênio (50  $\text{ml min}^{-1}$ ). O sistema foi aquecido de -30 a 200 °C, a 40 °C  $\text{min}^{-1}$  e, em seguida, resfriado a -30 °C. Uma nova corrida de aquecimento foi realizada no mesmo intervalo de temperatura, porém com velocidade de aquecimento de 10 °C  $\text{min}^{-1}$ .

O grau de cristalinidade ( $X_c$ ) foi determinado por meio da Equação 3.1

$$X_c = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_m^0} * 100 \quad (3.1)$$

Sendo:

$X_c$  grau de cristalinidade (%);

$\Delta H_m$  entalpia de fusão da amostra ( $\text{J g}^{-1}$ );

$\Delta H_c$  entalpia de cristalização sob resfriamento da amostra ( $\text{J g}^{-1}$ );

$\Delta H_m^0$  entalpia de fusão do PHB 100% cristalino ( $\text{J g}^{-1}$ ) (146  $\text{J g}^{-1}$  de Inoue e Yoshie (1992).

### 3.3 Determinação de parâmetros cinéticos

A determinação do parâmetro  $K_{x_s}$  da equação de Monod (Equação 3.2) foi realizada a partir da linearização de Eadie-Hofstee e ajuste aos dados experimentais, conforme apresentado na equação 3.3.

$$\mu_{X_r} = \mu_{X_r \text{MAX}} \frac{S}{(K_{x_s} + S)} \quad (3.2)$$

$$\mu_{X_r} = -K_{x_s} \frac{\mu_{X_r}}{S} + \mu_{X_r \text{MAX}} \quad (3.3)$$

$$y = ax + b \quad \begin{cases} y = \mu_{X_r} \\ a = -K_{x_s} \\ x = \frac{\mu_{X_r}}{S} \\ b = \mu_{X_r \text{MAX}} \end{cases}$$

Traçando os valores experimentais de  $\mu_{X_r}$  em função de  $\frac{\mu_{X_r}}{S}$  foi possível determinar a máxima velocidade específica de crescimento celular como o valor da interceptação da reta no eixo  $y$  e  $-K_{x_s}$  por meio do coeficiente angular da reta.

O mesmo procedimento foi realizado na avaliação da variação da velocidade específica de crescimento celular em função da concentração de nitrogênio e velocidade específica de produção de PHB em função da concentração de substrato, calculando  $K_{x_n}$  e  $K_{p_s}$ , respectivamente.

### 3.4 Tratamento dos dados

Definiu-se como biomassa total ( $X_t$ ) a concentração de biomassa contendo PHB intracelular, sendo quantificada pelo método gravimétrico.  $P$  é a concentração de biopolímero intracelular, determinada por cromatografia líquida ou gasosa. A partir dessas informações, foi possível determinar a concentração de biomassa residual ( $X_r$ ), ou seja, a concentração celular excluindo-se o conteúdo de PHB, conforme Equação 3.4.

$$X_r = X_t - P \quad (3.4)$$

Para sistemas operando em batelada alimentada, é necessário considerar o efeito da diluição causado pela alimentação de substrato e soluções de ácido e base, assim como da retirada de amostra, as quais não modificam a concentração, mas sim o volume total de líquido. Essa variação de volume afeta a concentração dos componentes e causa divergência na determinação dos parâmetros cinéticos do cultivo. A correlação 3.5 foi utilizada na correção da concentração de biomassa total, PHB, glicose e nitrogênio unicamente para a determinação das seguintes grandezas:

- $\mu_{X_{Tmax}}$  - velocidade específica máxima de crescimento;
- $\mu_p$  - velocidade específica de produção de PHB;
- $Y_{X/S}$  - fator de conversão de glicerol em biomassa residual;
- $Y_{X/N}$  - fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual;
- $Y_{P/S}$  - fator de conversão de glicerol em PHB;
- Prod - produtividade em PHB.

$$\theta'_i = \theta_i \prod_{j=0}^i \frac{V_{j-1} + V_{ad,j}}{V_{j-1}} \quad (3.5)$$

Sendo:

- $\theta'_i$  concentração (celular, de produto ou de substratos) corrigida no tempo de coleta  $i$  ( $g L^{-1}$ );
- $\theta_i$  concentração (celular, de produto ou de substratos) no tempo de coleta  $i$  ( $g L^{-1}$ );
- $V$  volume de meio (L);
- $V_{ad}$  volume adicionado (ácido, base e substrato) entre o tempo de coleta  $(i - 1)$  e  $i$  (L).

Detalhes a respeito da Equação 3.5 e do efeito de diluição do meio nos parâmetros operacionais é dado no Apêndice C (página 195).

### 3.4.1 Velocidade específica de crescimento celular e produção de PHB

Assumindo o modelo malthusiano de crescimento populacional e considerando a mesma probabilidade de divisão celular para todas as células, tem-se que o crescimento celular se dá em função da população existente e de uma velocidade específica de crescimento,  $\mu_{X_r}$ , conforme Equação 3.6. Integrando de  $t_1$  a  $t_2$  e rearranjando a Equação 3.6, foi possível obter a Equação 3.7, que permite a determinação de  $\mu_{X_r}$  em qualquer intervalo ao longo do cultivo a partir dos dados experimentais da concentração de biomassa residual.

$$\frac{dX_r}{dt} = \mu_{X_r} X_r \quad (3.6)$$

$$\mu_{X_r} = \frac{\ln\left(\frac{X_{r2}}{X_{r1}}\right)}{(t_2 - t_1)} \quad (3.7)$$

Sendo:

- $\mu_{X_r}$  velocidade específica de crescimento celular ( $h^{-1}$ );
- $X_{r1}$  concentração de biomassa residual no instante  $t_1$  ( $g L^{-1}$ );
- $X_{r2}$  concentração de biomassa residual no instante  $t_2$  ( $g L^{-1}$ ).

O período de crescimento exponencial em condições ótimas para cada cultivo foi definido pela maximização tanto da duração desta fase quanto do valor  $\mu_{X_r}$ , mantendo-se um elevado coeficiente de correlação ( $R^2$ ). Se o intervalo de tempo utilizado na Equação 3.7 for correspondente à esta fase exponencial de crescimento,  $\mu_{X_r}$  será máximo, ou seja,  $\mu_{X_r, \max}$ .

A velocidade específica de produção de PHB ( $\mu_P$ ) foi determinada pela Equação 3.8.

$$\mu_P = \frac{1}{X_r} \frac{dP}{dt} \quad (3.8)$$

Sendo:

- $\mu_P$  velocidade específica de produção de PHB ( $g_P g_{X_r}^{-1} h^{-1}$ );
- P concentração de PHB ( $g L^{-1}$ ).

### 3.4.2 Fatores de conversão

Os fatores de conversão de substrato em célula durante a fase de crescimento ( $Y_{X/S}$ ,  $Y_{X/N}$ ) e de substrato em PHB ( $Y_{P/S}$ ) foram determinados para cada cultivo a partir do coeficiente angular da reta obtida relacionando-se a biomassa residual ou a massa de produto com o consumo de substrato (glicerol ou nitrogênio) em função do tempo. O ajuste linear é apresentado no Apêndice B (página 187).

### 3.4.3 Produtividade em PHB

A produtividade em biopolímero ( $g_P L^{-1} h^{-1}$ ) foi determinada pela Equação 3.9. A produtividade pode, também, ser entendida como a velocidade média de produção de PHB.

$$\text{Prod} = \frac{P_t - P_{t_0}}{t} \quad (3.9)$$

Sendo:

- $P_t$  concentração de PHB no instante  $t$  ( $g L^{-1}$ );
- $P_{t_0}$  concentração de PHB no início do cultivo ( $g L^{-1}$ );
- $t$  instante no tempo (h).

### 3.4.4 Tempo de mistura

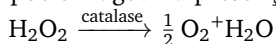
Uma vez que pretendeu-se operar alguns cultivos na forma de batelada alimentada, o tempo de mistura foi determinado a fim de conhecer a concentração exata de glicerol no meio após a adição de substrato, ou seja, quanto tempo deve ser esperado após a adição de substrato para coleta de amostra. Para tal, a Equação 2.7 (página 45) foi empregada.

### 3.4.5 Transferência de oxigênio

A frequência crítica de dispersão ( $N_{cr}$ ) foi determinada nas vazões de aeração entre 0,05 vvm e 1 vvm e em meio mineral contendo  $20 g L^{-1}$  de glicerol. A calibração da sonda de oxigênio dissolvido no ponto de 0% de saturação foi realizada à temperatura de cultivo por meio da exaustão do oxigênio em água destilada pela injeção de nitrogênio. Já a calibração em solução saturada de oxigênio foi feita no biorreator contendo solução

de todos os nutrientes necessários ao crescimento celular, operando em elevada velocidade de rotação (800 rpm) e aeração de (0,5 vvm).

A concentração de saturação de oxigênio a 35 °C em solução de meio mineral, contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicerol, 1,2 g L<sup>-1</sup> de nitrogênio e pH 7,0, foi realizada empregando peróxido de hidrogênio. Por meio da injeção de nitrogênio gasoso, o oxigênio foi esgotado em 500 mL de solução de meio mineral contida em erlenmeyer de duas bocas. Para evitar a transferência de oxigênio do *headspace* para o líquido, nitrogênio gasoso foi constantemente adicionado à superfície do líquido. A solução foi agitada por impelidor magnético e aquecida em chapa de aquecimento. Adicionou-se 0,1 ml de catalase (Catazymes 25L, Novozymes) e, em seguida, massas conhecidas de peróxido de hidrogênio (padronizado com permanganato de potássio) foram adicionadas logo que a porcentagem de saturação de oxigênio dissolvido lida se tornava constante. O peróxido em oxigênio se decompõe em água na presença de catalase conforme a reação:



Dessa maneira, foi possível traçar uma reta relacionando a massa de oxigênio presente com a fração de saturação lida pela sonda polarográfica e, assim, a concentração de oxigênio dissolvido a 100% de saturação foi determinada. O mesmo procedimento foi realizado para água destilada.

Tanto a velocidade de consumo de oxigênio ( $Q_{\text{O}_2} X_r$ ) quanto o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) foram determinados experimentalmente por meio da realização do método dinâmico, o qual consiste na interrupção momentânea do fornecimento de ar no biorreator (SCHMIDELL et al., 2001). Considerou-se que durante a realização do método o crescimento celular foi insignificante e, no intervalo em que a aeração permaneceu interrompida, não ocorreu transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida. Desse modo, a velocidade de consumo de oxigênio ( $Q_{\text{O}_2} X_r$ ) é igual à variação da concentração de oxigênio dissolvido ( $C$ ) (Equação 3.10), ou seja, o coeficiente angular da reta gerada pelos valores de  $C$  versus  $t$ , no intervalo onde não há aeração. No método dinâmico, supõe-se que não há crescimento celular no curto período entre a interrupção da aeração e o retorno de  $C$  aos valores anteriores ao início da execução do método ( $C^\infty$ ) após reativação da aeração. Desse modo, pode ser obtida uma equação não linear (Equação 3.11), onde seu ajuste

aos dados experimentais fornece  $k_L a$ .

$$\frac{dC}{dt} = Q_{O_2} X_r \quad (3.10)$$

$$C = C^\infty - (C^\infty - C_0) e^{-k_L a (t - t_1)} \quad (3.11)$$

Sendo:

- $C^\infty$  concentração de oxigênio dissolvido antes e depois da execução do método ( $\text{mg L}^{-1}$ );
- $C_0$  concentração de oxigênio dissolvido logo após reinício da aeração ( $\text{mg L}^{-1}$ );
- $t_1$  tempo logo após reinício da aeração (h).

Para os cultivos a 35 °C, o termo  $k_L a$  foi determinado levando-se em conta o tempo de resposta do eletrodo, ou seja, o tempo necessário para o oxigênio se difundir através da membrana da sonda. A constante de atraso do eletrodo,  $k_p$ , foi determinada por ensaio em degrau, onde a sonda é submergida em líquido sob borbulhamento de gás nitrogênio (até indicar 0% de saturação) e é imediatamente transferida para o líquido saturado em oxigênio e sob agitação. A Equação 3.12 foi empregada na determinação de  $k_L a$ .

$$C_p = C_{p0} e^{-k_p t} + C^\infty (1 - e^{-k_p t}) + \frac{k_p (C^\infty - C_{p0})}{k_p - k_L a} (e^{-k_p t} - e^{-k_L a t}) \quad (3.12)$$

Sendo:

- $C_{p0}$  sinal da sonda no instante  $t_2 = 0$  considerado para integração;
- $C^\infty$  concentração de  $O_2$  antes da interrupção da aeração.

O ajuste do modelo para obtenção de  $k_L a$  foi obtido por meio da minimização da soma do erro quadrático pelo método do gradiente reduzido generalizado (GRG) com múltiplos valores iniciais. Ambos os ajustes matemáticos para obtenção de  $Q_{O_2} X_r$  e  $k_L a$  foram realizados no *software* Excel (Microsoft, v. 2013).

As equações de determinação da transferência de potência ao meio sob aeração (Equações 2.4, 2.5 e 2.6) foram utilizadas para predição matemática dos valores de  $k_L a$  a partir dos dados experimentais deste estudo. Neste sentido, três conjuntos de coeficientes da equação que descreve  $k_L a$

(Equação 2.9) foram empregados, totalizando nove combinações avaliadas. Além destas, um novo conjunto de coeficientes para a Equação 2.9 (página 46) foi determinado a partir da minimização do RMSE entre o modelo e os dados experimentais de  $k_L a$ . Da mesma forma, três equações para transferência de potência foram avaliadas.

### **3.5 Previsão do comportamento cinético dos cultivos**

A organização de um cultivo, em termos de massa de glicerol e nitrogênio necessários para atingir uma determinada concentração celular, tempo de adição dos pulsos de glicerol, bem como a estimativa do tempo total de cultivo foi baseada em simulações simplificadas em planilha eletrônica. As simulações eram fundamentadas nos fatores de conversão ( $Y_{X/S}$ ,  $Y_{X/N}$  e  $Y_{P/S}$ ) e velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) encontrados na literatura ou de cultivos realizados anteriormente. As planilhas eram elaboradas previamente e atualizadas ao longo do cultivo, segundo os dados de densidade óptica das amostras coletadas. Este procedimento foi essencial no planejamento dos experimentos e predição dos momentos de adição de pulsos de substrato, assim como duração e vazão da alimentação em forma contínua de glicerol.

### **3.6 *Hardware e software utilizados***

As simulações e análises matemáticas feitas neste trabalho foram realizadas no Matlab (Mathworks, v. 2013b) e Excel (Microsoft, v. 2013). O código desenvolvido em Matlab se encontra no Anexo D (página 203). O computador utilizado possui 16 Gb de memória RAM DDR3 (800 MHz), processador Intel Core i7-3610QM operando a 3,10 GHz e SSD Samsung EVO 850.



### 3.7 Hipóteses

As seguintes hipóteses foram aplicadas na criação e um modelo matemático para previsão do crescimento celular e produção de PHB:

- todos os nutrientes estão em excesso, exceto as fontes de carbono e nitrogênio;
- o caldo é considerado uma mistura perfeita;
- oxigênio dissolvido não é um fator limitante;
- o volume perdido por evaporação é negligenciável;
- não há variação de temperatura.

### 3.8 Análise de sensibilidade

A amostragem dos parâmetros foi realizada segundo o método *Latin hypercube* para os parâmetros apresentados na Tabela 3.4. Para todos os parâmetros, uma distribuição de probabilidade uniforme foi adotada. As grandezas de saída observadas foram as concentrações de biomassa residual, PHB e oxigênio dissolvido. O método do coeficiente de correlação parcial de postos de Spearman (PRCC) foi utilizado para a análise de sensibilidade. O PRCC foi determinado para cada passo de tempo em um cultivo batelada simples com  $S_0 = 32 \text{ g L}^{-1}$ ;  $X_{r0} = 0.32 \text{ g L}^{-1}$ ;  $N_0 = 1,0 \text{ g L}^{-1}$ ;  $P_0 = 0.3 \text{ g L}^{-1}$ ; e tempo total de 60 h.

A definição do número de amostras ideal foi feita pelo seu aumento sistemático (entre 250 e 10.000) e verificação do valor de PRCC no tempo  $t = 60 \text{ h}$  em relação à concentração de PHB. Quando os valores de PRCC se mantiveram constantes, ou com pequena variação, o número de amostras foi definido.

O intervalo de variação para cada parâmetro foi escolhido com base nos valores obtidos ao longo dos experimentos e os reportados na literatura.

Tabela 3.4: Parâmetros de entradas utilizados na análise de sensibilidade e intervalo considerados.

Parâmetro	Intervalo	Unidade
$C_s$	[4,5, 7,5]	$\text{mg L}^{-1}$
$K_{p_n}$	[0,01, 0,20]	$\text{g L}^{-1}$
$K_{p_s}$	[2,0, 5,0]	$\text{g L}^{-1}$
$K_{x_n}$	[0,1, 0,4]	$\text{g L}^{-1}$
$K_{x_s}$	[0,1, 3,0]	$\text{g L}^{-1}$
$Y_{P/O}$	[1,0, 4,0]	$g_p g_{O_2}^{-1}$
$Y_{P/S}$	[0,37, 0,47]	$g_p g_s^{-1}$
$Y_{X/N}$	[6,3, 8,3]	$g_{x_r} g_N^{-1}$
$Y_{X/O}$	[1,0, 4,0]	$g_{x_r} g_{O_2}^{-1}$
$Y_{X/S}$	[0,4, 0,5]	$g_{x_r} g_s^{-1}$
$m_o$	[0,1, 0,2]	$\text{mg g}^{-1} \text{L}^{-1}$
$m_s$	[0,1, 0,5]	$\text{mg g}^{-1} \text{L}^{-1}$
$\mu_{p_{max}}$	[0,05, 0,11]	$g_p g_{X_r}^{-1} \text{h}^{-1}$
$\mu_{X_rMAX}$	[0,09, 0,14]	$\text{h}^{-1}$
$\theta$	[0,1, 2,0]	-

Fonte: autor (2019).

### 3.9 Otimização de parâmetros e avaliação do modelo

Realizou-se a otimização multiobjetivo dos parâmetros selecionados na análise de sensibilidade como mais influentes. O conjunto de objetivos minimizados simultaneamente foram: o rRMSE entre os dados experimentais e os dados do modelo para biomassa total, PHB acumulado, oxigênio dissolvido e concentrações de glicerol e nitrogênio. O método de busca padronizada foi utilizado como método de otimização. Já o universo de busca foi definido a partir do conhecimento prévio do comportamento das grandezas de entrada. Além disso, os pontos iniciais foram determinados aleatoriamente dentro do conjunto de possíveis valores para cada grandeza de entrada. Finalmente, a melhor solução foi determinada *a posteriori*, em que foi escolhido o conjunto de parâmetros que gerassem o menor valor

para  $\sum_{u=1}^m rRMSE(f_u)$  (sendo  $f_u$  cada objetivo).

Os dados experimentais utilizados no treinamento (otimização) do modelo foram unicamente os provenientes do cultivo G (página 4.6).

A avaliação da qualidade do modelo proposto foi realizada por meio do rRMSE. Foram avaliados os ajustes aos dados do cultivo D, G, H e I.

Em seguida, uma nova otimização utilizando o método de busca padronizada com varredura por LHS foi realizada. Seu objetivo foi maximizar a produtividade em PHB a partir dos parâmetros cinéticos otimizados anteriormente. Foi definido como 60 h o tempo total de cultivo e as concentrações iniciais de biomassa residual e PHB,  $0,45 \text{ g L}^{-1}$  e  $0,05 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. O volume inicial de reação foi  $3,75 \text{ L}$  e o valor máximo possível foi  $5 \text{ L}$ . Quanto ao glicerol no meio, para a concentração inicial de  $30 \text{ g L}^{-1}$  foi estipulada a restrição de uma concentração máxima de  $40 \text{ g L}^{-1}$ . As variáveis de decisão e seus intervalos de variação são apresentados na Tabela 3.5 e um esquema ilustrativo das otimizações realizadas é apresentado na Figura 3.3.

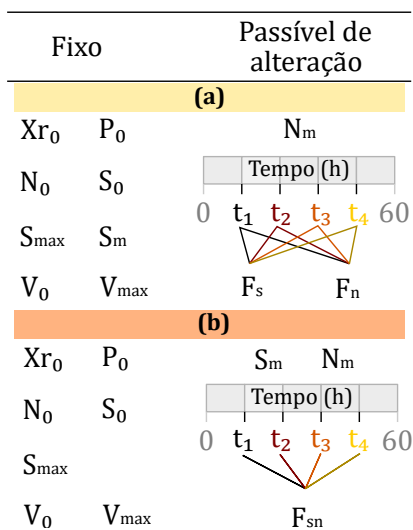
Tabela 3.5: Variáveis de decisão na otimização da produtividade.

Grandeza	Intervalo	Descrição
$N_0$	[1, 3]	Concentração inicial de nitrogênio ( $\text{g L}^{-1}$ )
$N_m$	[10, 90]	Concentração da solução de nitrogênio ( $\text{g L}^{-1}$ )
$F_n$	[0, 0,1]	Vazão de alimentação da solução de nitrogênio ( $\text{L h}^{-1}$ )
$F_s$	[0, 0,1]	Vazão de alimentação da solução de glicerol ( $\text{L h}^{-1}$ )
$t_1$	[1, 15]	Instante no tempo para variação da vazão de alim. (h)
$t_2$	[16, 31]	Instante no tempo para variação da vazão de alim. (h)
$t_3$	[32, 45]	Instante no tempo para variação da vazão de alim. (h)
$t_4$	[46, 58]	Instante no tempo para variação da vazão de alim. (h)

Fonte: autor (2019).

As soluções de alimentação foram adicionadas a vazão constante e, ao longo do processo de otimização, o algoritmo definiu quatro instantes no tempo para variar a vazão de ambas soluções.

Figura 3.3: Esquema ilustrativo das maximizações da produtividade realizadas, sendo com (a) soluções distintas de alimentação ou (b) com uma única solução contendo glicerol e fonte de nitrogênio.



Fonte: autor (2019).



# Capítulo 4

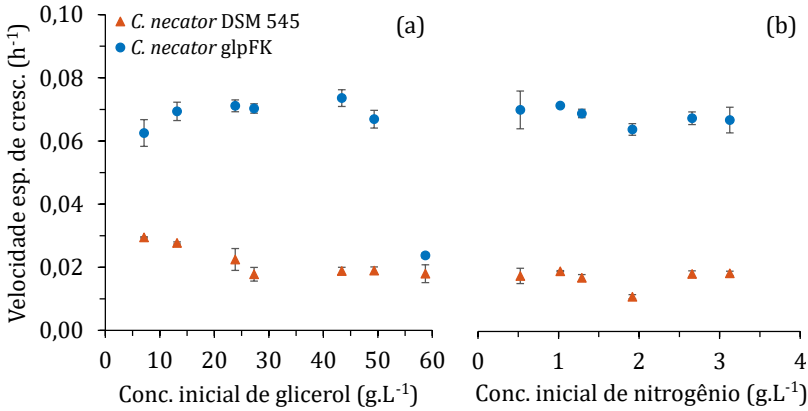
## Resultados e Discussão

### 4.1 Concentração inicial de substrato e crescimento celular

Inicialmente, cultivos em microplaca foram realizados com diferentes concentrações iniciais de glicerol e nitrogênio ( $S_0$  e  $N_0$ ,  $\text{g L}^{-1}$ ), à temperatura de  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , em que se buscou avaliar a velocidade específica de crescimento na fase exponencial ( $\mu_{X_{r_{\max}}}$ ) de *C. necator* DSM 545 (parental) e *C. necator* glpFK. Conforme apresentado na Figura 4.1a, os valores obtidos para esta grandeza, com  $S_0$  variando de 7 a  $59\text{ g L}^{-1}$  ( $N_0 = 1,1\text{ g L}^{-1}$ ), foram relativamente constantes, exceto pela redução em torno de  $50\text{ g L}^{-1}$ . Esta inibição pela alta concentração de glicerol ocorre devido ao aumento da pressão osmótica do meio (DORAN, 2013). Por outro lado, não foram verificadas grandes alterações no valor de  $\mu_{X_{r_{\max}}}$  para diferentes concentrações iniciais de nitrogênio ensaiadas (Figura 4.1b). Além disso, observou-se que a cepa modificada geneticamente apresentou valores de  $\mu_{X_{r_{\max}}}$  significativamente maiores que a cepa parental.

Os ensaios em microplacas, apesar de práticos, são limitados em termos de transferência de oxigênio, de modo que são esperados maiores valores de  $\mu_{X_{r_{\max}}}$  quando as mesmas condições iniciais são avaliadas em cultivos que não apresentam tal limitação. Neste sentido, foram realizados cultivos em agitador orbital para constatar a variação  $\mu_{X_{r_{\max}}}$  sob diferen-

Figura 4.1: Velocidade específica de crescimento na fase exponencial obtida com diferentes concentrações iniciais de (a) glicerol ( $N_0 = 1, 1 \text{ g L}^{-1}$ ) e (b) nitrogênio ( $S_0 = 19, 7 \text{ g L}^{-1}$ ) para *C. necator* glpFK e *C. necator* DMS 545 em microplaca.



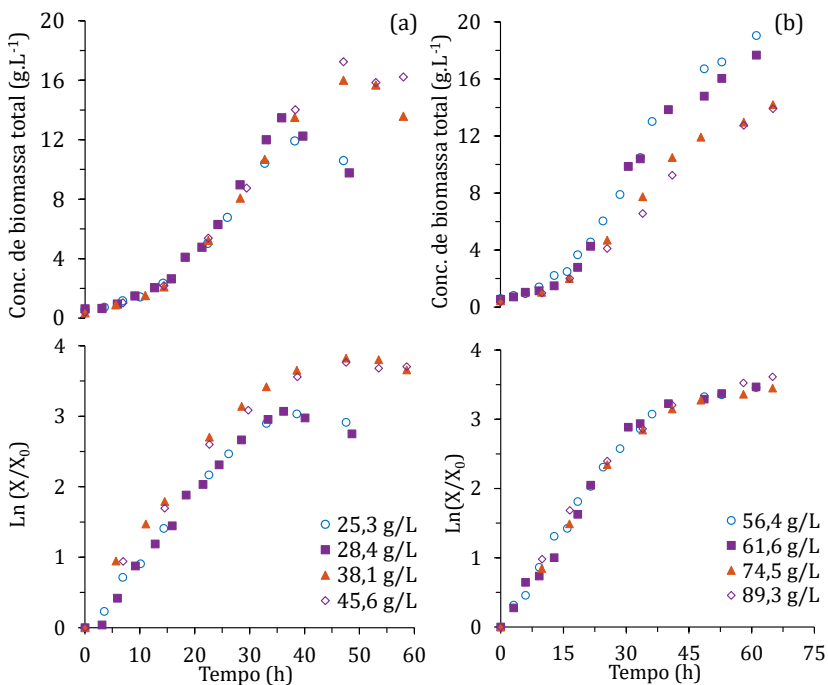
Fonte: autor (2019).

tes valores de  $S_0$  (25 a  $89 \text{ g L}^{-1}$ ). Na Figura 4.2a são expostos os valores de concentração de biomassa total com o tempo, que tem como característica um aumento gradativo até ocorrer a exaustão da fonte de carbono, implicando em seu decaimento. Este comportamento não é observado para maiores concentrações iniciais de glicerol (Figura 4.2b) em que, após finalizada a fase exponencial de crescimento, a biomassa se mantém crescendo porém, com velocidade inferior. Os valores de  $\mu_{X_{r_{max}}}$  nos cultivos em agitador orbital apresentados na Figura 4.3 limitaram-se a um estreito intervalo de valores, sendo que os mais elevados foram atingidos quando a concentração inicial de glicerol foi em torno de  $40 \text{ g L}^{-1}$ , obtendo-se o valor de  $0, 12 \text{ h}^{-1}$  para  $\mu_{X_{r_{max}}}$ .

Gahlawat e Srivastava (2017) reportam resultados similares no crescimento de *C. necator* DSM 545 em diferentes concentrações iniciais de glicerol, inclusive a redução da velocidade específica de crescimento em concentração inicial de 10 a  $20 \text{ g L}^{-1}$ . Para valores acima de  $50 \text{ g L}^{-1}$  foi observada uma redução na velocidade específica de crescimento, chegando a aproximadamente  $0, 09 \text{ h}^{-1}$ .

Uma vez que o objetivo desse experimento foi verificar a velocidade específica de crescimento, a concentração inicial de nitrogênio utilizada em cada cultivo foi o suficiente para não causar limitação e, portanto, produção de PHB. Os valores de velocidade específica de crescimento neste ensaio foram excepcionalmente determinados a partir dos dados de biomassa total ( $X_t$ ), já que, como havia nitrogênio em excesso no meio, foi considerado que a produção de PHB é muito baixa.

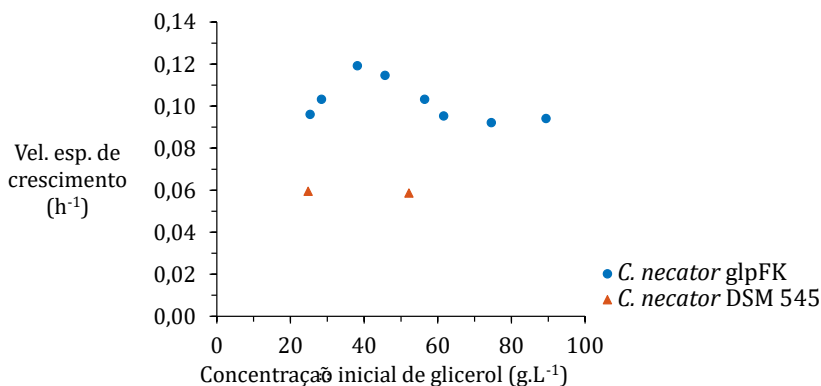
Figura 4.2: Evolução da biomassa total em termos de concentração e logaritmo natural em agitador orbital a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerol ((a) de 25,3 a 45,6 g L<sup>-1</sup> e (b) de 56,4 a 89,3 g L<sup>-1</sup>).



Fonte: autor (2019).



Figura 4.3: Velocidade específica de crescimento na fase exponencial sob diferentes concentrações iniciais de glicerol para *C. necator* glpFK e *C. necator* DMS 545 em agitador orbital.



Fonte: autor (2019).

Os dados obtidos foram comparados com o crescimento da cepa parental (*C. necator* DSM 545) nas mesmas condições ensaiadas e com  $S_0$  de 25 e 50 g L<sup>-1</sup>. Ainda na Figura 4.3, pode ser observado que a cepa modificada (*C. necator* glpFK) apresenta uma melhora significativa na velocidade específica de crescimento quando comparada à cepa parental, justificando seu uso na continuação deste estudo. Cavalheiro et al. (2009) reportam uma velocidade específica de crescimento de aproximadamente 0,30 h<sup>-1</sup> para *C. necator* DSM 545 no intervalo de 20 a 40 g L<sup>-1</sup> utilizando glicerol como fonte de carbono. Entretanto, no estudo citado, a cepa foi submetida a uma fase de adaptação ao meio, antes de ser inoculada no cultivo. Portanto, o valor obtido seria menor caso as mesmas condições aplicadas no presente estudo fossem empregadas pelos autores.

Foi observada uma redução do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) com o aumento da concentração inicial de glicerol (Figura 4.4), indicando perda da eficiência de crescimento celular. Neste ensaio houve a redução de 35% do valor de  $Y_{X/S}$  com o aumento da concentração inicial de substrato de 25 para 75 g L<sup>-1</sup>. O glicerol consumido pode estar sendo direcionado para a gliconeogênese ou para algum ciclo metabólico

sem que produtos de interesse sejam gerados.

Quanto ao o fator de conversão de nitrogênio em células ( $Y_{X/N}$ ), este foi de aproximadamente  $8,5 \text{ g}_{X_r} \text{ g}_{N}^{-1}$ , permanecendo sem alterações significativas no intervalo de concentração avaliado. Este valor é coerente com o reportado na literatura e com trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa (SPOLJARIC et al., 2013a; IENCZAK, 2011)

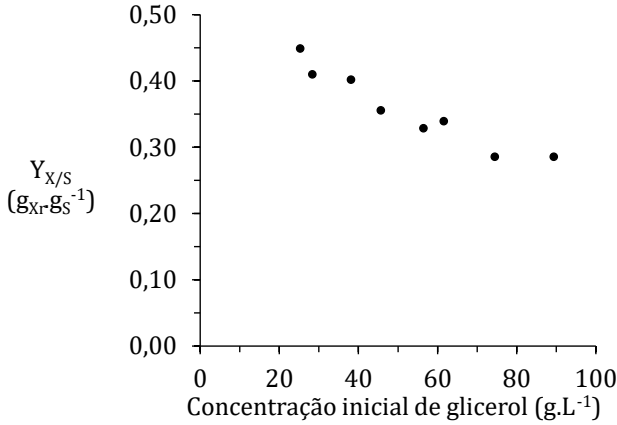
## 4.2 Cinética de crescimento (Cultivos A e B)

Buscando melhor compreensão da cinética de crescimento e produção de PHB, cultivos em batelada em biorreator agitado e aerado foram realizados com a concentração inicial de substrato de  $40 \text{ g L}^{-1}$ , condição que apresentou maior velocidade específica de crescimento celular no experimento anterior para a cepa recombinante.

Este novo cultivo, intitulado cultivo A, foi realizado a mesma temperatura ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e concentração inicial de nitrogênio ( $4,1 \text{ g L}^{-1}$ ) que os experimentos em agitador orbital. A concentração de nitrogênio foi tal para que não houvesse sua exaustão durante o cultivo, evitando assim, a produção de PHB.

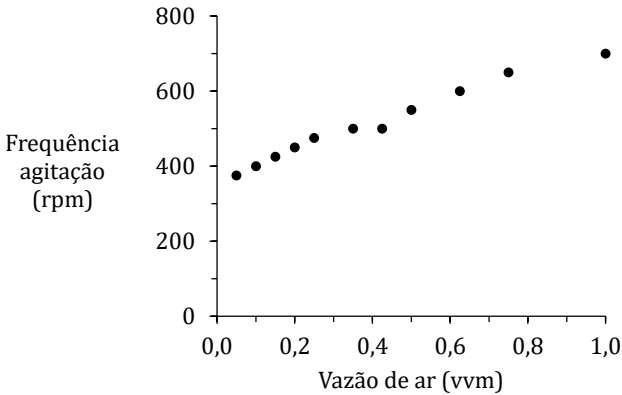
Inicialmente a velocidade crítica de dispersão ( $N_{cr}$ ) foi determinada, ou seja, a velocidade mínima de rotação dos agitadores do biorreator para uma dada vazão de aeração em que foi considerado que o gás estivesse homogeneamente disperso no meio de cultivo. Na Figura 4.5 é apresentada a determinação experimental da mínima velocidade de agitação para se obter um sistema agitado e aerado em que o regime de gás fosse homogêneo.

Figura 4.4: Fator de conversão de substrato em células em função da concentração inicial de glicerol para *C. necator* glpFK.



Fonte: autor (2019).

Figura 4.5: Frequência crítica de agitação para diferentes vazões de aeração.

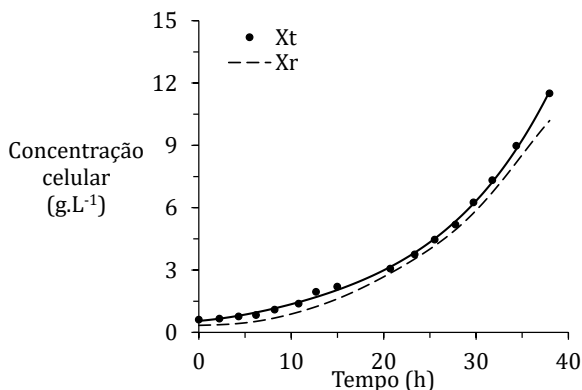


Fonte: autor (2019).

Esta avaliação serviu a operação dos cultivos em biorreator, de modo que sempre se operasse acima da velocidade crítica de agitação, evitando uma pobre dispersão de ar no meio.

As curvas de crescimento celular ao longo do tempo obtidas no cultivo A são apresentadas na Figura 4.6 e na Figura 4.7 é mostrado o perfil do logaritmo natural da concentração celular residual ao longo do cultivo. O período entendido como crescimento em fase exponencial está identificado na Figura 4.7, e, por meio da Equação 3.7 (página 67), verificou-se que a velocidade específica de crescimento na fase exponencial ( $\mu_{X_{r,max}}$ ) foi de  $0,10 \text{ h}^{-1}$ , ligeiramente inferior à obtida em agitador orbital nas mesmas condições. Foi observada uma fase de adaptação de 5 h antes do crescimento exponencial. As curvas indicando a concentração celular total e residual (Figura 4.6) são muito próximas, indicando que não houve acúmulo de PHB.

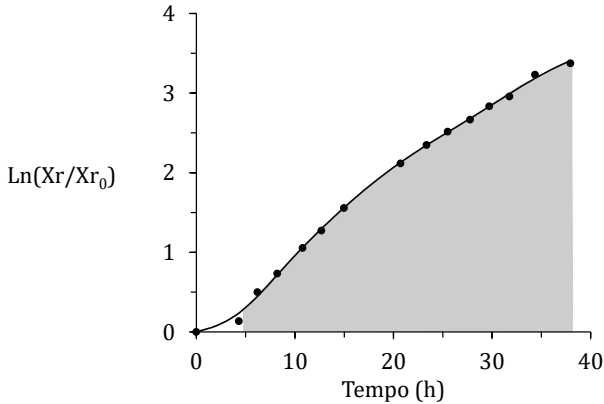
Figura 4.6: Curvas de crescimento celular total ( $X_t$ ) e residual ( $X_r$ ) ao longo do tempo no cultivo A.



Fonte: autor (2019).

Os fatores de conversão de glicerol e nitrogênio em células foram  $0,36 \text{ g}_{X_r} \text{ g}_S^{-1}$  e  $8,28 \text{ g}_{X_r} \text{ g}_N^{-1}$ , respectivamente. Devido a problemas operacionais, o cultivo foi finalizado antes que todo o substrato tivesse sido consumido, impedindo que a máxima concentração celular fosse obtida.

Figura 4.7: Variação do logaritmo natural da concentração celular residual no cultivo A. A área hachurada corresponde ao período considerado como crescimento em fase exponencial.



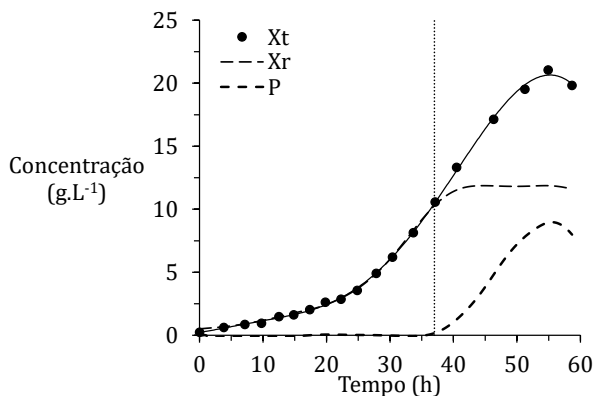
Fonte: autor (2019).

Contudo, esse ensaio foi válido para verificação da velocidade específica de crescimento na fase exponencial em biorreator agitado e aerado. Desse modo, o experimento foi repetido nas mesmas condições, exceto que se buscou verificar a capacidade de acúmulo de PHB, por meio da limitação de nitrogênio. Portanto, a concentração inicial de glicerol neste experimento, cultivo B, foi de  $44,7 \text{ g L}^{-1}$  e a de nitrogênio,  $1,3 \text{ g L}^{-1}$ .

Na Figura 4.8 são apresentadas as curvas de crescimento celular ao longo do tempo relativas ao cultivo B. Foi observado um período de 5 h de crescimento em baixa velocidade específica de crescimento e, logo em seguida, em fase exponencial, conforme apresentado na Figura 4.9. Neste cultivo, assim como no cultivo A, a concentração de biomassa residual foi estimada a partir da sua relação com a proteína celular, em que 0,9 g de proteína celular corresponde, em média, a 1 g de biomassa residual na fase de crescimento celular (Figura A.3, página 184) (ARAGAO et al., 1996). A velocidade específica de crescimento na fase exponencial foi  $0,08 \text{ h}^{-1}$  e a exaustão da fonte de nitrogênio ocorreu na 37<sup>a</sup> h de cultivo (linha pontilhada), iniciando a fase de produção de PHB. O cultivo manteve-se

por 21 h em fase de produção de PHB, chegando a um acúmulo de 43% de produto na biomassa seca. O momento da exaustão da fonte de nitrogênio também pode ser verificado na Figura 4.10b, a qual apresenta a variação desta fonte de nutriente ao longo do cultivo. Ainda nesta figura, observa-se que toda a fonte de carbono foi consumida em 55 h, momento no qual a concentração de PHB acumulado foi máxima ( $9,1 \text{ g L}^{-1}$ ). Este ensaio apresentou produtividade em PHB de  $0,17 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , valor limitado pela disponibilidade de substrato no meio.

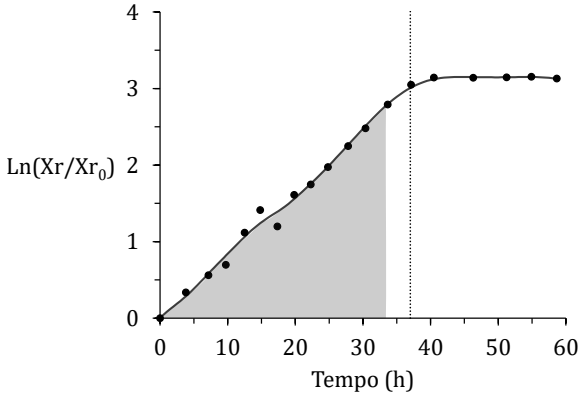
Figura 4.8: Curvas de crescimento celular total ( $X_t$ ), residual ( $X_r$ ) e PHB (P) ao longo do tempo no cultivo B. A linha pontilhada indica exaustão da fonte de nitrogênio.



Fonte: autor (2019).

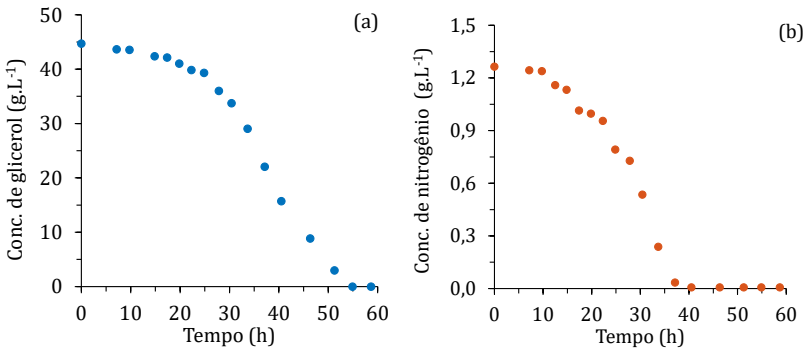
O fator de conversão de glicerol em célula ( $Y_{X/S}$ ) obtido neste cultivo foi de  $0,46 \text{ g}_{X_r} \text{ g}_S^{-1}$ , superior ao apresentado na literatura:  $0,35$  e  $0,41 \text{ g}_{X_r} \text{ g}_S^{-1}$  para *C. necator* DSM 545 e H16, respectivamente (CAVALHEIRO et al., 2009; TANADCHANGSAENG, YU, 2012). Já o fator de conversão de nitrogênio em biomassa obtido foi  $7,80 \text{ g}_{X_r} \text{ g}_N^{-1}$ , similar ao observado para *C. necator* DSM 545 utilizando ureia como fonte de nitrogênio (IENCZAK et al., 2011). A eficiência na conversão de glicerol em PHB na

Figura 4.9: Variação do logaritmo natural da concentração celular residual com o tempo no cultivo B. A área hachurada corresponde ao período considerado como crescimento em fase exponencial e a linha pontilhada indica exaustão da fonte de nitrogênio.



Fonte: autor (2019).

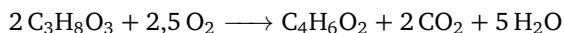
Figura 4.10: Variação da concentração de (a) glicerol e (b) nitrogênio ao longo cultivo B.



Fonte: autor (2019).

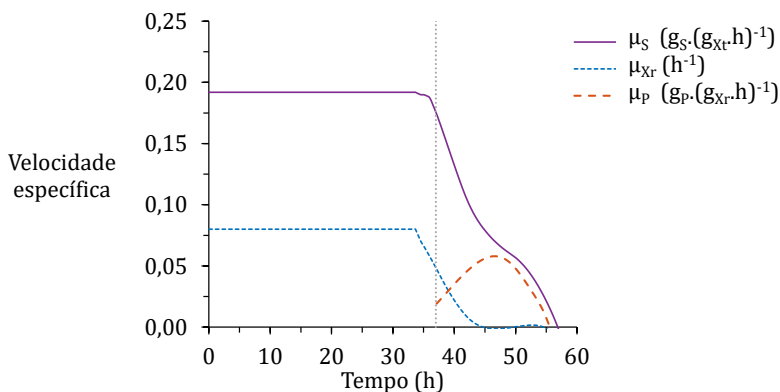
fase de produção ( $Y_{P/S}$ ) foi de  $0,48 \text{ g}_P \text{ g}_S^{-1}$ . O fator estequiométrico de conversão de glicerol em PHB é de  $0,46 \text{ g}_P \text{ g}_S^{-1}$ . Uma vez que a determina-

ção experimental do fator de conversão carrega consigo os erros analíticos das demais determinações realizadas, o valor obtido para  $Y_{P/S}$  no cultivo B certamente está superestimado. Ainda assim, é possível considerá-lo um bom resultado em vista da proximidade com o valor teórico de  $0,46 \text{ g}_P \text{ g}_S^{-1}$ .



Na Figura 4.11 pode ser verificada a evolução da velocidade específica de produção de PHB ( $\mu_P$ ), que atinge o valor máximo de  $0,06 \text{ g}_P \text{ g}_{X_r}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e, em seguida, diminui até atingir zero com esgotamento da fonte de carbono. A velocidade específica de consumo de substrato (Figura 4.11) na fase exponencial de crescimento celular foi de  $0,19 \text{ g}_S \text{ g}_{X_t}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Após limitação em nitrogênio, o valor de  $\mu_s$  acompanha a redução na velocidade específica de crescimento ( $\mu_{X_r}$ ), sendo alterado, apenas, pela ascensão no valor de  $\mu_P$ .

Figura 4.11: Velocidade específica de consumo de glicerol ( $\mu_S$ ), de crescimento celular residual ( $\mu_{X_r}$ ) e de produção de PHB ( $\mu_P$ ) ao longo do cultivo B. Linha pontilhada vertical representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio.



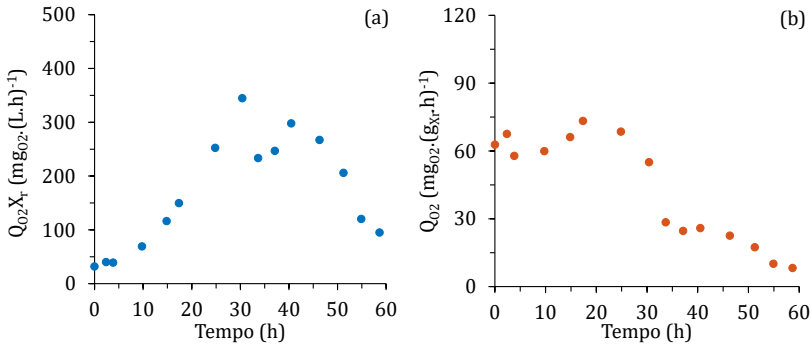
Fonte: autor (2019).

Buscando conhecer o estado fisiológico da célula ao longo do cultivo, determinações do consumo de oxigênio foram realizadas e na Figura 4.12



é apresentada a velocidade de consumo de oxigênio ao longo do cultivo B. Pode ser observado que, mesmo havendo uma alta atividade metabólica (refletida em uma alta velocidade específica de consumo de oxigênio,  $Q_{O_2}$ ), a baixa concentração celular no meio faz com que o consumo global de oxigênio ( $Q_{O_2}X_r$ ) seja igualmente baixo. Conforme ocorre o aumento da concentração celular,  $Q_{O_2}X_r$  atinge o valor máximo de  $350 \text{ mg}_{O_2} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  em aproximadamente 30 h de cultivo, momento a partir do qual a fonte de nitrogênio começa a se tornar deficiente, influenciando no metabolismo celular e reduzindo  $Q_{O_2}$ . A fase de produção de biopolímero é caracterizada por um baixo consumo específico de oxigênio no sentido de manutenção da viabilidade celular e produção de PHB, que perdura até a exaustão da fonte de carbono, finalizando o cultivo.

Figura 4.12: (a) Velocidade de consumo de oxigênio ( $Q_{O_2}X_r$ ) e (b) velocidade específica de consumo de oxigênio ( $Q_{O_2}$ ) ao longo do cultivo B.



Fonte: autor (2019).

Na Tabela 4.1 são compiladas as condições operacionais e os resultados obtidos nos cultivos A e B. A comparação das condições empregadas e resultados encontrados em todos os cultivos realizados neste estudo é apresentada na Tabela 4.12 (página 150).

Tabela 4.1: Síntese das condições empregadas e resultados obtidos nos experimentos A e B.

	Cultivo		Unidade
	A	B	
Modo de operação:	simples	simples	-
T	30	30	°C
S <sub>0</sub>	37,8	44,7	g L <sup>-1</sup>
N <sub>0</sub>	4,1	1,3	g L <sup>-1</sup>
Pulso de glicerol	Não	Não	g L <sup>-1</sup>
Tempo de cultivo	38	59	h
μ <sub>X<sub>r</sub>max</sub>	0,10	0,08	h <sup>-1</sup>
X <sub>tfinal</sub>	11,5	21,0	g L <sup>-1</sup>
X <sub>rfinal</sub>	10,0	11,9	g L <sup>-1</sup>
P <sub>final</sub>	1,6	9,1	g L <sup>-1</sup>
Y <sub>X/S</sub>	0,36	0,46	g <sub>X<sub>r</sub></sub> g <sub>S</sub> <sup>-1</sup>
Y <sub>X/N</sub>	8,28	8,30	g <sub>X<sub>r</sub></sub> g <sub>N</sub> <sup>-1</sup>
Y <sub>P/S</sub>	-	0,48	g <sub>P</sub> g <sub>S</sub> <sup>-1</sup>
Prod. em PHB	-	0,17	g <sub>P</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Acúmulo de PHB	-	43	%
μ <sub>Pmax</sub>	-	0,06	g <sub>P</sub> g <sub>X<sub>r</sub></sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Q <sub>O<sub>2</sub></sub> X <sub>rmax</sub>	-	350	mg <sub>O<sub>2</sub></sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Q <sub>O<sub>2</sub></sub> max	-	80	mg <sub>O<sub>2</sub></sub> g <sub>X<sub>r</sub></sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>

Fonte: autor (2019)

### 4.3 Influência do modo de operação do cultivo (Cultivo C)

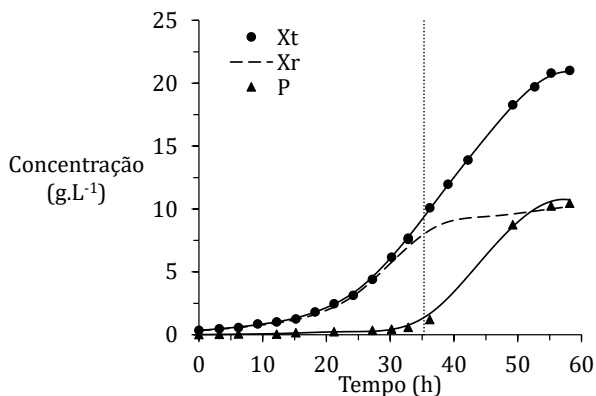
Visando verificar se a queda no valor de μ<sub>X<sub>r</sub>max</sub> com concentração inicial de glicerol de 20 g L<sup>-1</sup> apresentada na Figura 4.3 (página 80) persistiria, optou-se por realizar um cultivo nesta concentração de substrato. Esta ação foi realizada visto que o fornecimento e transferência de oxigênio em biorreatores agitados e aerados é superior a de um agitador orbital. Além disso, foi observada maior eficiência na conversão de substrato (Y<sub>X/S</sub>) quando se empregou essa concentração inicial de glicerol (Figura

4.4, página 82), fato que ampliou o interesse na reavaliação das condições já empregadas em agitador orbital.

Para ser um experimento passível de comparação com o cultivo B, foi adicionado um pulso de glicerol quando sua concentração estimada se aproximasse a  $5 \text{ g L}^{-1}$ , evitando a inibição do crescimento por carência da fonte de carbono. O pulso de substrato objetivou adicionar glicerol suficiente para que houvesse uma variação de  $20 \text{ g L}^{-1}$  (161 mL de uma solução  $496 \text{ g L}^{-1}$ ) no meio reacional, ou seja, fornecer a mesma quantidade de glicerol utilizada no experimento anterior (cultivo B). A temperatura de operação foi de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , a concentração inicial de glicerol foi de  $22,7 \text{ g L}^{-1}$  e a de nitrogênio,  $1,3 \text{ g L}^{-1}$ . Neste e nos experimentos seguintes, a concentração de biomassa residual foi determinada a partir da relação entre biomassa total (dada pelo método gravimétrico) e PHB (obtido por cromatografia gasosa).

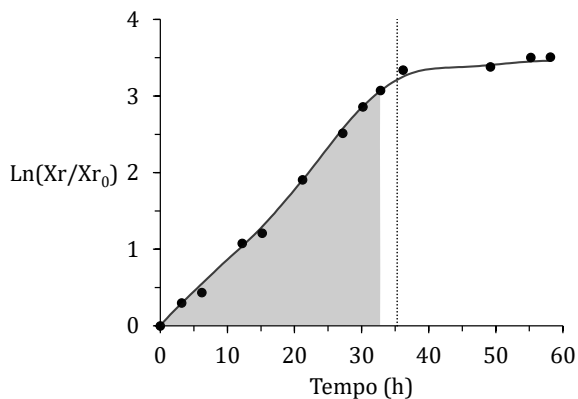
As curvas de crescimento celular total e residual obtidas no cultivo C são apresentadas na Figura 4.13. O microrganismo cresceu com  $\mu_{X_r, \text{max}}$  de  $0,10 \text{ h}^{-1}$  sem apresentar fase de adaptação ao meio (Figuras 4.14 e 4.18) confirmando pequena redução na velocidade específica de crescimento na concentração inicial de substrato de aproximadamente  $20 \text{ g L}^{-1}$  (questão levantada a partir da Figura 4.1, página 41). O cultivo C teve a mesma duração que o cultivo anterior, 58 h. O pulso de glicerol foi aplicado na  $33^{\text{a}}$ h de cultivo e a fonte de nitrogênio se extinguiu em aproximadamente 37 h (Figura 4.15b). Na fase de acúmulo de PHB, a biomassa residual ( $X_r$ ) permaneceu sem alterações significativas ( $9,3$  até  $10,4 \text{ g L}^{-1}$ ), enquanto que a biomassa total ( $X_t$ ) atingiu  $20,9 \text{ g L}^{-1}$  contendo 50% de biopolímero acumulado. Mesmo com  $\mu_{X_r, \text{max}}$  ligeiramente inferior, os resultados obtidos são semelhantes aos do experimento realizado em batelada simples.

Figura 4.13: Curvas de crescimento celular total ( $X_t$ ) e residual ( $X_r$ ) e concentração de PHB (P) ao longo do cultivo C. Linha pontilhada indica exaustão da fonte de nitrogênio.



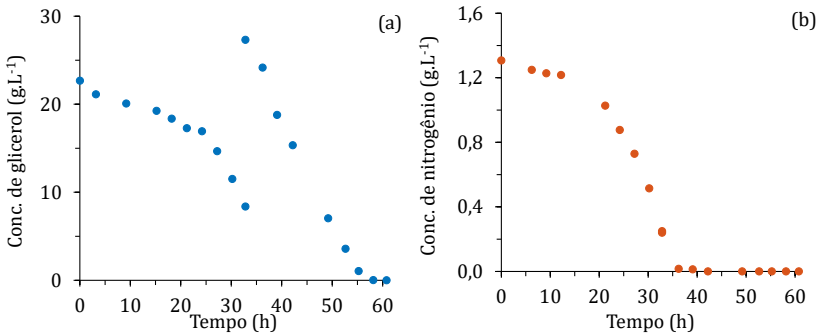
Fonte: autor (2019).

Figura 4.14: Variação do logaritmo natural da concentração celular residual no cultivo C. Área hachurada corresponde ao período considerado como crescimento em fase exponencial e a linha pontilhada indica exaustão da fonte de nitrogênio.



Fonte: autor (2019).

Figura 4.15: Variação da concentração de (a) glicerol e (b) nitrogênio ao longo do cultivo C.



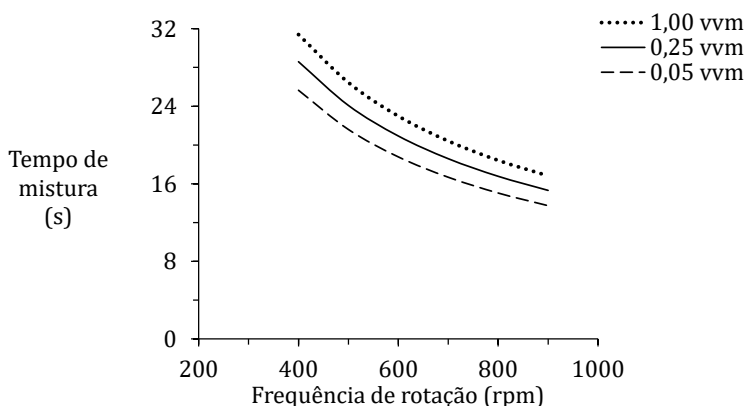
Fonte: autor (2019).

A fim de determinar corretamente a variação da concentração de glicerol no meio no momento da adição do pulso, foi estimado o tempo de mistura para o sistema em diversas condições de agitação e aeração, segundo a Equação 2.7 (página 45). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.16, onde pôde ser estabelecido, independente das condições do meio, um tempo de 30 s entre a adição do pulso de substrato e a coleta de amostra.

Além da verificação pelos métodos enzimático-colorimétricos (item 3.1.3, página 62), o momento da exaustão tanto da fonte de nitrogênio, quanto de glicerol, pode ser verificado de forma *on-line* pela abrupta elevação na concentração de oxigênio dissolvido no meio, indicando alteração do metabolismo celular, como pode ser verificado na Figura 4.17 (as demais variações bruscas, tempo 15 e 25 h, são devido às modificações na velocidade de agitação).

O fator de conversão de glicerol em biomassa residual ( $Y_{X/S}$ ) foi de 0,46  $g_{X_r} g_S^{-1}$ , valor este igual ao obtido no experimento B. Já a conversão de nitrogênio em biomassa residual resultou em um fator de 6,90  $g_{X_r} g_N^{-1}$ ,

Figura 4.16: Tempo de mistura ( $t_{0,05}$ ) para diferentes condições de agitação e aeração.

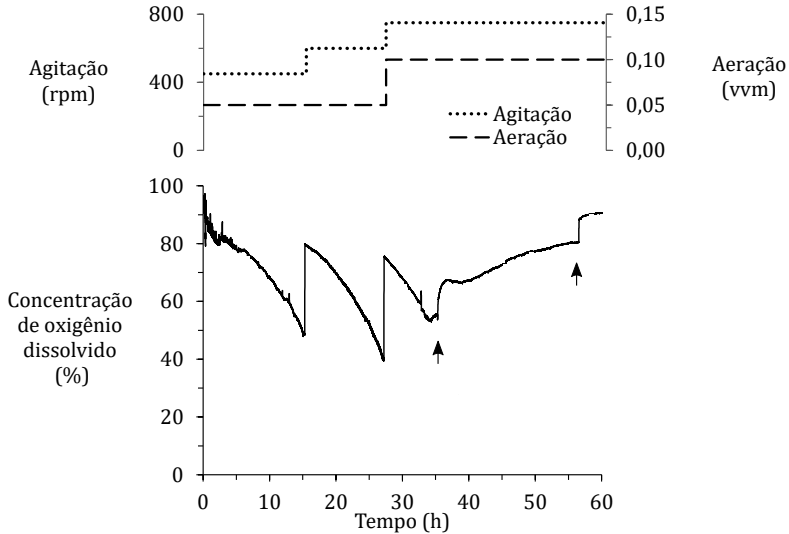


Fonte: autor (2019).

menor que o encontrado anteriormente ( $8,28$  e  $8,30 \text{ g}_{X_r} \text{ g}_N^{-1}$  nos cultivos A e B, respectivamente). A velocidade específica de consumo de substrato ( $\mu_S$ ) na fase exponencial foi de  $0,23 \text{ g}_S \text{ g}_{X_t}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , enquanto que a de acúmulo de PHB ( $\mu_P$ ) foi  $0,07 \text{ g}_P \text{ g}_{X_r} \text{ h}^{-1}$ , ligeiramente superior à obtida no cultivo B (Figura 4.18).

A produtividade em PHB (Equação 3.9, página 68) é apresentada na Figura 4.19. Após o esgotamento da fonte de nitrogênio,  $\mu_P$  aumenta até atingir o valor máximo e, em seguida, decresce até próximo de zero ao final do cultivo. Mesmo com a redução da velocidade específica de produção de biopolímero, a produtividade aumenta constantemente até atingir  $0,21 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  na 55ª hora de cultivo. Goularte (2018) obteve  $0,30 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  em cultivo da mesma cepa, porém utilizando glicose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e glicerol ( $25 \text{ g L}^{-1}$ ). A velocidade específica de crescimento utilizando glicose é elevada, sendo no estudo citado  $0,24 \text{ h}^{-1}$ , significativamente maior que no presente trabalho, o que justifica a elevada produtividade.

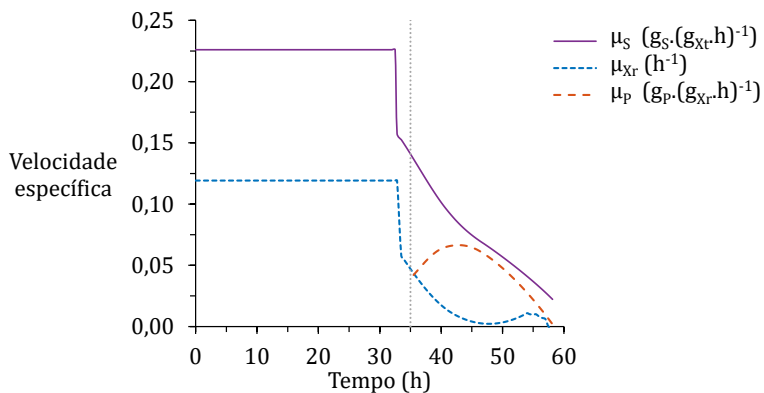
Figura 4.17: Variação da concentração de oxigênio dissolvido e condições de agitação e aeração ao longo do cultivo C. Setas indicam o momento da limitação em nitrogênio e glicerol.



Fonte: autor (2019).

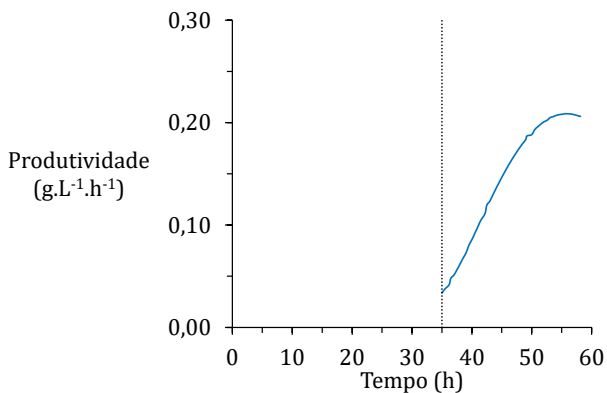
O comportamento quanto à respiração celular ao longo do cultivo pode ser verificado na Figura 4.20, onde são apresentados os valores de  $Q_{O_2X_r}$  e  $Q_{O_2}$ . Ao contrário do cultivo B, não foi observada uma redução significativa em  $Q_{O_2}$  logo após a exaustão da fonte de nitrogênio em 35 h, mas sim uma redução gradual a partir da 20ª hora de cultivo. Diante disso, foi observada uma velocidade de consumo de oxigênio ( $Q_{O_2X_r}$ ) mais elevada, alcançando  $400 \text{ mg}_{O_2} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . O máximo valor encontrado para a velocidade específica de consumo de oxigênio foi de  $90 \text{ mg}_{O_2} \text{ g}_{X_r} \text{ h}^{-1}$ , próximo ao obtido no cultivo de *C. necator* glpFK em glicose e glicerol e *C. necator* DSM 545 apenas em glicose (SCHMIDT et al., 2015; GOULARTE, 2018).

Figura 4.18: Velocidade específica de consumo de glicerol ( $\mu_S$ ), de crescimento celular residual ( $\mu_{X_r}$ ) e de produção de PHB ( $\mu_P$ ) ao longo do cultivo C. Linha pontilhada vertical representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio.



Fonte: autor (2019).

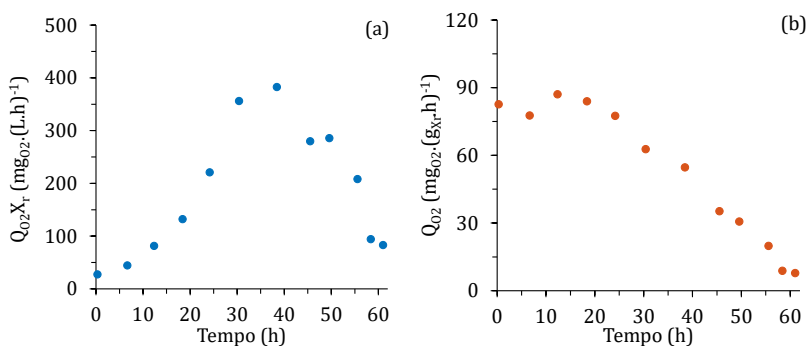
Figura 4.19: Evolução da produtividade em PHB no cultivo C. A linha pontilhada indica o momento da exaustão da fonte de nitrogênio.



Fonte: autor (2019).



Figura 4.20: Variação da (a) velocidade de consumo de oxigênio (QO2Xr) e (b) velocidade específica de consumo de oxigênio (QO2) ao longo do cultivo C



Fonte: autor (2019).

## 4.4 Influência da temperatura (Cultivo D)

São reportados na literatura cultivos tendo como objetivo a produção de PHAs sob temperaturas em torno de 35 °C (CAVALHEIRO et al., 2009; IENCZAK et al., 2016; NIKEL et al., 2008). Uma vez que os experimentos realizados no presente estudo foram executados à temperatura de 30 °C, optou-se por avaliar o crescimento de *C. necator* glpFK a 35 °C (alterando-se, inclusive, a temperatura dos pré-cultivos). As condições operacionais são apresentadas na Tabela 4.2 e, exceto pela temperatura, as condições são correspondentes às do cultivo C. Além disso, este experimento foi executado na forma de batelada alimentada com pulso de glicerol

A alteração na temperatura de operação não resultou em um elevado incremento de  $\mu_{X_{rmax}}$ , partindo de 0,10  $\text{h}^{-1}$  a 30 °C para 0,12  $\text{h}^{-1}$ . Entretanto, houve a redução de tempo total de cultivo (pré-cultivos + cultivo em biorreator) de 21%, justificando a permuta de temperatura nos próximos experimentos.

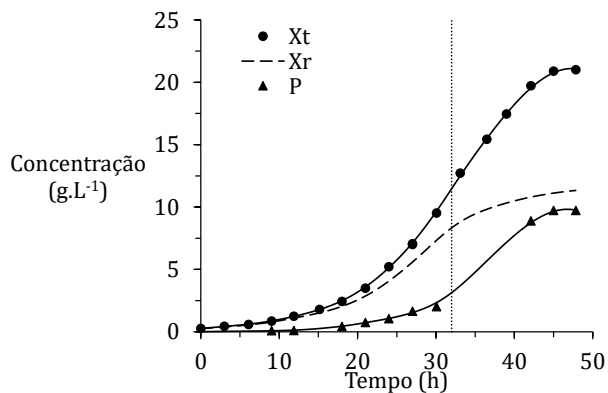
A Figura 4.21 apresenta as curvas de crescimento celular e produção de PHB e na Figura 4.22 pode ser identificado o período considerado como crescimento exponencial. A variação da concentração de glicerol e nitrogênio ao longo do cultivo é mostrada na Figura 4.23.

Tabela 4.2: Condições operacionais do cultivo D.

	Grandeza	Valor
	Temperatura	35 °C
Pré-cultivo	Concentração inicial de glicerol	40 g L <sup>-1</sup>
	Concentração inicial de nitrogênio	1,2 g L <sup>-1</sup>
Biorreator	Concentração inicial de glicerol	24,1 g L <sup>-1</sup>
	Concentração inicial de nitrogênio	1,2 g L <sup>-1</sup>
	Varição da concentração de glicerol no meio devido ao pulso	20,2 g L <sup>-1</sup>

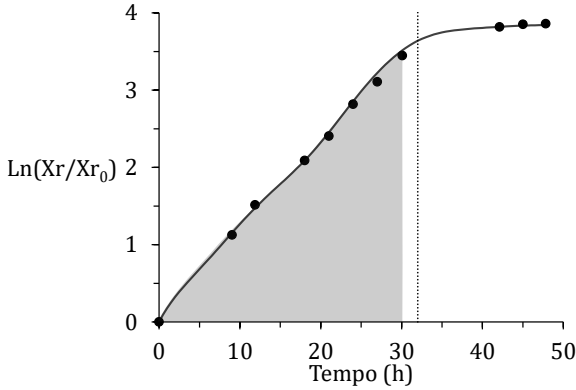
Fonte: autor (2019).

Figura 4.21: Curvas de crescimento celular total ( $X_t$ ) e residual ( $X_r$ ) e concentração de PHB (P) ao longo do cultivo D. Linha pontilhada indica exaustão da fonte de nitrogênio.



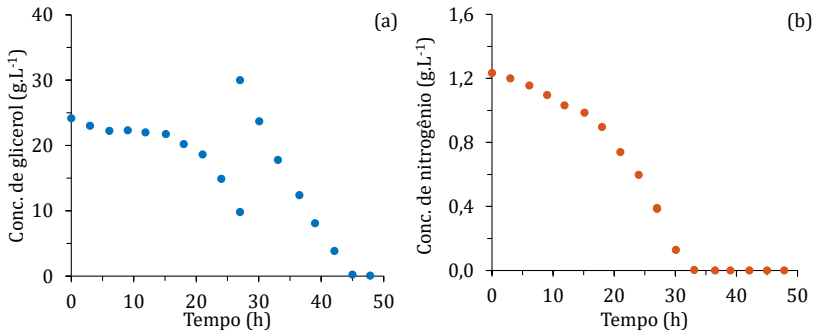
Fonte: autor (2019).

Figura 4.22: Variação do logaritmo natural da concentração celular residual com o tempo no cultivo D. Área hachurada corresponde ao período considerado como crescimento em fase exponencial e a linha pontilhada indica exaustão da fonte de nitrogênio.



Fonte: autor (2019).

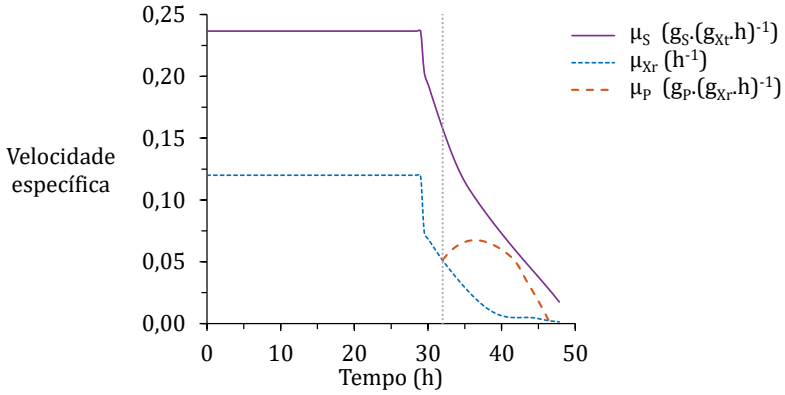
Figura 4.23: Variação da concentração de (a) glicerol e (b) nitrogênio ao longo do cultivo D.



Fonte: autor (2019).

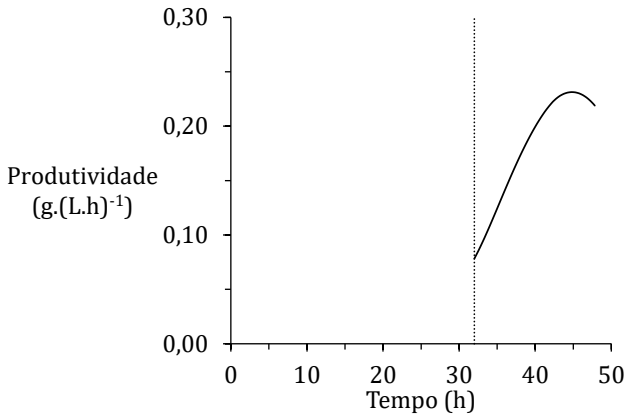
O tempo total de cultivo foi de 48 h, 10 h a menos que o cultivo C. A exaustão da fonte de nitrogênio se deu com 33 h, momento no qual havia  $18 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol disponível para produção de PHB, resultando em  $11,3 \text{ g L}^{-1}$  de biopolímero (53,7%). A quantidade de glicerol consumido e biomassa total produzida foram  $44$  e  $21,0 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente, aproximadamente o mesmo valor obtido no cultivo anterior. A velocidade específica de produção de PHB foi de  $0,07 \text{ g}_P \text{ g}_{X_r}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , permanecendo praticamente inalterada entre os cultivos (Figura 4.24). Já a produtividade em biopolímero do cultivo D foi de  $0,23 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Figura 4.25), o maior valor obtido entre os cultivos realizados. Zanfonato (2016), utilizando *C. necator* glpFK e vinhaça com glicerol como fonte de carbono, reporta produtividade de  $0,18 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Contudo, este autor apresenta  $\mu_{X_r \text{max}}$  de  $0,33 \text{ h}^{-1}$ , visto que a vinhaça apresenta ácidos orgânicos e sais minerais que favorecem o crescimento celular (PARNAUDEAU et al., 2008). A velocidade específica de consumo de glicerol no presente estudo foi de  $0,24 \text{ g}_S \text{ g}_{X_t}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Figura 4.24). Schmidt et al. (2015) reporta o valor de  $0,44 \text{ g}_P \text{ g}_{X_r}^{-1} \text{ h}^{-1}$  na produção de PHB por *C. necator* DSM 545 utilizando glicose como fonte de carbono. Esta maior velocidade é compreendida, já que a fosforilação da glicose ocorre simultaneamente à sua introdução na célula.

Figura 4.24: Velocidade específica de consumo de glicerol ( $\mu_S$ ), de crescimento celular residual ( $\mu_{X_r}$ ) e de produção de PHB ( $\mu_P$ ) ao longo do cultivo D.



Fonte: autor (2019).

Figura 4.25: Produtividade em PHB ao longo do cultivo D.



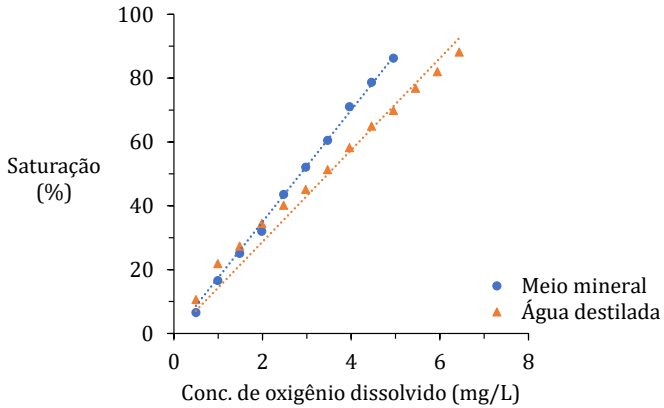
Fonte: autor (2019).

O fator de conversão de substrato em biomassa residual ( $Y_{X/S}$ ) foi  $0,41 \text{ g}_{X_r} \text{ gS}^{-1}$ , enquanto que a conversão de nitrogênio em biomassa residual ( $Y_{X/N}$ ) foi  $7,85 \text{ g}_{X_r} \text{ gN}^{-1}$ . Já o rendimento de conversão de glicerol em produto na fase de produção ( $Y_{P/S}$ ) foi  $0,42 \text{ g}_P \text{ gS}^{-1}$ . Os ajustes matemáticos para a determinação destas grandezas estão no Apêndice B, Figura B.4.

Com o aumento da temperatura, a concentração de saturação do oxigênio dissolvido no meio,  $C_s$ , torna-se menor e, em momentos de elevada velocidade de consumo de oxigênio, pode haver a redução da atividade celular por conta desta baixa disponibilidade. De modo a trazer maior precisão aos resultados, foi determinada  $C_s$  em meio mineral com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol e  $1,2 \text{ g L}^{-1}$  de nitrogênio a temperatura de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Por meio da extrapolação dos dados apresentados na Figura 4.26, foi encontrado o valor de  $5,71 \text{ mg L}^{-1}$  para a concentração de saturação de oxigênio. Como análise comparativa, o resultado para água destilada a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  foi de  $6,92 \text{ mg L}^{-1}$ , coerente com o encontrado na literatura (DUTTA, 2009). Como comparação, a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , a concentração de saturação é de  $7,6 \text{ mg L}^{-1}$  (DUTTA, 2009). A quantificação da velocidade de consumo de oxigênio,  $Q_{O_2}X_r$ , é fortemente afetada pelo valor empregado como  $C_s$ , uma vez que a sonda de oxigênio dissolvido apresenta apenas a porcentagem da saturação e não o valor da concentração de oxigênio no meio.

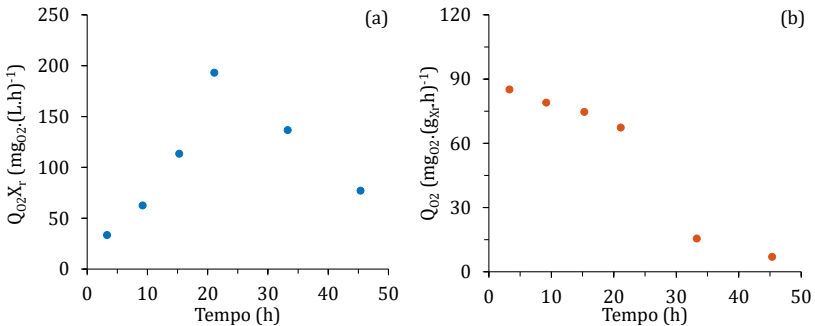
Na Figura 4.27 é apresentada a velocidade de consumo de oxigênio (a) e a velocidade específica de consumo de oxigênio (b). Desde o início do cultivo até o fim da fase exponencial,  $Q_{O_2}$  permaneceu elevado, decrescendo logo após a exaustão da fonte de nitrogênio, como seria de se esperar. No presente cultivo, mesmo quando  $Q_{O_2}X_r$  era máximo, as condições de agitação e aeração eram moderadas, com  $750 \text{ rpm}$  e  $0,05 \text{ vvm}$ , respectivamente, garantindo que a concentração de oxigênio dissolvido estivesse a, pelo menos, 30% da saturação com ar atmosférico. Neste ensaio, a constante de atraso do eletrodo,  $k_p$ , foi de  $286,9 \text{ h}^{-1}$ . Este valor foi utilizado na Equação 3.12 (página 70) para uma determinação mais correta do valor de  $k_L a$ .

Figura 4.26: Curva de porcentagem de saturação em função da concentração de oxigênio dissolvido.



Fonte: autor (2019).

Figura 4.27: Variação da (a) velocidade de consumo de oxigênio ( $Q_{O_2}X_r$ ) e (b) velocidade específica de consumo de oxigênio ( $Q_{O_2}$ ) ao longo do cultivo D.



Fonte: autor (2019).

As condições empregadas e resultados obtidos nos cultivos C e D são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Síntese das condições empregadas e resultados obtidos nos experimentos nos cultivos C e D.

	Cultivo		Unidade
	C	D	
Modo de operação:	alim.	alim.	-
T	30	35	°C
S <sub>0</sub>	22,7	24,2	g L <sup>-1</sup>
N <sub>0</sub>	1,3	1,2	g L <sup>-1</sup>
Pulso de glicerol	+20	+20	g L <sup>-1</sup>
Tempo de cultivo	58	48	h
μ <sub>X<sub>r</sub>max</sub>	0,10	0,12	h <sup>-1</sup>
X <sub>tfinal</sub>	20,9	21,0	g L <sup>-1</sup>
X <sub>rfinal</sub>	10,4	9,7	g L <sup>-1</sup>
P <sub>final</sub>	10,5	11,3	g L <sup>-1</sup>
Y <sub>X/S</sub>	0,46	0,41	g <sub>X<sub>r</sub></sub> g <sub>S</sub> <sup>-1</sup>
Y <sub>X/N</sub>	6,90	7,85	g <sub>X<sub>r</sub></sub> g <sub>N</sub> <sup>-1</sup>
Y <sub>P/S</sub>	0,43	0,42	g <sub>P</sub> g <sub>S</sub> <sup>-1</sup>
Prod.atividade em PHB	0,21	0,23	g <sub>P</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Acúmulo de PHB	50	54	%
μ <sub>Pmax</sub>	0,07	0,07	g <sub>P</sub> g <sub>X<sub>r</sub></sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Q <sub>O<sub>2</sub></sub> X <sub>rmax</sub>	400	450	mg <sub>O<sub>2</sub></sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Q <sub>O<sub>2</sub></sub> max	90	110	mg <sub>O<sub>2</sub></sub> g <sub>X<sub>r</sub></sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>

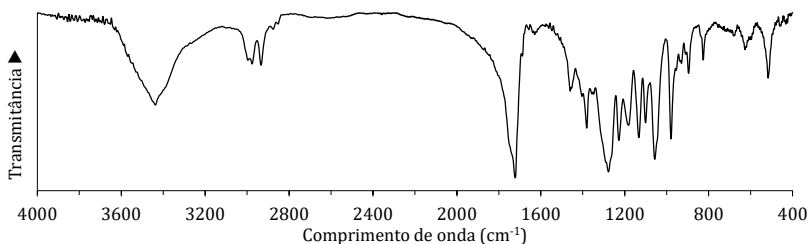
Fonte: autor (2019)



#### 4.4.1 Caracterização do PHB extraído

A caracterização do polímero extraído a partir das células do cultivo D foi realizada como descrito no item 3.2, baseando-se em Quines (2015). Dessa maneira, o espectro de FTIR obtido para a amostra de PHB é apresentado na Figura 4.28. A série de bandas encontradas na região de 1.000 a 1.300  $\text{cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento da ligação C-O do grupo éster. Os picos em 1.380 e 1.457  $\text{cm}^{-1}$  são característicos da deformação simétrica do grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) e da deformação assimétrica da ligação C-H do grupo  $\text{CH}_2$ , respectivamente. O pico de absorção em 1.722  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento da ligação carbonil ( $\text{C}=\text{O}$ ), enquanto que a banda na faixa de 2.975 e 2.933  $\text{cm}^{-1}$  é característica de deformações axiais de C-H alifáticos (STUART, 2004). Já o pico em torno de 3.436  $\text{cm}^{-1}$  indica a presença de umidade na amostra analisada (OLIVEIRA et al., 2007). Os resultados estão de acordo com o encontrado na literatura para polihidroxibutirato. Desse modo, foi possível identificar o polímero produzido como PHB (EL-HADI et al., 2002; RODRIGUEZ-CONTRERAS et al., 2013). Dado que Zanfonato (2016), na construção de *C. necator* glpFK, não realizou nenhuma modificação genética na via de produção de PHB, já era esperado que o biopolímero sintetizado fosse PHB.

Figura 4.28: Espectro de FTIR do PHB extraído do cultivo D.

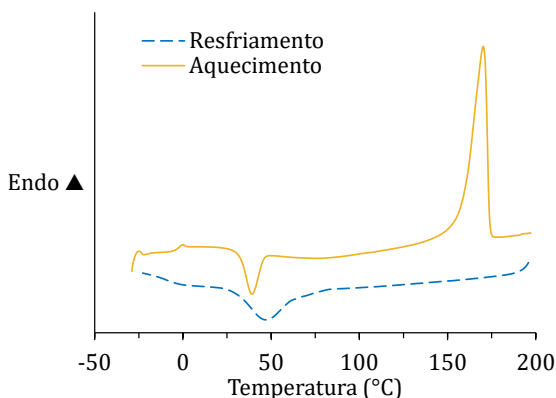


Fonte: autor (2019).

O comportamento da amostra sob variação de temperatura em DSC é apresentado na Figura 4.29 e 4.30. Ao longo do segundo aquecimento durante a análise calorimétrica (DSC), foram obtidos os valores da tempe-

ratura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ) e temperatura de cristalização sob aquecimento ( $T_{hc}$ ). No primeiro resfriamento, a temperatura de cristalização sob resfriamento ( $T_{cc}$ ) foi determinada. Todos os valores citados são apresentados na Tabela 4.4.

Figura 4.29: Termograma de DSC do PHB analisado. Linha tracejada se refere ao primeiro resfriamento e a linha contínua ao segundo aquecimento.



Fonte: autor (2019).

A temperatura de fusão do PHB fabricado pela COPERSUCAR e BIOMER é de 174 e 175 °C, respectivamente (EL-HADI et al., 2002). Gahlawat e Srivastava (2017) produziram PHB a partir de glicerol bruto e *C. necator* DSM 545 com temperatura de fusão de 175 °C. O polímero produzido no cultivo D apresentou temperatura de fusão de 170 °C, próxima à obtida nos estudos citados. A variação na entalpia associada à fusão da amostra foi de 108,1 J g<sup>-1</sup>. Foi identificada uma transição endotérmica em -0,8 °C devido a  $T_g$  do biopolímero. O valor é próximo ao reportado por Oliveira et al. (2007) no cultivo de *C. necator* em fermentação em estado sólido, os quais obtiveram o valor de -0,3 °C para a  $T_g$  do PHB produzido a partir de polpa de soja. Quines (2015) apresenta o mesmo valor de -0,8 °C para PHB extraído com carbonato de propileno e produzido a partir de glicose. Durante o primeiro resfriamento, a amostra sofreu cristalização em  $T_{cc}$  de 49 °C com uma variação exotérmica de entalpia associada de 18,3 J g<sup>-1</sup>.

Tabela 4.4: Principais parâmetros obtidos pela análise DSC.

	Parâmetro	Valor
$T_m$	Temperatura de fusão	170 °C
$\Delta H_m$	Entalpia de fusão	108,1 J g <sup>-1</sup>
$T_g$	Temp. de transição vítrea	-0,8 °C
$T_{hc}$	Temp. de cristalização sob aquecimento	39 °C
$T_{cc}$	Temp. de cristalização sob resfriamento	49 °C
$\Delta H_c$	Entalpia de cristalização	18,3 J g <sup>-1</sup>
$X_c$	Grau de cristalização	86,6%

Fonte: autor (2019).

Já durante o segundo aquecimento, a cristalização ocorreu à temperatura de 39 °C, ocorrendo de forma mais rápida, porém a variação da entalpia foi aproximadamente igual, 20,1 J g<sup>-1</sup>.

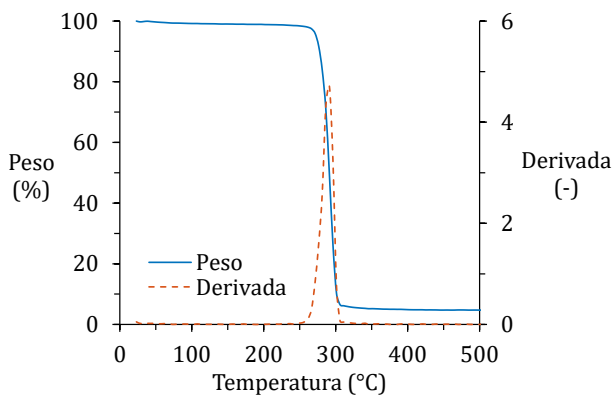
Normalmente, PHB são materiais altamente cristalinos, embora se apresentem na forma amorfa enquanto no interior da célula, cristalizando rapidamente uma vez que ocorre o rompimento da parede celular (RODRÍGUEZ-CONTRERAS et al., 2015). O alto grau de cristalinidade ( $X_c$ ), geralmente torna o polímero quebradiço o que conseqüentemente restringe sua gama de aplicação. Para PHB comercial, o grau de cristalinidade varia de 60 a 80%. Diferentes metodologias para a determinação de  $X_c$  são encontradas na literatura. Geralmente esta é determinada pela razão entre a entalpia de fusão da amostra ( $\Delta H_m$ ) e do polímero de referência completamente cristalino ( $\Delta H_m^0$ ) ou conforme Equação 3.1 (página 64). Entretanto, ambos os métodos não consideram a variação da capacidade calorífica da amostra com a temperatura, fornecendo resultados imprecisos (KONG, HAY, 2002). Apesar disso, são metodologias frequentemente empregadas. A título de comparação com a literatura, neste estudo a Equação 3.1 foi empregada na determinação desta grandeza.

Na Figura 4.30, o resultado da análise termogravimétrica do biopolímero obtido é apresentado. Pode ser observado apenas um estágio de perda de massa, sendo este atribuído à decomposição do PHB. A temperatura de início de degradação foi de 266 °C, atingindo máxima velocidade de degradação em 291 °C, indicada pela derivada da curva do peso da

amostra. A partir de 306 °C, praticamente todo o polímero foi degradado, não havendo mais variação significativa no peso da amostra restante, sendo esta, apenas impurezas. A perda de massa da amostra ao final do ensaio foi de 95,3%, indicando a pureza do material.

El-Hadi et al. (2002) destacam que, para o PHB comercial analisado em seu estudo, o intervalo de degradação foi de 280 a 320 °C, mais elevado que o obtido no presente trabalho. Uma elevada temperatura de decomposição implica em um intervalo de operação mais amplo no que diz respeito à temperatura de processamento do polímero. Desse modo, pode-se dizer que o PHB produzido neste estudo possui capacidade de aplicação no processo de moldagem por injeção.

Figura 4.30: TGA da amostra de PHB obtida no cultivo D.



Fonte: autor (2019).

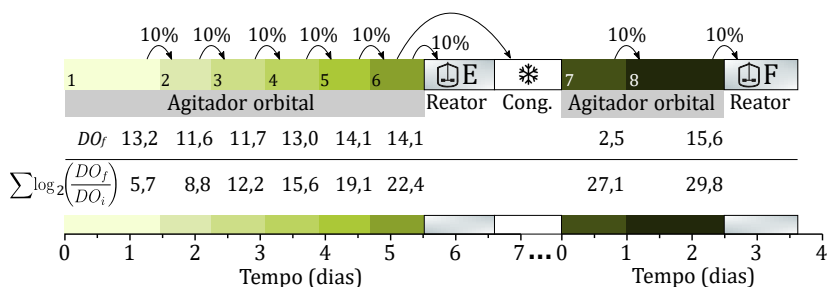
## 4.5 Adaptação da cepa em glicerol (Cultivos E e F)

Quando se utiliza glicerol como fonte de carbono no cultivo de *C. necator* DSM 545, diversos estudos reportam a realização de uma adaptação ao meio, a qual é feita na forma de uma etapa anterior ao cultivo em biorreator e requer um período demasiadamente longo. Tal medida visa a elevação da velocidade de crescimento celular neste substrato (MOZUMDER et al., 2014a). Destes destaca-se o estudo de Cavalheiro et al. (2009), em que os autores afirmam atingir  $\mu_X$  de aproximadamente  $0,30 \text{ h}^{-1}$  a partir de uma concentração inicial de glicerol de  $30 \text{ g L}^{-1}$ . O procedimento relatado pelos autores se inicia com o crescimento das células em frascos aletados contendo 50 mL de meio mineral com composição similar ao utilizado neste trabalho, porém suplementado com extrato de levedura e  $30 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol. O cultivo é conduzido a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  em reator orbital por cerca de 5 dias, seguido pela transferência de 1 mL desta suspensão para um novo frasco contendo 50 mL da solução de nutrientes e incubado novamente em reator orbital. Este procedimento foi realizado de 3 a 4 vezes para, segundo os autores, garantir uma boa adaptação em glicerol. Entretanto, não é mencionado se a elevada velocidade específica de crescimento celular é mantida após congelamento da cepa adaptada à  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  para utilização em cultivos futuros, indicando estabilidade fenotípica, fato que define a viabilidade de tal adaptação em escala industrial.

Desse modo, buscou-se realizar este procedimento para a cepa *C. necator* glpFK seguida por avaliação cinética em biorreator, congelamento e novo cultivo em biorreator. A inoculação do frasco seguinte ocorreu quando a densidade ótica estava em torno de 13, correspondente a aproximadamente  $5 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa total (segundo Figura A.1, página 183) para que não houvesse limitação do crescimento pela indisponibilidade de oxigênio no meio. A temperatura de operação em todas as etapas foi de  $35^\circ\text{C}$ . Dado que a cepa já havia sido geneticamente modificada para crescer com maior velocidade em glicerol, o período de troca foi em torno de 20 h. Os autores citados afirmam manter o cultivo no mesmo frasco por 5 dias, entretanto, caso este período fosse empregado, haveria exaustão do glicerol do meio. Um esquema dos cultivos sequenciais, apresentando a densidade ótica a 600 nm obtida ao final de cada etapa, é apresentado

na Figura 4.31.

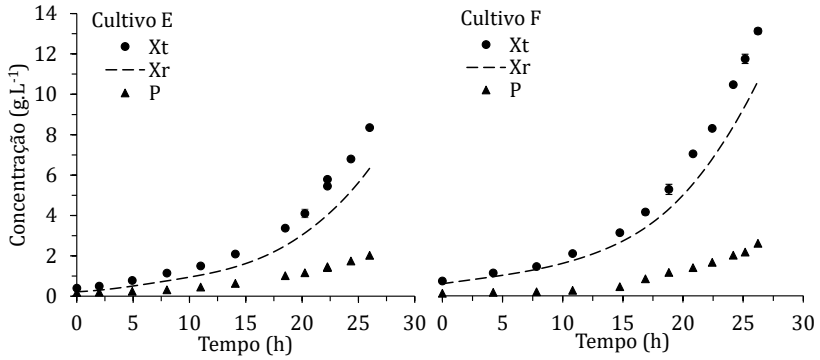
Figura 4.31: Esquema dos cultivos sequenciais em agitador orbital e biorreator.  $DO_i$  e  $DO_f$  correspondem a densidade ótica ao início e final de cada etapa, respectivamente.



Fonte: autor (2019).

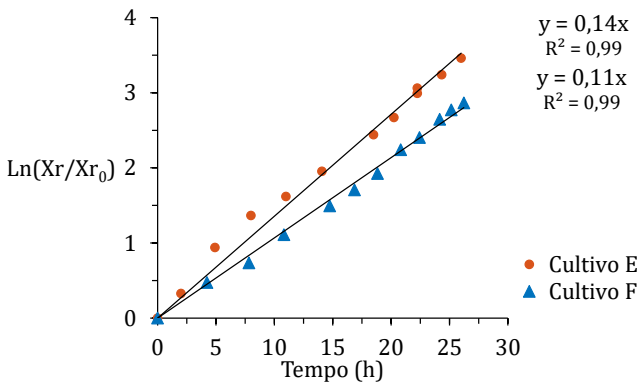
Foram realizados 6 cultivos sequenciais em agitador orbital, que resultaram em 22 gerações de células ao longo de 132 h, seguido por cultivo em biorreator agitado e aerado (denominado cultivo E). Por meio da relação da absorvância com a concentração celular (Figura A.1, página 183) foi possível verificar que não houve aumento na velocidade específica de crescimento ( $\mu_{X_t}$ ) entre os cultivos em agitador orbital. Já no cultivo E, a velocidade específica de crescimento foi de  $0,14 \text{ h}^{-1}$ , 20% superior em relação ao cultivo D, indicando efeito da adaptação. O acréscimo foi inferior aos valores informados por Cavalheiro et al. (2009). Sendo assim, pode-se supor que os autores não reportaram todas as informações necessárias para a reprodutibilidade do procedimento. Por outro lado, o valor obtido é semelhante ao apresentado por Tanadchangsang e Yu (2012) após adaptação de *C. necator* ATCC 17699,  $0,11 \text{ h}^{-1}$ . A cinética de crescimento pode ser verificada nas Figuras 4.32 e 4.33.

Figura 4.32: Evolução da concentração celular total ( $X_t$ ), residual ( $X_r$ ) e PHB ( $P$ ) nos cultivos E e F.



Fonte: autor (2019).

Figura 4.33: Logaritmo natural da concentração celular residual ( $X_r$ ) dos cultivos E e F.



Fonte: autor (2019).

Parte do caldo usado como inóculo do cultivo E foi armazenado em microtubos de 2 mL a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  pelo período de 30 dias. A ativação da cepa congelada foi realizada em meio mineral (habitualmente feita em caldo nutriente) em agitador orbital, seguida por mais uma etapa ainda em agitador orbital visando servir de inóculo para outro cultivo em biorreator (cultivo F).

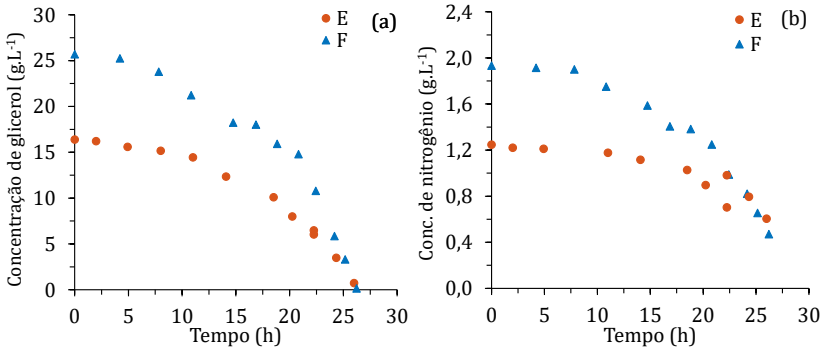
Como pode ser observado na Figura 4.33, o aumento na velocidade específica de crescimento não foi mantido após congelamento. Logo, a extensa etapa de adaptação deve ser realizada anteriormente a todos os cultivos, sendo que mais estudos devem ser realizados para seu emprego em escala industrial.

As condições operacionais entre os cultivos E e F foram diferentes, como pode ser observado na Figura 4.34. No cultivo E, a concentração inicial de glicerol foi de  $16,4\text{ g L}^{-1}$  e a de nitrogênio  $1,2\text{ g L}^{-1}$  com a adição de um pulso de solução de ureia que causou a elevação da concentração de nitrogênio no meio em  $0,3\text{ g L}^{-1}$ . Já no cultivo F, o experimento foi iniciado com  $25\text{ g L}^{-1}$  de glicerol e  $1,9\text{ g L}^{-1}$  de nitrogênio sem adições posteriores. Dessa forma, a maior concentração de biomassa atingida no cultivo F se deve à maior disponibilidade de carbono e nitrogênio no meio e também à maior concentração celular residual inicial,  $0,60\text{ g L}^{-1}$  contra  $0,25\text{ g L}^{-1}$  no cultivo E. Conforme apresentado na Figura 4.3 (página 80), a concentração inicial de glicerol no cultivo F não é suficiente para causar a redução observada na velocidade específica de crescimento.

Mesmo existindo nitrogênio disponível no meio, houve o acúmulo de PHB intracelular, atingindo 20 e 24 % da biomassa total ( $X_t$ ) em base seca nos cultivos E e F, respectivamente. Na Figura 4.33 pode-se verificar que não houve redução de  $\mu_{X_t}$  pela indisponibilidade de substrato ao final do cultivo (indicado pelo bom ajuste à equação linear,  $R^2 = 0,99$ ), de modo que não foi possível a determinação do parâmetro de afinidade ao substrato ( $K_{x_s}$ ) da equação de Monod ( $\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_{x_s} + S}$ ). Dessa forma, pode-se entender que o valor desta grandeza encontra-se no intervalo  $3 < K_{x_s} < 0$  (valor 3 atribuído pela proximidade com o ponto de análise experimental).



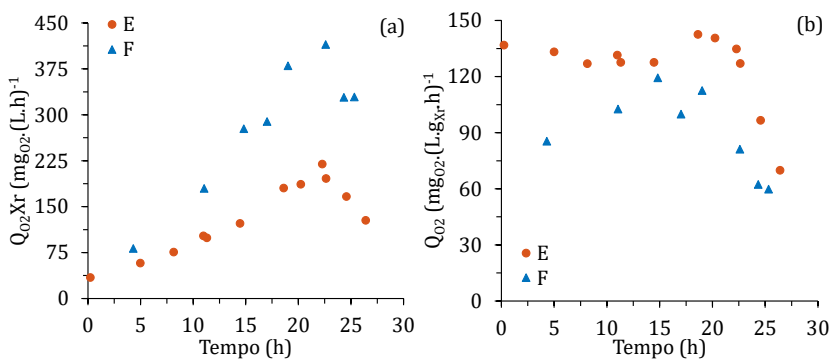
Figura 4.34: Concentração de (a) glicerol e nitrogênio (b) ao longo dos cultivos E e F.



Fonte: autor (2019).

O aumento de  $\mu_{X_{Tmax}}$  no cultivo E causou um expressivo aumento no consumo específico de oxigênio ( $Q_{O_2}$ ) (Figura 4.35b), onde, em cultivos anteriores, consumia-se em torno de  $100 \text{ mg}_{O_2} \text{ g}_{X_r}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  na fase exponencial de crescimento, no cultivo E foi consumido  $140 \text{ mg}_{O_2} \text{ g}_{X_r}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Ainda na Figura 4.35, pode ser observado que, nos instantes finais de ambos os cultivos, há a redução da velocidade específica de consumo de oxigênio promovida pela diminuição da concentração de glicerol no meio. Na Figura 4.35a é apresentada a velocidade de consumo de oxigênio nos cultivos E e F. Embora  $Q_{O_2}$  seja menor no cultivo F, em virtude da maior concentração celular neste cultivo, a velocidade de consumo de oxigênio ( $Q_{O_2} X_r$ ) é maior quando comparada com o cultivo E.

Figura 4.35: (a) Velocidade de consumo de oxigênio ( $Q_{O_2, X_r}$ ) e (b) velocidade específica de consumo de oxigênio ( $Q_{O_2}$ ) ao longo do cultivo E e F.



Fonte: autor (2019).

Os fatores de conversão de substrato e nitrogênio em biomassa ( $Y_{X/S}$  e  $Y_{X/N}$ ) foram similares em ambos cultivos e são apresentados na Tabela 4.5. Na mesma tabela são apresentadas as condições empregadas e resultados obtidos nos cultivos E e F.

Frente aos resultados obtidos, optou-se por não empregar esta adaptação da cepa.

Tabela 4.5: Síntese das condições empregadas e resultados obtidos nos experimentos E e F.

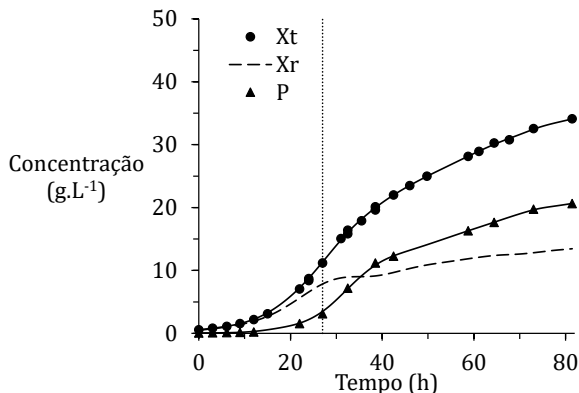
	Cultivo		Unidade
	E	F	
Modo de operação:	alim.	simples	-
T	35	35	°C
S <sub>0</sub>	16,4	25,7	g L <sup>-1</sup>
N <sub>0</sub>	1,2	1,9	g L <sup>-1</sup>
Pulso de glicerol	-	-	g L <sup>-1</sup>
Tempo de cultivo	26	26	h
Adaptação em glicerol	Sim	Sim	-
μ <sub>X<sub>r</sub>max</sub>	0,14	0,11	h <sup>-1</sup>
X <sub>tfinal</sub>	8,3	13,0	g L <sup>-1</sup>
X <sub>rfinal</sub>	6,3	10,5	g L <sup>-1</sup>
P <sub>final</sub>	2,0	2,5	g L <sup>-1</sup>
Y <sub>X/S</sub>	0,38	0,40	g <sub>X<sub>r</sub></sub> g <sub>S</sub> <sup>-1</sup>
Y <sub>X/N</sub>	6,5	6,74	g <sub>X<sub>r</sub></sub> g <sub>N</sub> <sup>-1</sup>
Y <sub>P/S</sub>	-	-	g <sub>P</sub> g <sub>S</sub> <sup>-1</sup>
Prod. utividade em PHB	0,07	0,09	g <sub>P</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Acúmulo de PHB	25	19	%
μ <sub>Pmax</sub>	0,06	0,04	g <sub>P</sub> g <sub>X<sub>r</sub></sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Q <sub>O<sub>2</sub></sub> X <sub>rmax</sub>	228	338	mg <sub>O<sub>2</sub></sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Q <sub>O<sub>2</sub>max</sub>	136	83	mg <sub>O<sub>2</sub></sub> g <sub>X<sub>r</sub></sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>

Fonte: autor (2019)

## 4.6 Tempo de fase de produção (Cultivo G)

Buscando aumentar a fração de biopolímero acumulado na célula, o cultivo G foi realizado nas condições iniciais de substrato dos cultivos anteriores e à temperatura de 35 °C. Entretanto, foram realizados três pulsos de glicerol ao invés de apenas um como no cultivo D. Na Figura 4.36 são apresentadas as concentrações de biomassa total e residual, assim como a concentração de PHB acumulado.

Figura 4.36: Curvas de crescimento celular total ( $X_t$ ) e residual ( $X_r$ ) e concentração de PHB (P) ao longo do cultivo G. Linha pontilhada indica exaustão da fonte de nitrogênio.



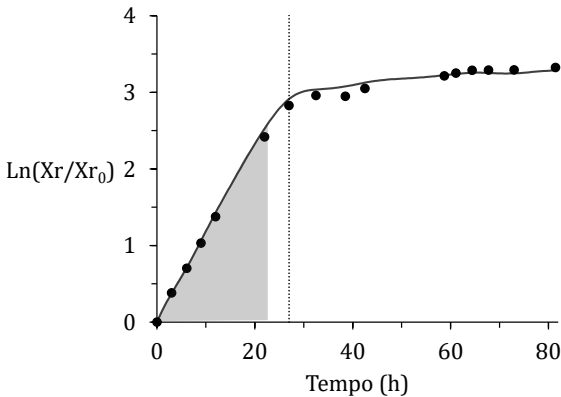
Fonte: autor (2019).

Em um total de 81 h, foi atingida a concentração de biomassa total de 34,1 g L<sup>-1</sup> em que 60,5% em massa seca era composta por PHB. Na Figura 4.37, pode ser observado que não houve fase de adaptação ao meio, iniciando o cultivo em fase exponencial de crescimento, a qual durou até a 21<sup>a</sup> h de cultivo e apresentou uma velocidade específica de crescimento de 0,12 h<sup>-1</sup>. O experimento foi iniciado com 1,1 g L<sup>-1</sup> de nitrogênio e 20,1 g L<sup>-1</sup> de glicerol (Figura 4.38). A fonte de nitrogênio se esgotou após 27 h de cultivo e nos instantes 24, 32 e 38 h foram adicionados os pulsos de glicerol com volume suficiente para causar a alteração no meio de 25, 25

e  $15 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente, o que elevou a concentração de glicerol no meio a  $28, 2, 35, 1$  e  $41, 3 \text{ g L}^{-1}$ . Este experimento foi interrompido antes que houvesse o consumo de toda a fonte de carbono disponível, restando  $7,0 \text{ g L}^{-1}$ .

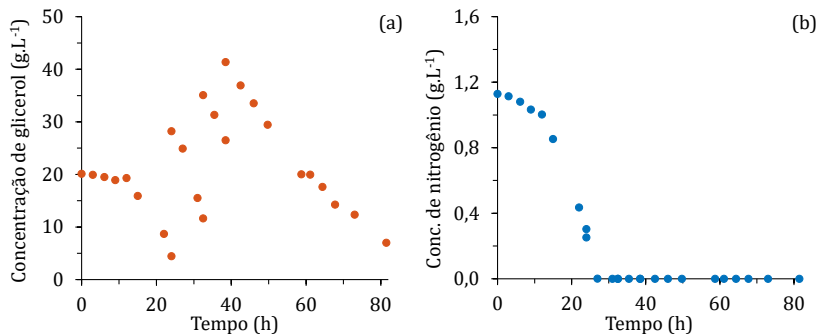
Foi observado o aumento da concentração de biomassa residual após a exaustão da fonte de nitrogênio. Contudo, a presença deste nutriente é essencial para o crescimento celular e, ressaltando que, a determinação de  $X_r$  se dá pela diferença entre  $X_t$  e  $P$ , supõe-se que a concentração de PHB na fase de produção tenha sido superior ao determinado experimentalmente.

Figura 4.37: Variação do logaritmo natural da concentração celular residual ao longo do cultivo G. Área hachurada corresponde ao período considerado como crescimento em fase exponencial e a linha pontilhada indica exaustão da fonte de nitrogênio.



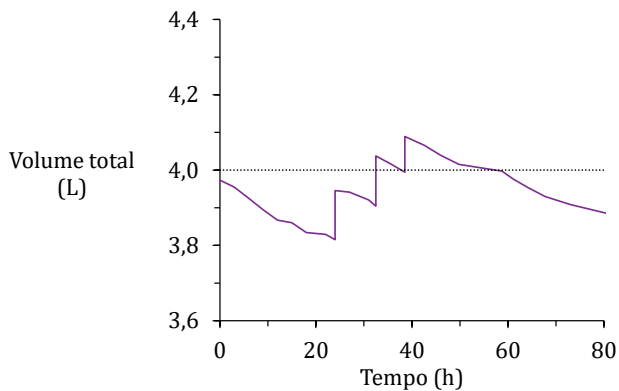
A variação do volume de líquido no biorreator devido a adição dos pulsos de substrato, soluções de ácido e base para correção de pH e coleta de amostra pode ser verificada na Figura 4.39. Esta variação de volume ao longo do cultivo foi menor que 5% do volume inicial.

Figura 4.38: Variação da concentração de (a) glicerol e (b) nitrogênio ao longo do cultivo G.



Fonte: autor (2019).

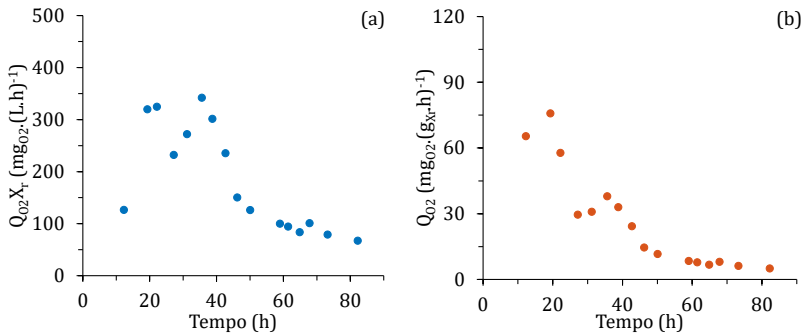
Figura 4.39: Variação de volume ao longo do cultivo G. A linha pontilhada indica o volume inicial do experimento e os limites inferior e superior do eixo da ordenada representa uma variação de 10% do volume inicial



Fonte: autor (2019).

No que se refere ao consumo de oxigênio, a Figura 4.40 apresenta a velocidade global e específica de consumo de oxigênio, onde  $Q_{O_2}$  decresce quando ocorre a limitação de nitrogênio no meio, mas volta a subir horas depois, resultando no segundo pico observado em  $Q_{O_2}X_r$  (Figura 4.40a). Da mesma maneira dos demais cultivos, na fase de produção a velocidade específica de consumo de oxigênio permanece baixa, até atingir valor mínimo no final do cultivo. A constante de atraso da sonda foi levada em consideração na determinação de  $k_L a$ , sendo  $k_p$   $318,6 \text{ h}^{-1}$ .

Figura 4.40: Variação da (a) velocidade de consumo de oxigênio ( $Q_{O_2}X_r$ ) e (b) velocidade específica de consumo de oxigênio ( $Q_{O_2}$ ) ao longo do cultivo G.

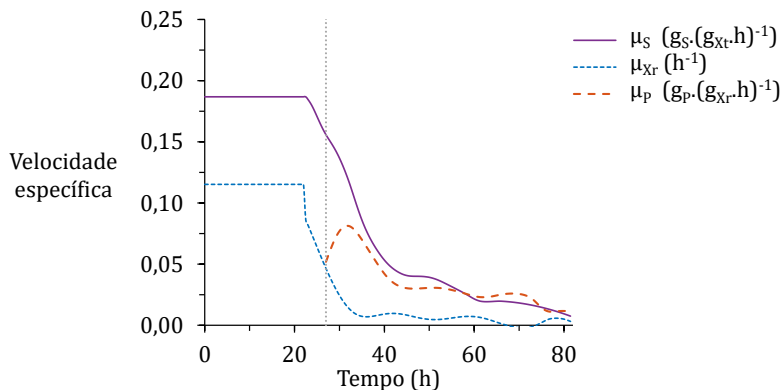


Fonte: autor (2019).

Os fatores de conversão foram similares aos do cultivo D, com  $Y_{X/S}$ ,  $0,43 \text{ g}_{X_r} \text{ g}_S^{-1}$ ;  $Y_{X/N}$ ,  $7,76 \text{ g}_{X_t} \text{ g}_N^{-1}$  e  $Y_{P/S}$ ,  $0,40 \text{ g}_P \text{ g}_S^{-1}$ . Contudo, a velocidade específica de produção de PHB ( $\mu_P$ ) (Figura 4.41) foi a maior entre todos os cultivos anteriores, atingindo  $0,08 \text{ g}_P \text{ g}_{X_r}^{-1} \text{ h}^{-1}$  após a exaustão da fonte de nitrogênio. Desse modo, a produtividade em PHB deste cultivo foi  $0,31 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Boeira (2018), no cultivo de *C. necator* glpFK na temperatura de  $30^\circ \text{C}$  e utilizando glicerina bruta, reporta o mesmo valor para  $\mu_{P_{\max}}$ . Já Schmidt et al. (2015) apresentam o valor de  $0,11 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  na produção de PHB por *C. necator* DSM 545 a partir de glicose. A velocidade específica de produção de PHB ( $\mu_P$ ) alcançou a  $0,08 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e, em seguida, diminuiu, permanecendo em torno de  $0,03 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  por

mais de 30 h, até sofrer nova redução antes da finalização do cultivo.

Figura 4.41: Velocidade específica de consumo de glicerol ( $\mu_S$ ), de crescimento celular residual ( $\mu_{X_r}$ ) e de produção de PHB ( $\mu_P$ ) ao longo do cultivo G. Linha pontilhada vertical representa o momento da exaustão da fonte de nitrogênio

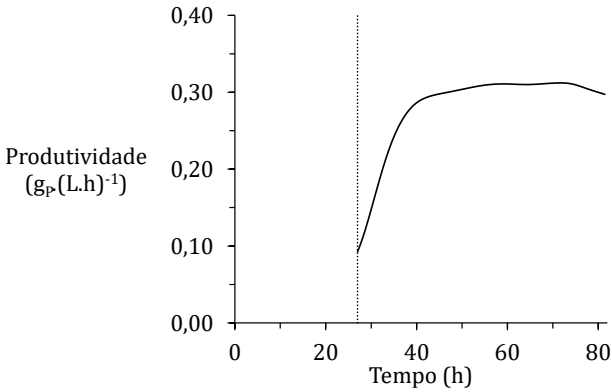


Fonte: autor (2019).

Na Figura 4.42 pode ser observado que a produtividade do cultivo aumenta até atingir um platô, o qual permanece até praticamente o final do experimento, em consequência do baixo  $\mu_P$  após 40 h de cultivo. Já foi reportado na literatura que, por mais que a limitação da fonte de nitrogênio estimule a produção de PHB, a deficiência total deste nutriente provoca uma perda da atividade microbiana responsável pelo acúmulo de biopolímero (ARAGAO et al., 1996; GROUSSEAU et al., 2013). Na Figura 4.43 pode ser observado que  $\mu_P$  aumenta com a redução de  $\mu_{X_r}$  até atingir valor máximo e, por conseguinte, decresce rapidamente. Os autores do estudo citado apresentam como solução a alimentação do meio com fonte de nitrogênio a fim de proporcionar um ligeiro crescimento celular, mantendo  $\mu_P$  em valores próximos ao máximo.

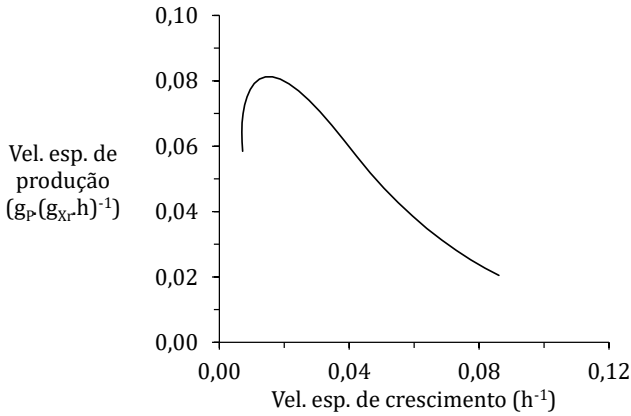


Figura 4.42: Produtividade ao longo do cultivo G.



Fonte: autor (2019).

Figura 4.43: Velocidade específica de produção de PHB ( $\mu_p$ ) em função da velocidade específica de crescimento ( $\mu_{x_r}$ ).

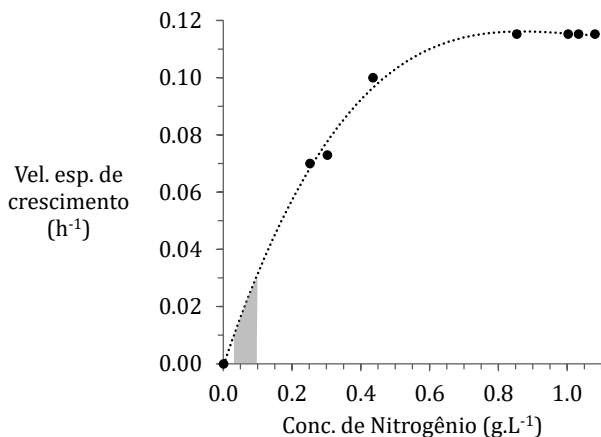


Fonte: autor (2019).

## 4.7 Alimentação com nitrogênio na fase de produção (Cultivo H)

Visando manter  $\mu_P$  tão próximo quanto possível de seu valor máximo, o intervalo de valores para  $\mu_{X_r}$  necessário para tal, foi definido de acordo com os dados experimentais do cultivo G. Este intervalo compreende os valores de  $\mu_{X_r}$  entre 0,03 e 0,01  $\text{h}^{-1}$  (Figura 4.43). Para a definição do intervalo de concentração de nitrogênio correspondente ao intervalo de  $\mu_{X_r}$ , uma equação de terceiro grau foi ajustada e pode ser observada na Figura 4.44.

Figura 4.44: Velocidade específica de crescimento em função da concentração de nitrogênio no cultivo G. A linha pontilhada representa o ajuste de uma equação polinomial de 3º grau e a área hachurada representa a região de operação almejada na fase de produção de PHB.



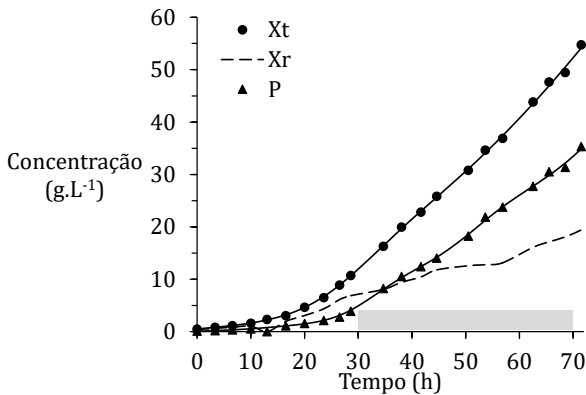
Fonte: autor (2019).

O intervalo de concentração de nitrogênio almejado para esta finalidade foi de 0,10 a 0,05  $\text{g.L}^{-1}$ . Ressalta-se que a alimentação à vazão constante da fonte de nitrogênio resulta em um crescimento linear da biomassa residual e, por consequência, provoca uma redução gradual de

$\mu_{X_r}$ . A vazão de alimentação foi definida a partir da estratégia de controle *feed-forward*, descrita em O'Connor, Sanchez-Riera e Cooney (1992). A partir do conhecimento prévio da concentração inicial de nitrogênio ( $N_0$ ),  $\mu_{X_{r,max}}$  e  $Y_{X/N}$ , pôde-se estimar o momento em que a concentração estimada de nitrogênio seria  $0,10 \text{ g L}^{-1}$  e, portanto, o instante de início da alimentação de ureia. Para o cultivo H, em que  $N_0$  foi de  $0,8 \text{ g L}^{-1}$ , a alimentação foi iniciada na vigésima oitava hora de cultivo.

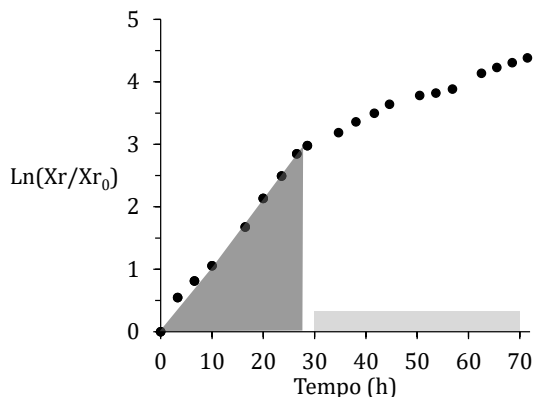
Na Figura 4.45 é apresentada a cinética de crescimento celular e acúmulo de biopolímero, em que pode-se constatar que houve de fato crescimento linear após o início da operação da bomba de alimentação (representada pela área hachurada). Já na Figura 4.46, observa-se crescimento exponencial desde o início do cultivo até a vigésima oitava hora. A velocidade específica de crescimento nesta fase foi de  $0,10 \text{ h}^{-1}$ , valor menor ao obtido anteriormente (Cultivo G,  $0,12 \text{ h}^{-1}$ ) possivelmente devido à presença de fosfato em concentração limitante. Neste cultivo, a concentração de biomassa total atingida foi de  $54,7 \text{ g L}^{-1}$ , contendo 65% de PHB ( $X_r = 19,4 \text{ g L}^{-1}$  e  $P = 35,3 \text{ g L}^{-1}$ ).

Figura 4.45: Curvas de crescimento celular total ( $X_t$ ) e residual ( $X_r$ ) e concentração de PHB ( $P$ ) ao longo do cultivo H. Área hachurada representa o período de alimentação.



Fonte: autor (2019).

Figura 4.46: Variação do logaritmo natural da concentração celular residual com o tempo no cultivo H. Área hachurada corresponde ao período considerado como crescimento em fase exponencial e área em cinza claro ao período de alimentação.



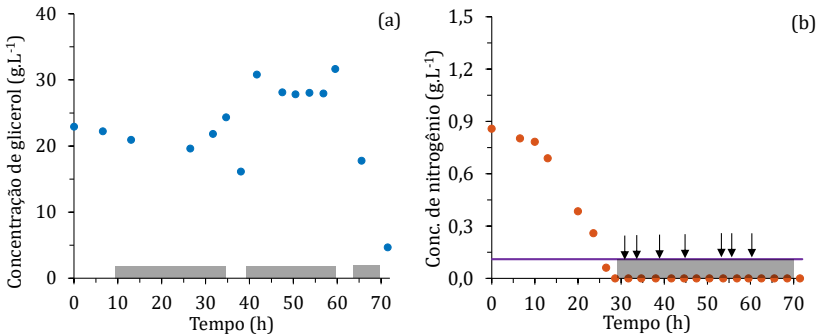
Fonte: autor (2019).

A alimentação em glicerol ( $700 \text{ g L}^{-1}$ ) foi feita de forma contínua a partir da décima hora de cultivo (Figura 4.47a) a vazão de  $3,7 \text{ mL h}^{-1}$ . Com o objetivo de manter sua concentração constante, a vazão foi elevada de acordo com a estimativa da concentração de biomassa total. Esta estimativa foi realizada por meio da leitura da absorbância da amostra de caldo (conforme curva de calibração - Figura A.1, página 183). Uma tendência de elevação na concentração de glicerol foi observada em torno da 35ª hora e por isso, a operação da bomba foi suspensa por algumas horas e retomada logo em seguida. Todavia, a concentração foi estabilizada em torno de  $28 \text{ g L}^{-1}$ , valor superior ao desejado, porém não o suficiente para induzir a inibição do crescimento. O cultivo foi finalizado após cessar o fornecimento de glicerol e seu consumo total no meio. O fator de conversão de glicerol em biomassa foi  $0,46 \text{ g}_s \text{ g}_{X_r}^{-1}$  (Figura B.7, página 193).

Ainda na Figura 4.47, observa-se também o consumo de nitrogênio ao longo do tempo. Pode ser verificado que a vazão estimada de  $7,0 \text{ mL h}^{-1}$  (solução  $16 \text{ g L}^{-1}$ ) não foi suficiente para manter a concentração deste nutriente nos valores ótimos. Isto requereu frequentes intervenções

corretivas, realizadas pelo acionamento da bomba a sua vazão máxima até que a concentração de nitrogênio retomasse o valor desejado. Tais medidas são indicadas pelas setas na Figura 4.47b. Ainda assim, o nitrogênio não acumulou no meio. Por outro lado, o objetivo de conduzir o cultivo mantendo  $\frac{dX_r}{dt}$  constante foi atingido, como apresentado na Figura 4.48. Melhores resultados poderiam ser atingidos com o uso de uma célula de carga e controlador PID incorporados ao biorreator, de modo a controlar a vazão de alimentação com maior precisão.

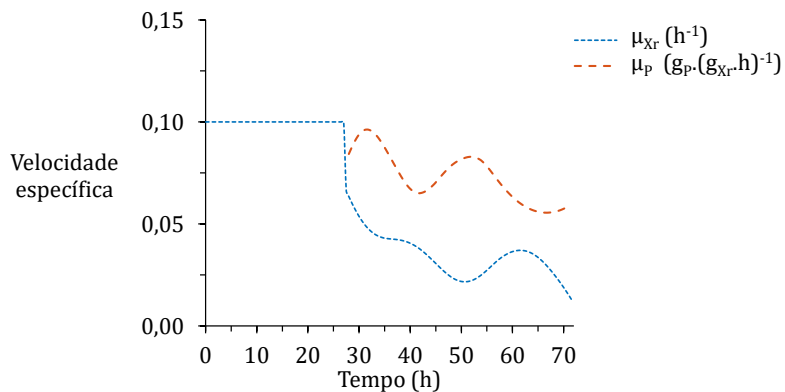
Figura 4.47: Variação da concentração de (a) glicerol e (b) nitrogênio ao longo do cultivo H. A área hachurada representa o período de funcionamento da bomba de alimentação.



Fonte: autor (2019).

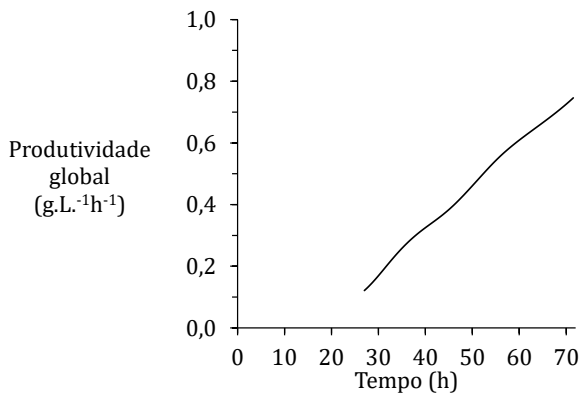
Diferentemente dos ensaios anteriores, a velocidade de produção foi mantida próxima à seu valor máximo, proporcionando elevadas concentrações de biomassa residual e de PHB. Por consequência, conseguiu-se atingir uma produtividade de  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , 2,4 vezes maior que no cultivo G (Figura 4.49).

Figura 4.48: Velocidade específica de consumo de glicerol ( $\mu_s$ ), de crescimento celular residual ( $\mu_{X_r}$ ) e de produção de PHB ( $\mu_p$ ) ao longo do cultivo H.



Fonte: autor (2019).

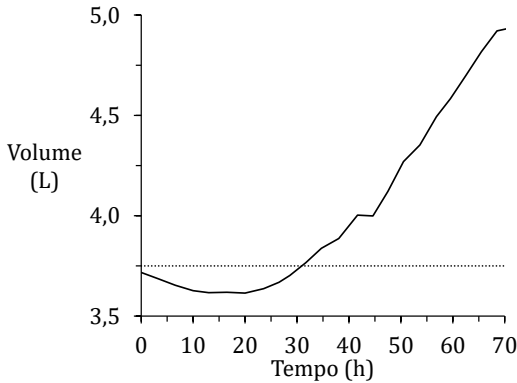
Figura 4.49: Produtividade ao longo do cultivo H.



Fonte: autor (2019).

Apesar da alimentação de nutrientes proporcionar um elevado crescimento e produção de PHB, a capacidade volumétrica do biorreator não permitiu a continuidade do experimento (comportamento apresentado na Figura 4.50).

Figura 4.50: Variação de volume ao longo do cultivo H. A linha pontilhada indica o volume inicial do experimento.



Fonte: autor (2019).

A comparação dos resultados obtidos nos cultivos G e H é apresentada na Tabela 4.6

Tabela 4.6: Síntese das condições empregadas e resultados obtidos nos experimentos G e H.

	Cultivo		Unidade
	G	H	
Modo de operação:	alim.	alim.	-
T	35	35	°C
S <sub>0</sub>	20,1	23,0	g L <sup>-1</sup>
N <sub>0</sub>	1,1	0,9	g L <sup>-1</sup>
Pulso de glicerol	+25+25+15	-	g L <sup>-1</sup>
Vazão de alim.			
N	-	8	mL h <sup>-1</sup>
S	-	15	mL h <sup>-1</sup>
Tempo de cultivo	81	72	h
Adaptação em glicerol	Não	Não	-
$\mu_{X_r, \max}$	0,12	0,10	h <sup>-1</sup>
X <sub>tfinal</sub>	37,6	54,7	g L <sup>-1</sup>
X <sub>rfinal</sub>	13,5	19,4	g L <sup>-1</sup>
P <sub>final</sub>	24,3	35,3	g L <sup>-1</sup>
Y <sub>X/S</sub>	0,43	0,46	g <sub>X<sub>r</sub></sub> g <sub>S</sub> <sup>-1</sup>
Y <sub>X/N</sub>	7,76	7,90	g <sub>X<sub>r</sub></sub> g <sub>N</sub> <sup>-1</sup>
Y <sub>P/S</sub>	0,40	0,31	g <sub>P</sub> g <sub>S</sub> <sup>-1</sup>
Prod. utividade em PHB	0,31	0,75	g <sub>P</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Acúmulo de PHB	65	65	%
$\mu_{P, \max}$	0,08	0,10	g <sub>P</sub> g <sub>X<sub>r</sub></sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Q <sub>O<sub>2</sub></sub> X <sub>r, max</sub>	400	294	mg <sub>O<sub>2</sub></sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Q <sub>O<sub>2</sub></sub> max	90	93	mg <sub>O<sub>2</sub></sub> g <sub>X<sub>r</sub></sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>

Fonte: autor (2019)



## 4.8 Proposta de modelo

A partir dos balanços de massa e de conhecimento prévio sobre o comportamento do metabolismo celular no que diz respeito à presença e à ausência de nutrientes no meio, foi proposto o modelo descrito pelas Equações 4.1 a 4.9. Este pode ser classificado como: a parâmetros concentrados, não-segregado e não-estruturado.

Assim como no Capítulo 2, a biomassa foi representada como PHB e biomassa residual. A partir do balanço de massa em um sistema com variação de volume, a Equação 4.1 descreve a evolução da concentração de biomassa residual ( $X_r$ ) ao longo do tempo.

$$\frac{dX_r}{dt} = X_r \mu_{X_r} - \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} X_r \quad (4.1)$$

Sendo:

- $X_r$  Concentração de biomassa residual ( $g L^{-1}$ );
- $\mu_{X_r}$  Velocidade específica de crescimento celular ( $h^{-1}$ );
- $V$  Volume de meio (L).

O termo referente à variação de volume foi obtido a partir da regra da cadeia, sendo que os dados experimentais de adição e remoção de meio, isto é, soluções de controle de pH, nutrientes e coleta de amostras, podem ser incorporados ao modelo. A variação do volume em função do tempo ( $\frac{dV}{dt}$ ) é dada pela definição da derivada (Equação 4.2). Quanto à velocidade específica de crescimento celular (Equação 4.3),  $\mu_{X_r}$ , esta é função da velocidade específica máxima,  $\mu_{X_r,MAX}$ , e das fontes de carbono e nitrogênio disponíveis no meio.

$$\frac{dV}{dt} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{V_{t+\Delta t} - V_t}{\Delta t} \quad (4.2)$$

$$\mu_{X_r} = \mu_{X_r,MAX} \frac{S}{(K_{xs} + S)} \frac{N}{(K_{xn} + N)} \quad (4.3)$$

Sendo:

- $\mu_{X_{r\max}}$  Velocidade específica de crescimento celular na fase exponencial ( $h^{-1}$ );  
 S Concentração de glicerol ( $g L^{-1}$ );  
 $K_{xs}$  Constante de afinidade entre glicerol e biomassa ( $g L^{-1}$ );  
 N Concentração de nitrogênio ( $g L^{-1}$ );  
 $K_{xn}$  Constante de afinidade entre nitrogênio e biomassa ( $g L^{-1}$ ).

Ao longo de um cultivo, a variação da concentração de produto é dada pela Equação 4.4 e, de modo semelhante a Equação 4.1, o termo relativo a diluição do meio é incorporado ao modelo. A velocidade específica de produção de PHB (Equação 4.5) não sofre influência da velocidade específica de crescimento (produção não-associada). Contudo, as concentrações de glicerol e nitrogênio, bem como a quantidade de PHB já armazenada intracelularmente ( $f_p$ ), são determinantes na velocidade de biosíntese. Conforme reportado por Lee, Choi e Wong (1999), a capacidade máxima de acúmulo para *C. necator* DSM 545 é de aproximadamente 80% ( $f_{p\max} = 4$ ). Uma vez que na produção da cepa recombinante *C. necator* glpFK não foram realizadas modificações nos genes responsáveis pela síntese e acúmulo de PHB, o mesmo valor foi utilizado como referência.

$$\frac{dP}{dt} = X_r \mu_p - \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} P \quad (4.4)$$

$$\mu_p = \mu_{p\max} \frac{S}{(K_{ps} + S)} \left( 1 - \frac{N}{(K_{pn} + N)} \right) \left[ 1 - \left( \frac{f_p}{f_{p\max}} \right)^\theta \right] \quad (4.5)$$

$$f_p = P/X_r \quad f_{p\max} = 4$$

Sendo:

- P Concentração de PHB ( $g L^{-1}$ );  
 $\mu_p$  Velocidade específica de produção de PHB ( $g_p g_{X_r}^{-1} h^{-1}$ );  
 $\mu_{p\max}$  Velocidade esp. de produção de PHB ( $g_p g_{X_r}^{-1} h^{-1}$ );  
 $\theta$  Expoente que define o comportamento da curva (-).

Os fatores de conversão de substrato em PHB e biomassa residual relacionam o consumo específico de substrato à atividade celular, descrita

em termos de  $\mu_{x_r}$  e  $\mu_p$ , como apresentado na Equação 4.6. O consumo de substrato para manutenção celular nesta equação é representado pelo termo  $m_s$ . Já o consumo global da fonte de carbono e nitrogênio é dado pelas Equações 4.7 e 4.8, respectivamente.

$$\mu_s = \frac{\mu_{x_r}}{Y_{x/s}} + \frac{\mu_p}{Y_{p/s}} + m_s \quad (4.6)$$

$$\frac{dS}{dt} = -X_r \mu_s - \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} S \quad (4.7)$$

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{X_r \mu_{x_r}}{Y_{x/n}} - \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} N \quad (4.8)$$

Sendo:

- $Y_{X/S}$  Fator de conversão de glicerol em biomassa ( $g_{x_r} g_s^{-1}$ );
- $Y_{P/S}$  Fator de conversão de glicerol em PHB ( $g_p g_s^{-1}$ );
- $m_s$  Consumo de substrato para manutenção celular ( $mg g^{-1} L^{-1}$ );
- $Y_{X/N}$  Fator de conversão de nitrogênio em biomassa ( $g_{x_r} g_N^{-1}$ ).

De modo semelhante, os fatores de conversão de oxigênio em PHB e biomassa residual, assim como o  $m_o$ , relacionam a atividade celular à velocidade específica de consumo de oxigênio (Equação 4.9). Abordagem, esta, análoga à proposta por Pirt (1982).

$$Q_{O_2} = \frac{\mu_{x_r}}{Y_{x/o}} + \frac{\mu_p}{Y_{p/o}} + m_o \quad (4.9)$$

Sendo:

- $Q_{O_2}$  Velocidade específica de consumo de oxigênio ( $mg_{O_2} g_{x_r}^{-1} h^{-1}$ );
- $Y_{X/O}$  Fator de conversão de oxigênio em biomassa ( $g_{x_r} g_{O_2}^{-1}$ );
- $Y_{P/O}$  Fator de conversão de oxigênio em PHB ( $g_p g_{O_2}^{-1}$ );
- $m_o$  Consumo de oxigênio para manutenção celular ( $mg g^{-1} L^{-1}$ ).

A concentração de oxigênio dissolvido no meio (Equação 4.10) é determinada pelo coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ),

força motriz para o transporte de oxigênio gasoso para a fase líquida e seu consumo pelos microrganismos.

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_s - C) - Q_{O_2} X_r - \frac{dV}{dt} C \quad (4.10)$$

Sendo:

- $k_L a$  Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $s^{-1}$ );
- $C$  Concentração de oxigênio dissolvido ( $mg L^{-1}$ );
- $C_s$  Concentração de oxigênio dissolvido na saturação ( $mg L^{-1}$ ).

Esta é a primeira vez que a concentração de oxigênio dissolvido é descrita na produção de PHB. A incorporação da velocidade específica de produção de PHB ( $\mu_P$ ) no termo  $Q_{O_2}$  visa descrever o consumo de oxigênio quando não há crescimento celular. Além disso, a descrição de  $\mu_P$  em termos das concentrações de glicerol e nitrogênio não é frequentemente encontrada na literatura. Outra vantagem do modelo proposto é a capacidade de contabilizar a variação de volume devido à adição de soluções e coleta de amostras.

A respeito da viabilidade das hipóteses assumidas na elaboração do modelo, observou-se que:

- Em nenhum cultivo houve uma variação maior que  $0,2^\circ C$ , podendo considerar a temperatura como constante ao longo do tempo;
- sabe-se que, em reatores de grande capacidade, pode ocorrer a heterogeneidade de nutrientes e biomassa ao longo do tanque. Contudo, dado o pequeno volume do biorreator empregado neste estudo, entendeu-se como razoável considerar o meio sendo homogêneo;
- o biorreator utilizado era equipado com condensador para evitar a perda de meio por evaporação. Mesmo assim, ao final do condensador, foi instalado um recipiente para coleta em caso de transbordamento de meio. Neste, foi observada a condensação de, aproximadamente, 10 mL de meio ao final de um cultivo, volume considerado negligenciável.

## 4.9 Determinação de parâmetros

As constantes de afinidade ( $K_{xs}$ ,  $K_{xn}$ ,  $K_{ps}$ ,  $K_{pn}$ ) foram determinadas pela linearização de Eadie Hofstee e são apresentadas na Tabela 4.7 juntamente com o valor do fator de correlação do ajuste linear aos dados experimentais ( $R^2$ ).

Tabela 4.7: Parâmetros cinéticos obtidos a partir de ajustes aos dados experimentais.

Parâmetro	Valor	$R^2$	Equação
$K_{xn}$	0,20 $g L^{-1}$	0,99	4.3
$K_{xs}$	2,68 $g L^{-1}$	0,13	4.3
$\mu_{XrMAX}$	0,17 $h^{-1}$	0,13	4.3
$K_{ps}$	3,50 $g L^{-1}$	0,96	4.5
$K_{pn}$	0,04 $g L^{-1}$	0,89	4.5
$\mu_{Pmax}$	0,08 $g_P g_{Xr}^{-1} h^{-1}$	0,96	4.5
$\theta$	0,80 -	-*	4.5
$Y_{X/O}$	1,93 $g g^{-1}$	$7,6 \cdot 10^{-3**}$	4.9
$Y_{P/O}$	3,34 $g g^{-1}$	$7,6 \cdot 10^{-3**}$	4.9
$m_o$	$2,33 \cdot 10^{-3}$ $g g^{-1} h^{-1}$	$7,6 \cdot 10^{-3**}$	4.9

\*Dados insuficientes. Estimado por ajuste visual.

\*\*RMSE do ajuste da Equação 4.9 aos dados experimentais.

Fonte: autor (2019).

Com exceção da constante de afinidade entre a fonte de carbono e a biomassa residual,  $K_{xs}$ , os parâmetros foram estimados de modo satisfatório, tendo em vista o elevado fator de correlação. Ao que concerne os parâmetros relacionados ao consumo de oxigênio ( $Y_{X/O}$ ,  $Y_{P/O}$  e  $m_o$ ), o ajuste da Equação 4.9 foi realizado pela minimização da raiz do erro quadrático médio (RMSE) pelo método do gradiente reduzido generalizado (GRG).

## 4.10 Análise de sensibilidade

A definição do método de AS foi realizada levando em consideração o tipo de modelo avaliado. O que significa que, por se tratar de um modelo não-linear no qual a relação entre um parâmetro (desconsiderando-se o efeito dos demais) e a grandeza de saída é monotônica, o coeficiente de correlação parcial de postos (PRCC) é o mais adequado e, portanto, foi selecionado para a análise. O intervalo de variação das grandezas de entrada, apresentado na Tabela 3.4 (página 73), foi definido de modo a corresponder a valores factíveis para o metabolismo de *C. necator*. A partir da matriz de valores gerada por LHS, determinou-se os PRCC para diferentes números de amostra (N) no último instante de cultivo para definir seu valor ideal para dar seqüência à análise (Tabela 4.8).

Tabela 4.8: PRCC no tempo  $t = 60$  h em relação à concentração de PHB para diferentes números de amostra.

N	$C_s$	$K_{pn}$	$K_{ps}$	$K_{xn}$	$K_{xs}$	$Y_{P/O}$	$Y_{P/S}$	$Y_{X/N}$
250	0,068	0,342	-0,241	-0,608	-0,231	-0,004	0,353	-0,330
500	-0,021	0,365	-0,161	-0,618	-0,359	0,011	0,302	-0,318
1.000	0,041	0,408	-0,254	-0,628	-0,262	0,016	0,330	-0,388
2.000	-0,031	0,372	-0,201	-0,597	-0,280	0,007	0,269	-0,393
4.000	-0,009	0,394	-0,218	-0,615	-0,260	-0,026	0,292	-0,333
5.000	0,002	0,382	-0,238	-0,617	-0,292	0,023	0,309	-0,382
7.500	0,001	0,396	-0,243	-0,619	-0,289	0,011	0,311	-0,354
10.000	-0,003	0,390	-0,232	-0,618	-0,315	0,015	0,306	-0,353

Fonte: autor (2019).

Observa-se que, para o módulo dos valores de PRCC elevados, um número de amostras superior a 2.000 não resulta em alteração significativa do coeficiente de correlação. Já para os parâmetros em que o PRCC é próximo de zero, a variação persiste, mesmo em uma amostragem de 10.000 casos. Contudo, a análise para tal situação requer uma elevada capacidade computacional e tempo de execução. Dessa forma, definiu-se o número de amostras de 5.000 casos como o mais adequado para o estudo, dado que um maior número de casos não provocaria alterações na análise estatística. A partir desta definição, o PRCC foi determinado a cada 15 min em um cultivo de 60 h em função da concentração de biomassa residual,

Tabela 4.9: Continuação - PRCC no tempo  $t = 60$  h em relação à concentração de PHB para diferentes números de amostra.

N	$Y_{X/O}$	$Y_{X/S}$	$m_o$	$m_s$	$\mu_{Pmax}$	$\mu_{XrMAX}$	$\theta$
250	-0,070	0,399	0,026	-0,054	0,430	0,650	0,641
500	-0,008	0,360	0,027	-0,040	0,497	0,672	0,608
1.000	-0,045	0,397	-0,014	-0,021	0,557	0,714	0,638
2.000	0,006	0,375	-0,011	0,017	0,507	0,684	0,610
4.000	0,059	0,343	0,000	-0,017	0,492	0,684	0,602
5.000	0,021	0,359	0,004	0,012	0,520	0,678	0,604
7.500	-0,004	0,360	-0,009	-0,004	0,506	0,681	0,622
10.000	0,017	0,359	-0,015	0,003	0,507	0,681	0,627

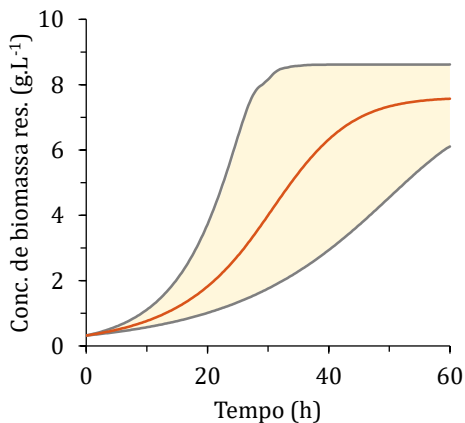
Fonte: autor (2019).

PHB e oxigênio dissolvido. Os resultados desta análise estão apresentados nas Figuras 4.51 a 4.57.

Pode-se observar na Figura 4.51 que o intervalo de valores de biomassa residual obtidos a partir de 5.000 simulações tem origem no mesmo valor de concentração inicial ( $0,32 \text{ g L}^{-1}$ ) e se amplia gradativamente devido às diferenças numéricas entre as grandezas de entrada a cada caso simulado. O platô atingido pelo limite superior se deve à exaustão da fonte de nitrogênio ( $N_0$  igual a  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ). A concentração média de biomassa residual ao final das 60 h de cultivo foi de aproximadamente  $7,6 \text{ g L}^{-1}$ .

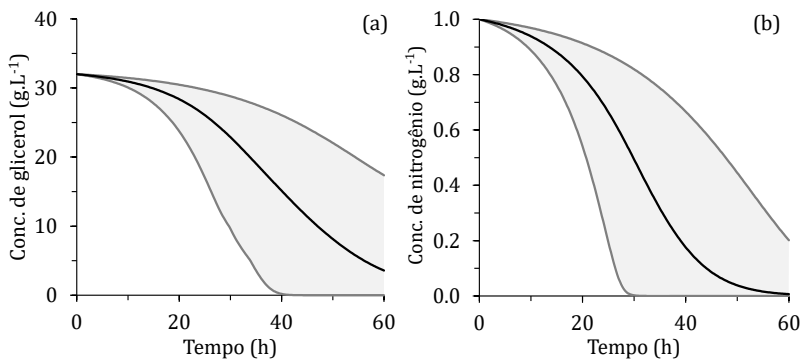
Para uma avaliação robusta do modelo, considerou-se um tempo de cultivo longo para assegurar que o glicerol e nitrogênio fossem totalmente consumidos em um grande número de casos. A evolução das concentrações destes nutrientes ao longo dos diferentes casos pode ser observada na Figura 4.52.

Figura 4.51: Intervalo dos valores e média aritmética da concentração biomassa residual ( $X_r$ ) obtidos a partir de 5.000 amostras.



Fonte: autor (2019).

Figura 4.52: Intervalo dos valores e média aritmética das concentrações de glicerol e nitrogênio obtidas a partir de 5.000 amostras.



Fonte: autor (2019).

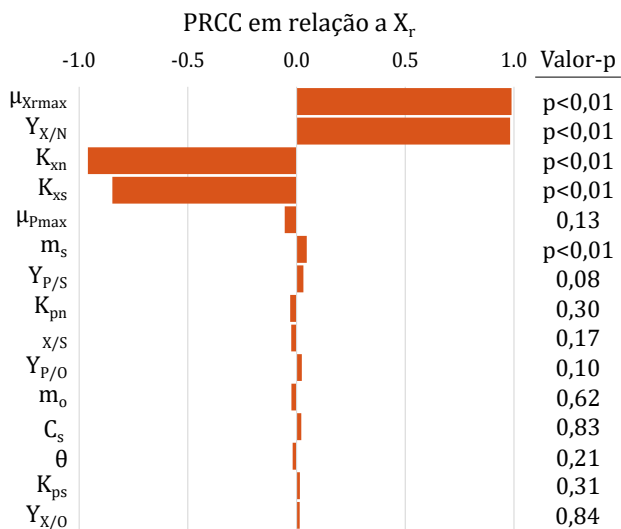


A sensibilidade da grandeza de saída à um determinado parâmetro varia ao longo do cultivo em virtude das alterações metabólicas provenientes da disponibilidade de substrato no meio. Assim, optou-se pela avaliação do PRCC em diferentes tempos e a apresentação do valor máximo ou mínimo para cada grandeza de entrada, conforme Figura 4.53. Os parâmetros de maior influência e estatisticamente diferentes de zero ( $p < 0,05$ ) foram: velocidade específica de crescimento na fase exponencial ( $\mu_{X_{T_{MAX}}}$ ); constantes de afinidade entre nitrogênio e glicerol e biomassa residual ( $K_{X_N}$  e  $K_{X_S}$ ); fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual ( $Y_{X/N}$ ) e o consumo de substrato para manutenção celular ( $m_s$ ).

Referente à  $\mu_{X_{T_{MAX}}}$ , a grande influência na concentração de biomassa residual já era prevista, visto que seu valor numérico representa quão rápido a biomassa é gerada. Por outro lado,  $K_{X_N}$  descreve o comportamento da velocidade específica de crescimento a baixas concentrações da fonte de nitrogênio e, por consequência, a quantidade de biomassa produzida. Da mesma maneira,  $K_{X_S}$  indica o comportamento de  $\mu_{X_r}$  a baixas concentrações de carbono no meio.  $Y_{X/N}$  indica a capacidade celular de converter nitrogênio em biomassa residual. Os valores de PRCC para este fator de conversão foram menores que 0,2 até a trigésima hora de cultivo, momento a partir do qual a fonte de nitrogênio não mais se encontra em excesso. Logo,  $X_r$  demonstrou uma sensibilidade progressiva, até atingir o valor de 0,98.

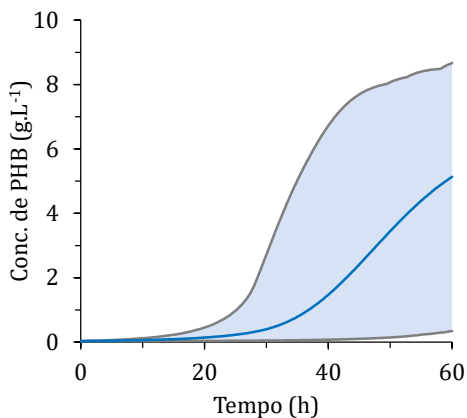
O mesmo procedimento analítico foi realizado visando avaliar a sensibilidade da concentração de PHB aos parâmetros do modelo (Figuras 4.54 e 4.55). A partir das mesmas condições iniciais, foi observado um acúmulo de PHB significativo somente após a vigésima quinta hora. Além disso, pode-se observar que o intervalo de valores atingidos para esta grandeza foi de 0,3 a 8,7 g L<sup>-1</sup>.

Figura 4.53: Maiores valores de PRCC dos parâmetros do modelo em relação a concentração de biomassa residual ( $X_r$ ).



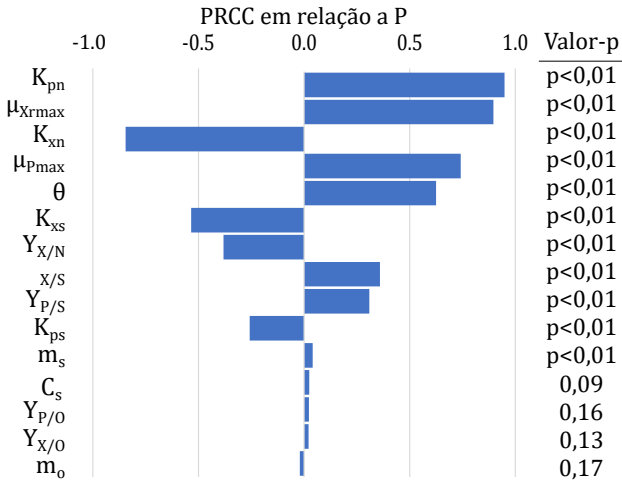
Fonte: autor (2019).

Figura 4.54: Intervalo dos valores e média aritmética da concentração de PHB (P) obtidos a partir de 5.000 amostras.



Fonte: autor (2019).

Figura 4.55: Maiores valores de PRCC dos parâmetros do modelo em relação a concentração de PHB (P).



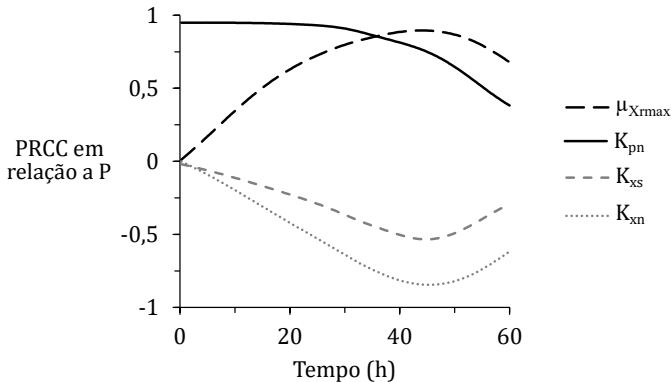
Fonte: autor (2019).

Com exceção dos parâmetros relacionados à transferência de oxigênio, os demais apresentaram grande influência em P (Figura 4.55). O resultado a respeito destes parâmetros não-influente é coerente com o modelo proposto, já que a concentração de oxigênio dissolvido não está matematicamente relacionada à produção de PHB.

Na Figura 4.56 são apresentados os valores de PRCC ao longo do tempo apenas para os parâmetros cuja influência sobre P sofreu maior variação. A concentração de biopolímero é muito sensível à  $K_{pn}$ , enquanto a fonte de nitrogênio está em excesso (Figura 4.52b), o que indica quão rápido ocorre a síntese de biopolímero enquanto há crescimento celular. Todavia, este parâmetro perde importância quando a disponibilidade de nitrogênio é baixa. Contrariamente, os parâmetros  $\mu_{Xrmax}$ ,  $K_{xs}$ ,  $K_{xn}$  iniciam o cultivo com baixo PRCC e suas influências sobre P se elevam ao longo do tempo. O PRCC de  $\mu_{Xrmax}$  apresenta valor positivo, ou seja, quanto maior o valor deste parâmetro (em  $h^{-1}$ ) em um cultivo, mais rápido o nitrogênio será consumido e, portanto, mais rápido se iniciará à fase de

produção de PHB. O mesmo raciocínio pode ser empregado na análise dos coeficientes de afinidade,  $K_{x_s}$  e  $K_{x_n}$ , com a ressalva que sua influência sobre P é negativa.

Figura 4.56: Evolução dos valores de PRCC dos parâmetros do modelo que mais sofreram variação em relação a concentração de PHB (P).

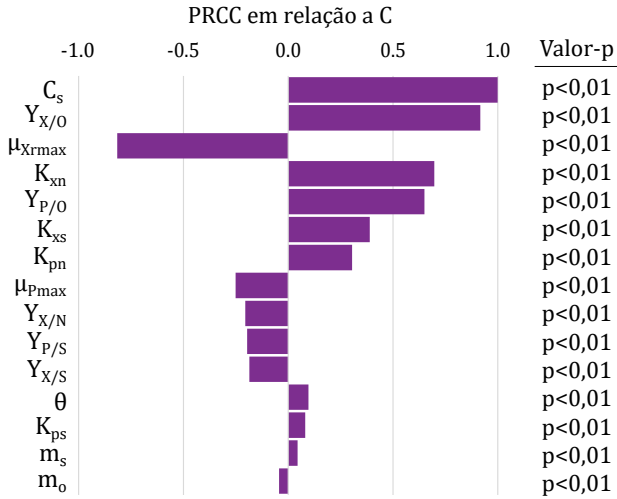


Fonte: autor (2019).

Como previsto, todos os parâmetros avaliados apresentaram influência significativa sobre C (Figura 4.57). Este comportamento é proveniente da relação entre  $Q_{O_2}$  e as velocidades específicas  $\mu_{X_r}$  e  $\mu_p$ . Nota-se que  $m_o$  apresentou PRCC baixo, implicando uma baixa influência sobre C apesar de sua relação direta com a velocidade específica de consumo de oxigênio.

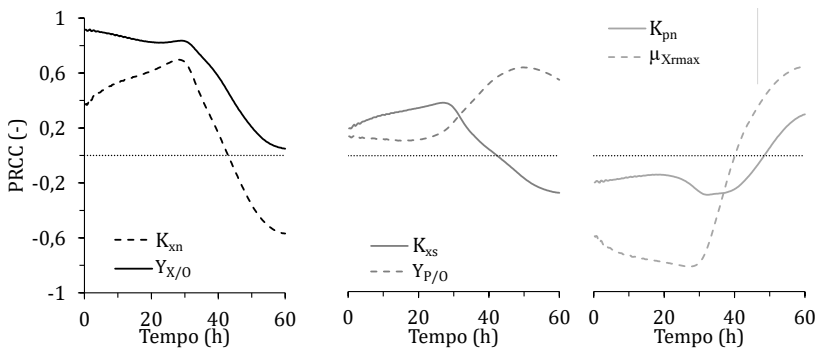
A sensibilidade de C em relação à  $Y_{X/O}$  é grande ao longo da fase de crescimento celular (Figura 4.58), já que elevados valores de  $\mu_{X_r}$  resultam em alto consumo de oxigênio. De maneira análoga,  $Y_{P/O}$  se torna mais relevante à C somente durante a fase de produção de PHB. O mesmo raciocínio empregado na avaliação dos valores de PRCC em relação à  $X_r$  e P pode ser utilizado para C, visto que o consumo de oxigênio é matematicamente dependente do comportamento celular quanto ao crescimento e produção de PHB.

Figura 4.57: Maiores valores de PRCC dos parâmetros do modelo em relação a concentração de oxigênio dissolvido (C).



Fonte: autor (2019).

Figura 4.58: Evolução dos valores de PRCC dos parâmetros do modelo que mais sofreram variação em relação a concentração de oxigênio dissolvido (C).



Fonte: autor (2019).

Além da avaliação do modelo, a análise de sensibilidade teve como objetivo a seleção dos parâmetros a serem otimizados. Em virtude da sua baixa influência sobre as grandezas de saída,  $m_s$  e  $m_o$  foram considerados nulos nas Equações 4.6 e 4.9 (página 130). Os demais parâmetros foram otimizados.

## 4.11 Minimização do erro

Por meio da minimização do rRMSE entre os valores preditos e observados experimentalmente, foi realizada a otimização dos valores dos parâmetros do modelo. O universo de busca para cada parâmetro foi similar aos intervalos apresentados na Tabela 3.4, exceto pelos parâmetros  $C_s$ ,  $m_s$  e  $m_o$ , que não foram otimizados. O cultivo G foi selecionado como ponto de partida para o treinamento do modelo em virtude dos seguintes eventos ao longo do cultivo:

1. a temperatura e concentrações iniciais de glicerol e nitrogênio terem apresentado os melhores resultados de crescimento celular;
2. a ocorrência de baixa concentração de glicerol no meio ( $<10 \text{ g L}^{-1}$ ) e não limitação em nitrogênio;
3. a exaustão da fonte de nitrogênio em excesso de glicerol;
4. um longo período de fase de produção;
5. baixa concentração de glicerol na fase de produção;
6. alta disponibilidade de dados relacionados ao consumo e à transferência de oxigênio.

Tais eventos contribuíram para uma ampla avaliação dos parâmetros do modelo, o que proporcionou mais informações ao processo de otimização.

Ao total foram realizadas 31.494 avaliações do modelo ao longo de 9 h. O baixo tempo de otimização se deu à capacidade do método de busca padronizada ser paralelizado com grande eficiência. Os valores para as grandezas de entrada do modelo antes e após o processo de otimização são apresentados na Tabela 4.10.

Observa-se uma grande variação entre os valores obtidos experimentalmente e os valores otimizados. A constante de afinidade entre PHB e

Tabela 4.10: Valores das grandezas de entrada antes e após otimização.

Parâmetro	Valor exp.	Valor otim.	Unidade
$K_{pn}$	0,04	0,42	$g L^{-1}$
$K_{ps}$	3,50	0,28	$g L^{-1}$
$K_{xn}$	0,20	0,08	$g L^{-1}$
$K_{xs}$	2,68	3,59	$g L^{-1}$
$Y_{P/O}$	3,34	2,65	$g_p g_{O_2}^{-1}$
$Y_{P/S}$	0,41	0,44	$g_p g_s^{-1}$
$Y_{X/N}$	7,80	8,17	$g_{xr} g_N^{-1}$
$Y_{X/O}$	1,93	1,82	$g_{xr} g_{O_2}^{-1}$
$Y_{X/S}$	0,42	0,46	$g_{xr} g_s^{-1}$
$\mu_{Pmax}$	0,08	0,11	$g_p g_{Xr}^{-1} h^{-1}$
$\mu_{XrMAX}$	0,17	0,15	$h^{-1}$
$\theta$	0,80	0,46	-

Fonte: autor (2019).

a fonte de nitrogênio é significativamente maior que o valor inicialmente atribuído, indicando que a produção de PHB se dá com mais intensidade a baixas concentrações de nitrogênio. Por outro lado,  $K_{ps}$  foi menor, demonstrando que a redução da velocidade de biosíntese ocorre bruscamente quando a fonte de carbono é extinguida. Vale ressaltar que os valores de  $\mu_{Pmax}$  e  $\mu_{XrMAX}$  não correspondem aos encontrados experimentalmente. Porém, quando os demais termos das equações 4.5 e 4.3 (página 128) são levados em consideração para a determinação de  $\mu_p$  e  $\mu_{Xr}$ , respectivamente, os valores encontrados são coerentes.

Na Tabela 4.11 são apresentados os resultados para as funções objetivo antes e depois do processo de otimização para o cultivo G, além dos valores de rRMSE para os demais cultivos avaliados. Dado que a rRMSE é adimensional, os valores obtidos para diferentes grandezas são comparáveis entre si sem a necessidade de normalização. É notável a redução nos valores dos erros para as concentrações de biomassa total e PHB. Contudo, para as concentrações de oxigênio dissolvido e nitrogênio houve um pequeno acréscimo.

Quando o modelo proposto foi posto a prova nos demais cultivos a 35 °C, foi observada uma grande qualidade na predição das concentrações de biomassa total, PHB, glicerol e nitrogênio. Por outro lado, os maiores erros foram na predição da concentração de oxigênio dissolvido. Mais atenção é dada a esta grandeza na seção 4.13 (página 152). Ainda assim, o modelo apresentado se mostrou altamente capaz de prever o comportamento de cultivos para produção de PHB.

Tabela 4.11: Funções objetivo (rRMSE) antes e após otimização para o cultivo G e após otimização para demais cultivos.

Cultivo	Biomassa total	PHB	Oxigênio dissolvido	Glicerol	Nitrogênio
G <sub>antes</sub>	0,19	0,26	0,14	0,07	0,06
G <sub>depois</sub>	0,03	0,18	0,16	0,04	0,09
D	0,10	0,05	0,32	0,09	0,19
H	0,06	0,07	0,33	0,06	0,08

Fonte: autor (2019).

Utilizando o modelo proposto foi planejado um novo cultivo, denominado cultivo I. Ao contrário do cultivo H, neste, as fontes de nitrogênio e glicerol foram unificadas em uma única solução de alimentação, visando evitar o aumento excessivo de volume.



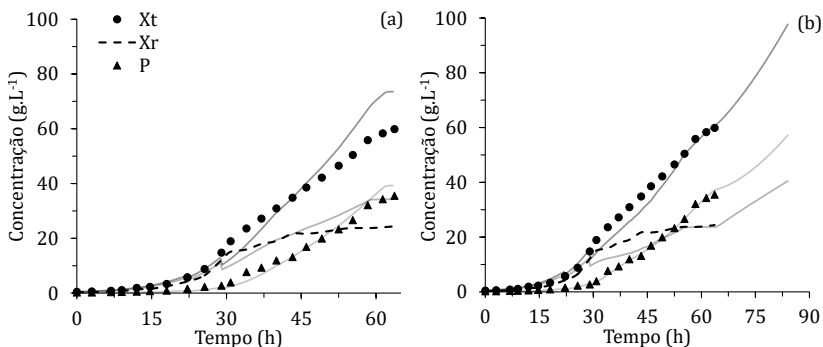
## 4.12 Alimentação com nitrogênio e glicerol em uma única solução (Cultivo I)

Para o cultivo I, a solução de alimentação empregada era composta por  $670,5 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol e  $9,6 \text{ g L}^{-1}$  de nitrogênio. A concentração inicial de nitrogênio foi de  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  e a alimentação foi iniciada na trigésima hora (vazão de  $23,8 \text{ mL h}^{-1}$ ). As evoluções das concentrações de biomassa e PHB esperadas são apresentadas pelas linhas contínuas na Figura 4.59a junto aos dados experimentais obtidos. Contudo, as condições reais de experimento foram relativamente diferentes e o ajuste do modelo a estas condições é apresentado na Figura 4.59b e nas figuras seguintes. Já na Figura 4.60, observa-se crescimento exponencial desde o início do cultivo até a trigésima hora. A velocidade específica de crescimento nesta fase foi de  $0,13 \text{ h}^{-1}$ . Neste cultivo, a concentração de biomassa total atingida foi de  $60,0 \text{ g L}^{-1}$ , contendo 59% de PHB ( $X_r = 24,5 \text{ g L}^{-1}$  e  $P = 35,5 \text{ g L}^{-1}$ ).

Junto à exposição dos dados experimentais deste cultivo, optou-se por estender o ensaio na forma de simulação numérica, em que empregasse uma solução de alimentação com concentrações distintas da utilizada experimentalmente. Este ensaio computacional foi realizado com o intuito de mostrar a capacidade de se atingir elevada concentração de biomassa e PHB. Assim, prolongando o cultivo por mais 23 h, seria possível atingir  $97,7 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa total e  $57,3 \text{ g L}^{-1}$  de PHB (59%).

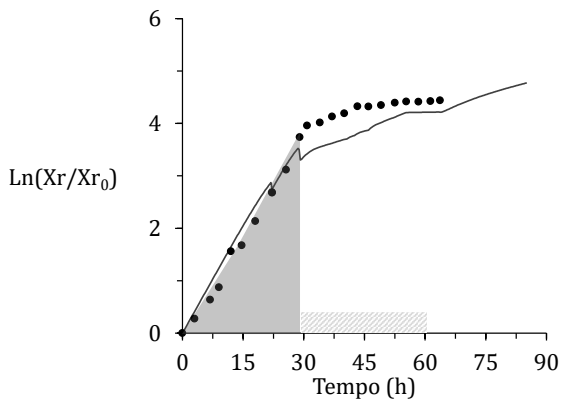
A concentração inicial de glicerol foi de  $18,4 \text{ g L}^{-1}$  (Figura 4.61a) e foram realizados dois pulsos de solução de glicerol visando aumentar a concentração do meio em  $15 \text{ g L}^{-1}$ . Os pulsos foram realizados nos momentos em que a concentração estimada de glicerol no meio era em torno de  $10 \text{ g L}^{-1}$ . Ainda assim, outras adições de glicerol foram necessárias para atingir elevada concentração celular, ou seja, iniciou-se a alimentação contínua.

Figura 4.59: Curvas de crescimento celular total ( $X_t$ ) e residual ( $X_r$ ) e concentração de PHB (P) ao longo do cultivo I. Linhas contínuas representam o ajuste do modelo nas (a) condições operacionais esperadas e (b) nas condições reais de experimento.



Fonte: autor (2019).

Figura 4.60: Variação do logaritmo natural da concentração celular residual com o tempo no cultivo I. Área hachurada corresponde ao período considerado como crescimento em fase exponencial e área em cinza claro ao período de alimentação.

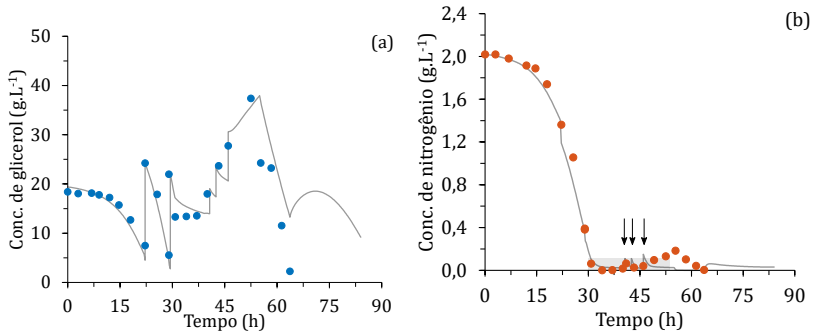


Fonte: autor (2019).

Embora a medida de unificar a soluções de alimentação tenha sido vantajosa para evitar o transbordamento do biorreator, foi verificado que todo o nitrogênio presente no meio foi consumido. Devido a isto, intervenções deliberadas onde a bomba foi operada à vazão máxima para a retomada de sua concentração aos valores ideais foram necessárias (indicadas pelas setas na Figura 4.61b). Como foi preciso mais de uma intervenção, decidiu-se incrementar a vazão da solução de alimentação para manter  $N_e$  e, conseqüentemente,  $\mu_P$ , nos valores ideais. Esta decisão proporcionou um  $\mu_P$  satisfatório (Figura 4.62). Em contrapartida, houve acúmulo de glicerol no meio, situação indesejada, dado que poderia haver inibição do crescimento celular. Nesse sentido, a operação da bomba foi cessada e tanto o glicerol quanto o nitrogênio foram consumidos em sua totalidade, dando fim ao cultivo.

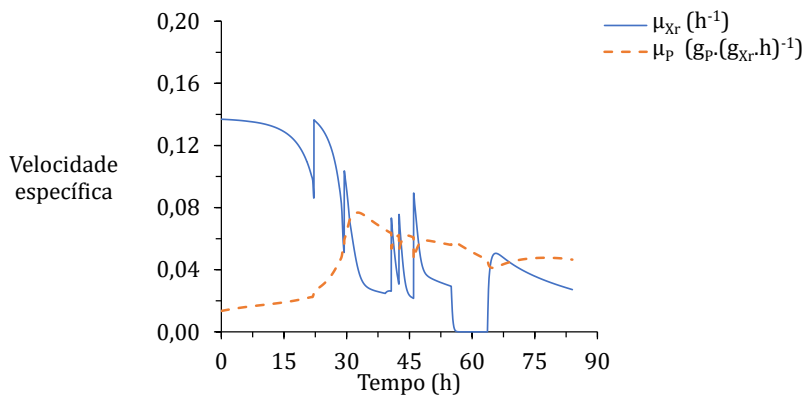
Na continuação computacional deste ensaio, a solução de alimentação possui concentrações de carbono e nitrogênio mais elevadas, resultando em um ligeiro acúmulo de glicerol no meio até que a quantidade de células existentes se torne grande o suficiente para consumir este excesso.

Figura 4.61: Variação da concentração de (a) glicerol e (b) nitrogênio ao longo do cultivo I. Linhas contínuas representam o ajuste do modelo.



Fonte: autor (2019).

Figura 4.62: Velocidade específica de consumo de glicerol ( $\mu_S$ ), de crescimento celular residual ( $\mu_{X_r}$ ) e de produção de PHB ( $\mu_P$ ) ao longo do cultivo I.

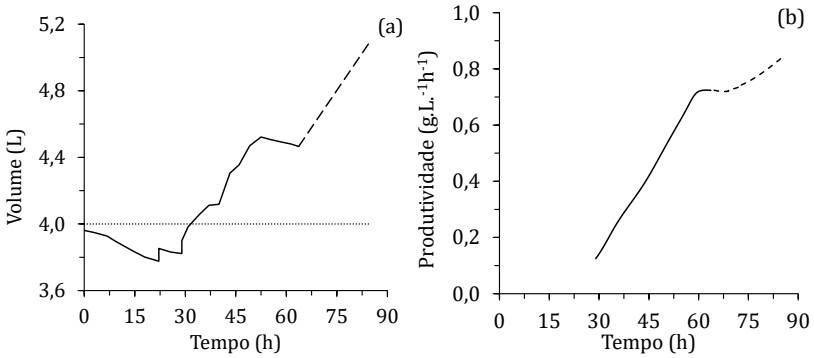


Fonte: autor (2019).

O objetivo de reduzir a variação de volume foi alcançado, dado que o volume final de caldo foi 4,5 L (Figura 4.63), contra 5,0 L do cultivo G. A produtividade do presente cultivo foi de  $0,72 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . No caso simulado, o volume de caldo continuaria a aumentar até atingir a capacidade máxima do biorreator. Da mesma forma, o valor da produtividade também se elevaria, alcançando  $0,84 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Vale ressaltar que a Equação 3.5 (página 66) foi empregada na correção da concentração de PHB para a determinação matemática da produtividade.

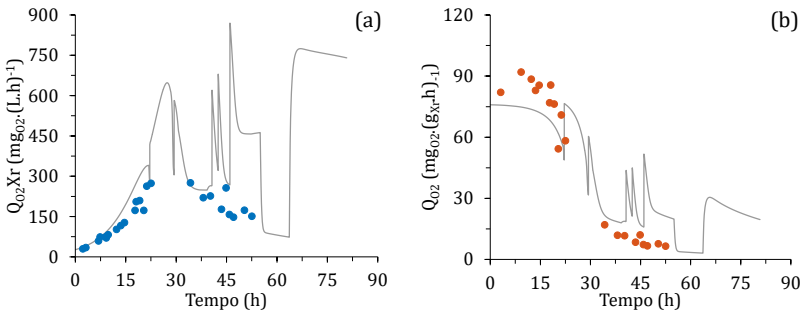
De forma semelhante aos ensaios anteriores, a velocidade específica de consumo de oxigênio ( $Q_{O_2}$ ) na fase exponencial foi em torno de  $90 \text{ mg}_{O_2} \text{ g}_{X_r}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Figura 4.64), em seguida, houve decréscimo de seu valor. No entanto, dada à elevada concentração celular,  $Q_{O_2} X_r$  atingiu seu valor máximo. A constante de atraso da oxigênio dissolvido foi  $331,4 \text{ h}^{-1}$ .

Figura 4.63: (a) Variação de volume e (b) produtividade ao longo do cultivo I. Linhas tracejadas representam o ajuste do modelo.



Fonte: autor (2019).

Figura 4.64: Variação da (a) velocidade de consumo de oxigênio ( $Q_{O_2}X_r$ ) e (b) velocidade específica de consumo de oxigênio ( $Q_{O_2}$ ) ao longo do cultivo I. Linhas contínuas representam o ajuste do modelo.



Fonte: autor (2019).

A partir da variação das condições operacionais, foi possível elevar a velocidade específica de crescimento e de produção de PHB, assim como da produtividade do cultivo. O aumento da temperatura de cultivo de 30 para 35 °C resultou no aumento de  $\mu_{X_{r_{max}}}$ . A alimentação com nitrogênio ao longo da fase de produção foi crucial para atingir elevada produtividade.

As condições empregadas em cada cultivo apresentado neste trabalho, assim como os resultados obtidos foram compilados na Tabela 4.12. As velocidades específicas de crescimento, consumo de substrato e produção de PHB, assim como os fatores de conversão se mantiveram consistentes entre os cultivos, demonstrando reprodutibilidade do presente estudo.

Tabela 4.12: Síntese das condições empregadas e resultados obtidos nos experimentos em biorreator agitado e aerado.

	Modo de operação:	T	S <sub>0</sub>	N <sub>0</sub>	Pulso de glicerol	Tempo de cultivo	Adapt. em glicerol	$\mu_{x,r,max}$	X <sub>tfinal</sub>	X <sub>rfinal</sub>	P <sub>final</sub>
	Batelada	(°C)	(g L <sup>-1</sup> )	(g L <sup>-1</sup> )	(g L <sup>-1</sup> )	(h)	(-)	(h <sup>-1</sup> )	(g L <sup>-1</sup> )	(g L <sup>-1</sup> )	(g L <sup>-1</sup> )
A*	simples	30	37,8	4,1	-	38	Não	0,10	11,5	10,0	1,6
B	simples	30	44,7	1,3	-	59	Não	0,08	21,0	11,9	9,1
C	alimentada	30	22,7	1,3	+20	58	Não	0,10	20,9	10,4	10,5
D	alimentada	35	24,2	1,2	+20	48	Não	0,12	21,0	9,7	11,3
E	alimentada	35	16,4	1,2	-	26	Sim	0,14	8,3	6,3	2,0
F	simples	35	25,7	1,9	-	26	Sim	0,11	13,0	10,5	2,5
G	alimentada	35	20,1	1,1	+25+25+15	81	Não	0,12	37,6	13,5	24,3
H	alimentada	35	23,0	0,9	-	72	Não	0,10	54,7	19,4	35,3
I	alimentada	35	18,4	2,0	+16+16	64	Não	0,13	59,9	24,4	35,5

	$Y_{X/S}$ ( $g_{X_r} g_S^{-1}$ )	$Y_{X/N}$ ( $g_{X_r} g_N^{-1}$ )	$Y_{P/S}$ ( $g_P g_S^{-1}$ )	Produtividade em PHB ( $g_P L^{-1} h^{-1}$ )	Acúmulo de P (%)	$\mu_{Pmax}$ ( $g_P g_{X_r}^{-1} h^{-1}$ )	$Q_{O_2} X_{rmax}$ ( $mg_{O_2} L^{-1} h^{-1}$ )	$Q_{O_2max}$ ( $mg_{O_2} g_{X_r}^{-1} h^{-1}$ )
A*	0,36	8,28	-	-	-	-	-	-
B	0,46	8,30	0,48	0,17	43	0,06	350	80
C	0,46	6,90	0,43	0,21	50	0,07	400	90
D	0,41	7,85	0,42	0,23	54	0,07	450	110
E	0,38	6,5	-	0,07	25	0,06	228	136
F	0,40	6,74	-	0,09	19	0,04	338	83
G	0,43	7,76	0,40	0,31	65	0,08	400	90
H	0,46	7,90	0,31	0,75	65	0,10	294	93
I	0,39	8,67	0,39	0,72	60	0,06	275	92

\*Cultivo interrompido por problemas operacionais.



## 4.13 Transferência de oxigênio

No sentido de complementar o modelo matemático proposto e tentar prever o comportamento da concentração de oxigênio dissolvido ao longo do cultivo, foi avaliada sua transferência da fase gasosa para a fase líquida. Por essa razão, nove modelos foram avaliados pela sua qualidade de ajuste aos dados experimentais, utilizando a raiz do erro médio quadrático (RMSE) como parâmetro de comparação (Tabela 4.13). A representação gráfica dos resultados obtidos pode ser verificada na Figura 4.65.

Quanto mais próximo de zero for o valor obtido pelo RMSE, maior a qualidade do ajuste. Logo, como pode ser observado na Tabela 4.13, os dados obtidos pelo modelo de Van't Riet (1979) foram os mais bem-sucedidos na predição de  $k_L a$ , principalmente quando a relação de Hughmark (1980) é empregada na determinação da potência transferida.

Para os modelos disponíveis na literatura avaliados neste trabalho, os valores de RMSE obtidos foram demasiadamente elevados (Tabela 4.13), indicando baixa qualidade do ajuste aos dados experimentais. Portanto, com o intuito de melhorar a previsão de  $k_L a$ , novos coeficientes foram determinados a partir da minimização da soma dos RMSE dos cultivos D, G e I. A escolha dos cultivos para tal análise se deu pelas condições de processo e quantidade satisfatória de determinações experimentais de  $k_L a$ . Para cada modelo de transferência de potência os valores de RMSE para o cultivo I são apresentados na Tabela 4.13. Os valores obtidos dos coeficientes  $c$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ , foram 0,012; 0,308 e 0,165, respectivamente.

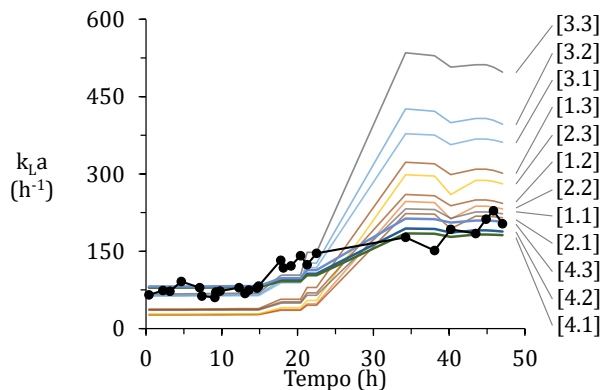
Conforme resultados expostos na Tabela 4.13, os valores de RMSE provenientes da minimização foram significativamente menores usando os coeficientes propostos do que os obtidos a partir dos modelos disponíveis na literatura. Acerca da avaliação do ajuste empregando os coeficientes gerados, os três modelos para potência transferida se mostraram igualmente adequados para predição de  $k_L a$ . Assim sendo, a escolha do melhor modelo foi feita empregando o princípio da parcimônia (Navalha de Occam), que consiste na preferência pelo sistema mais simples, neste caso, com menor número de parâmetros. Partindo desta premissa, a equação de Abardi

Tabela 4.13: Valores de RMSE ( $h^{-1}$ ) obtidos a partir do ajuste de diferentes modelos para a obtenção de  $k_L a$  para o cultivo I.  $P_g$  é a potência transferida ao meio sob agitação e a numeração entre colchetes identifica o modelo usado.

$k_L a$ \ $P_g$	Hughmark (1980)	Abardi (1988)	Taghavi et al. (2011)
Van't Riet (1979)	50,4 [1.1]	54,6 [1.2]	73,8 [1.3]
Vasconcelos et al. (2000)	58,1 [2.1]	60,3 [2.2]	71,9 [2.3]
Schaepe et al. (2013)	92,0 [3.1]	112,4 [3.2]	165,1 [3.3]
Este trabalho	22,9 [4.1]	21,8 [4.2]	22,2 [4.3]

Fonte: autor (2019).

Figura 4.65: Evolução do valor experimental de  $k_L a$  (linha preta) ao longo do cultivo I e comparação com diferentes modelos empregados (identificados pela numeração entre colchetes - ver Tabela 4.13).



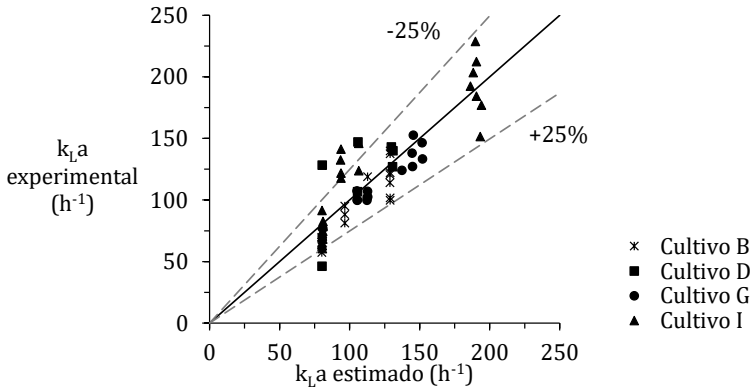
Fonte: autor (2019).

(1988) (Equação 2.6, página 44) foi selecionada.

É possível observar na Figura 4.66 a existência de uma discrepância entre os valores de  $k_L a$  calculados e os obtidos experimentalmente, podendo ser verificado que, mesmo apresentando RMSE baixo, os valores preditos divergem dos dados experimentais. Isto é, para um mesmo valor estimado, há uma gama de valores experimentais, indicando que o modelo não contempla todos os fatores envolvidos. Estes últimos podem ser dife-

rentes concentrações de biomassa, fonte de carbono e demais nutrientes, os quais interferem na transferência de oxigênio.

Figura 4.66: Distinção entre valores de  $k_L a$  estimados pelo modelo matemático e dados experimentais. Linha contínua é a diagonal principal e linhas tracejadas indicam variação de 25%.



Fonte: autor (2019).

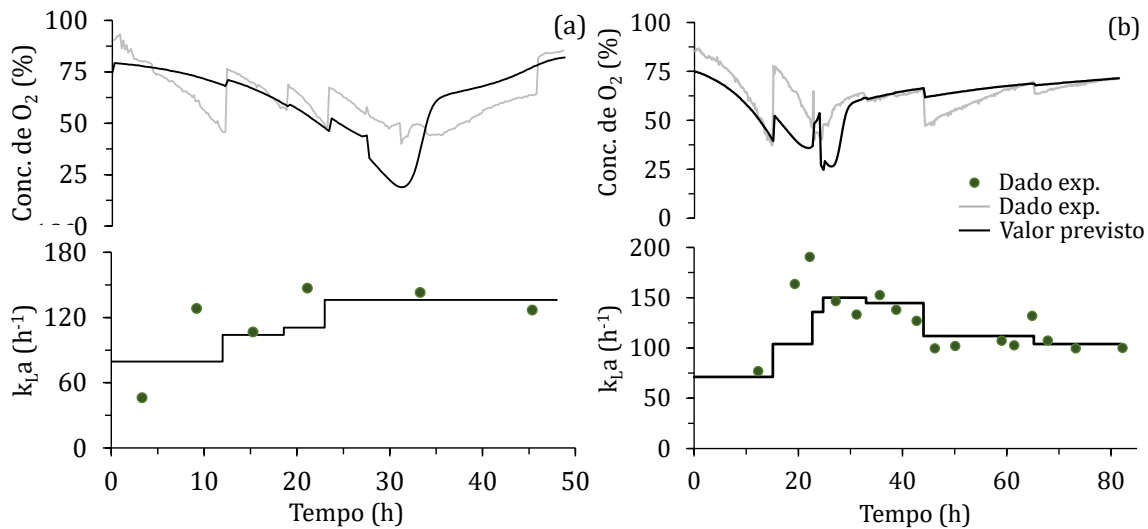
Assim, para entender a origem do erro na predição da concentração de oxigênio dissolvido, as Figuras 4.67 e 4.68 trazem a evolução da concentração de oxigênio e  $k_L a$  ao longo dos cultivos avaliados.

O modelo foi capaz de prever as variações nos valores de  $k_L a$  de forma aceitável no cultivo D (Figura 4.67a). Contudo, não foi possível reproduzir os degraus na concentração de oxigênio dissolvido observados experimentalmente. Além disso, ocorreu a superestimativa do consumo de oxigênio em torno de 30 h de ensaio (Figura 4.27a, página 102), acarretando em um valor de oxigênio dissolvido menor que o obtido experimentalmente. Já no cultivo G, verificou-se os mesmos problemas de forma menos pronunciada.

Nos cultivos com alimentação das fontes de carbono e nitrogênio de forma contínua (H e I), em que foram necessárias medidas corretivas (aumento da vazão da bomba de alimentação), a concentração de oxigênio dissolvido apresentou diversas arestas. Estas têm relação com a redução

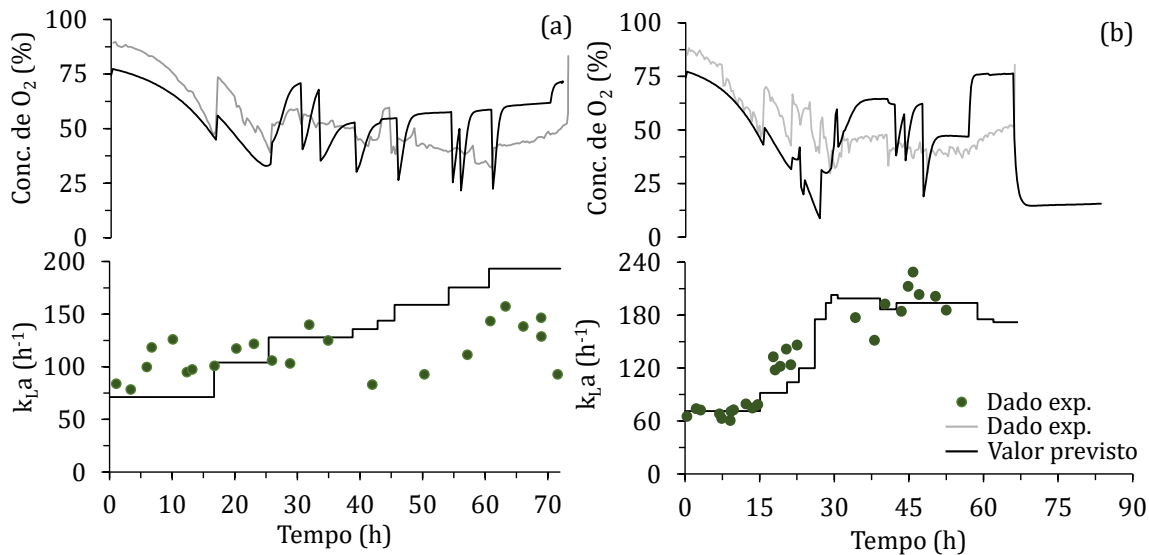
da velocidade específica de crescimento e formação de PHB, sendo que logo que a concentração de nitrogênio no meio retoma os valores ideais,  $Q_{O_2 \times r}$  aumenta, resultando na redução abrupta da concentração de oxigênio dissolvido.

Figura 4.67: Evolução da concentração de oxigênio dissolvido e  $k_L a$  nos cultivos (a) D e (b) G.



Fonte: autor (2019).

Figura 4.68: Evolução da concentração de oxigênio dissolvido e  $k_L a$  nos cultivos (a) H e (b) I.

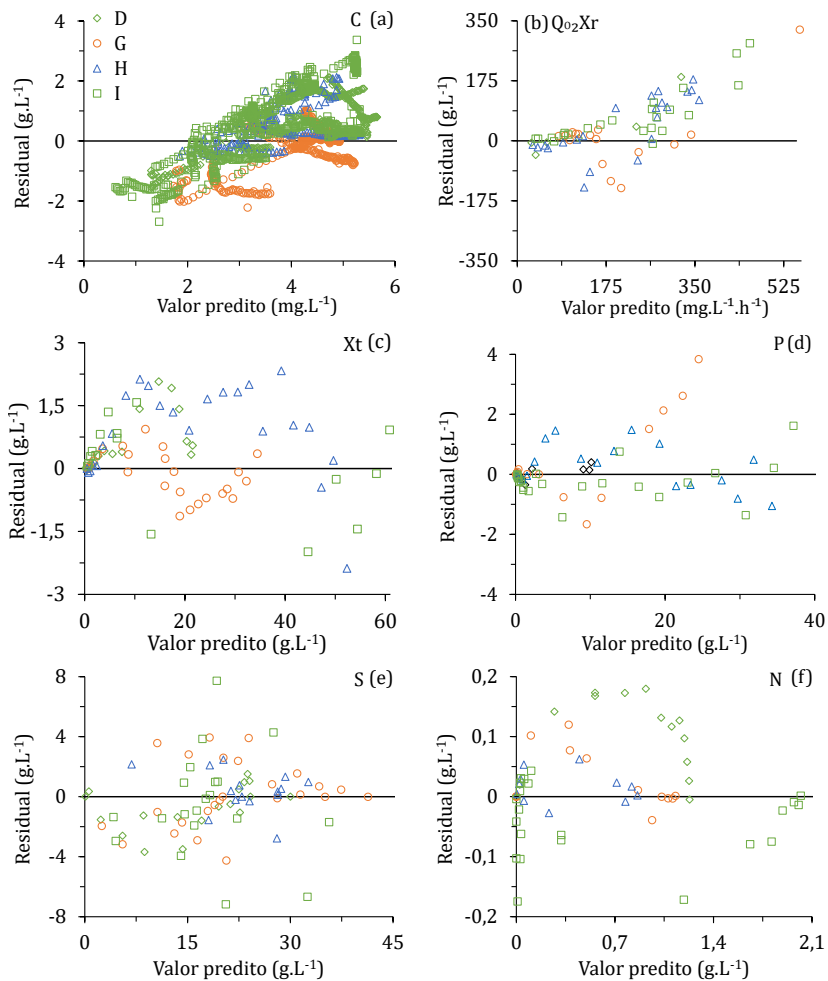


Fonte: autor (2019).

## 4.14 Análise dos resíduos

A partir das simulações dos cultivos D, G, H e I foram obtidos os valores residuais dos ajustes matemáticos para as concentrações de oxigênio dissolvido, biomassa total, PHB, glicerol e nitrogênio e velocidade de consumo de oxigênio, apresentados na Figura 4.69. O residual é o erro entre os valor predito e obtido experimentalmente e este deve ser estocástico, ou seja, não deve ser possível prever seu comportamento. Como pode ser observado, para as concentrações de biomassa total, PHB, glicerol e nitrogênio (Figuras 4.69c,d,e e f, respectivamente), os residuais variam de forma aleatória em torno de 0, indicando que não há problemas com o modelo proposto. Contudo, para a concentração de oxigênio dissolvido e a velocidade de consumo de oxigênio Figuras 4.69a e b é verificado um aumento sistemático do erro. Este padrão não-aleatório nos residuais indica que a porção determinística do modelo não está contemplando todas as informações passíveis de explicação. Dentre as quais pode-se considerar alguma interação não abordada entre os termos presentes no modelo para predição da velocidade específica de consumo de oxigênio, acarretando no problema com os residuais de  $Q_{O_2X_r}$  e, conseqüentemente, na concentração de oxigênio dissolvido. Ainda assim, a capacidade preditiva para ambas as grandezas é satisfatória.

Figura 4.69: Valores residuais dos ajustes da (a) concentração de oxigênio dissolvido, (b) velocidade de consumo de oxigênio, (c) concentração biomassa total, (d) concentração de PHB, (e) concentração de glicerol e (f) concentração de nitrogênio nos cultivos D, G, H e I.



Fonte: autor (2019).



## 4.15 Maximização da produtividade

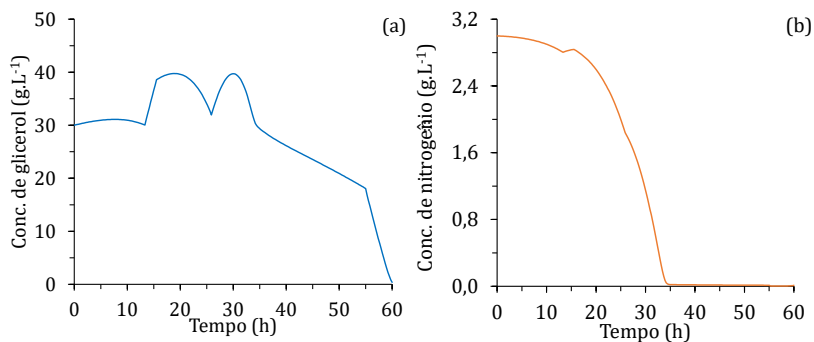
Duas novas otimizações foram realizadas, nas quais o objetivo foi maximizar a produtividade em PHB. A diferença entre as simulações realizadas foi a solução de alimentação, uma contendo glicerol e nitrogênio e a outra com estes nutrientes em soluções distintas. As grandezas de entrada foram o tempo de início, vazões de alimentação das soluções e a concentração da solução de alimentação de nitrogênio ou nitrogênio e glicerol. Dado que o modelo proposto não contempla a limitação de crescimento devido à inibição por substrato, foi estipulado, com base na Figura 4.3 (página 80), o valor de  $40 \text{ g L}^{-1}$  como a concentração máxima de glicerol no meio.

Como resultado do processo de otimização, no cultivo alimentado por soluções distintas de nutrientes, a concentração de biomassa total ao final do cultivo foi de  $93,8 \text{ g L}^{-1}$ , contendo 55% de PHB acumulado ( $X_r = 42,6 \text{ g L}^{-1}$  e  $P = 51,2 \text{ g L}^{-1}$ ). Esta proposta de experimento atingiu a capacidade máxima do biorreator (5,0 L) em 55 h de operação, momento no qual a produtividade em PHB foi  $1,23 \text{ g}_p \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Como era de se esperar, a proposta de experimento onde se utilizou uma única solução de alimentação atingiu uma maior produtividade,  $1,36 \text{ g}_p \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Neste, a solução de alimentação era composta por  $881,9 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol e  $14,1 \text{ g L}^{-1}$  de nitrogênio. O cultivo foi iniciado com uma alimentação a vazão de  $1,9 \text{ mL h}^{-1}$ , permanecendo sem alteração até a décima terceira hora. Neste instante, a vazão foi aumentada para  $21,6 \text{ mL h}^{-1}$  e duas horas depois, reduzida para  $7,9 \text{ mL h}^{-1}$ . Na 26ª hora de cultivo, a vazão da alimentação foi aumentada para  $36 \text{ mL h}^{-1}$ , sendo alterada novamente na 55ª hora de cultivo, momento no qual reduziu-se novamente a vazão para  $9,1 \text{ mL h}^{-1}$ . As concentrações de glicerol e nitrogênio ao longo do cultivo é apresentada na Figura 4.70.

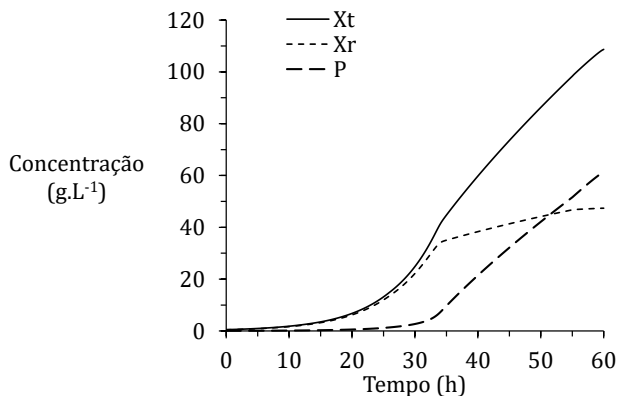
Neste cultivo proposto, a concentração de biomassa total foi de  $108,7 \text{ g L}^{-1}$ , contendo 56% de PHB acumulado ( $X_r = 47,4 \text{ g L}^{-1}$  e  $P = 61,3 \text{ g L}^{-1}$ ) (Figura 4.71). Vale ressaltar que estas concentrações são superiores às obtidas experimentalmente, indicando a relevância da otimização computacional. Por meio da alimentação da fonte de nitrogênio na fase de produção, foi possível manter a velocidade específica de produção de PHB em valores elevados (Figura 4.72).

Figura 4.70: Concentração de (a) glicerol e (b) nitrogênio ao longo do cultivo proposto.



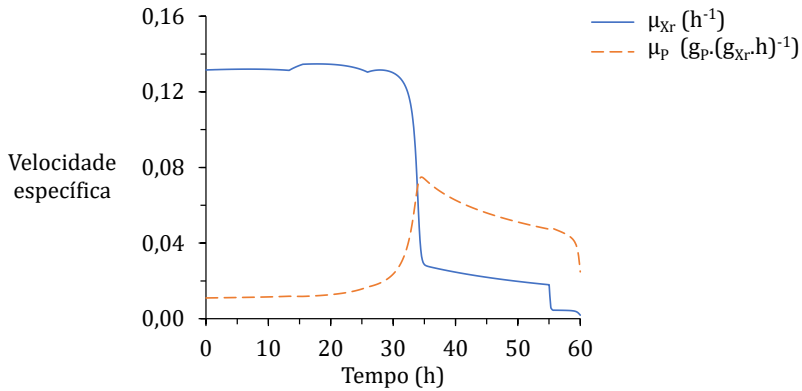
Fonte: autor (2019).

Figura 4.71: Evolução das concentrações de biomassa total ( $X_t$ ), biomassa residual ( $X_r$ ) e PHB (P) no cultivo proposto.



Fonte: autor (2019).

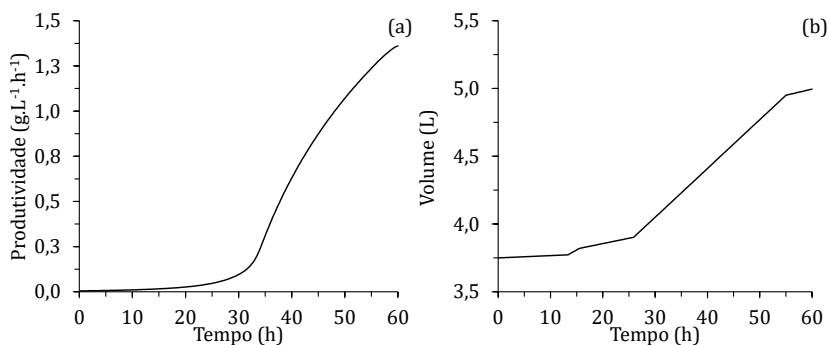
Figura 4.72: Velocidade específica de crescimento celular residual ( $\mu_{X_r}$ ) e de produção de PHB ( $\mu_p$ ) ao longo do cultivo.



Fonte: autor (2019).

Definiu-se como 60 h o tempo total de cultivo, sendo encerrado pelo atingimento da máxima capacidade de operação do biorreator (Figura 4.73b). Como não foi considerado variação de volume por coleta de amostra e adição de solução de controle de pH, o volume final deste experimento pode ser ligeiramente menor. Como pode ser observado na Figura 4.73a, a produtividade foi máxima ao final do cultivo,  $1,36 g_p L^{-1} h^{-1}$ .

Figura 4.73: Evolução da (a) produtividade em PHB e (b) volume de meio no cultivo proposto.



Fonte: autor (2019).

Em vista dos resultados apresentados nesta seção, toma-se a modelagem matemática como uma ferramenta de grande importância no aperfeiçoamento das condições de cultivo na produção de PHB. Além disso, o modelo proposto pode ser utilizado como ferramenta de predição do comportamento da cinética microbiana ao longo de um cultivo. A forma com que o modelo foi escrito possibilita seu emprego no crescimento de outras espécies de microrganismos produtores de PHB, assim como o uso de outra fonte de carbono, como glicose ou frutose, desde que as grandezas de entrada sejam ajustadas as novas condições.



## Capítulo 5

# Conclusão

Este estudo proporcionou a obtenção de resultados experimentais e simulados a respeito do crescimento celular e produção de PHB por *Cupriavidus necator* glpFK usando glicerol como fonte de carbono. O uso de glicerol proporcionou crescimento satisfatório, sendo considerada uma boa matéria-prima para produção de PHB, principalmente, pela sua abundante oferta no mercado brasileiro e baixo custo. Por meio da variação da concentração inicial de glicerol em diferentes escalas, foi possível determinar o intervalo de valores que resultassem na máxima velocidade específica de crescimento celular na fase exponencial ( $\mu_{X_r, m, a, x}$ ). Ademais, observou-se um aumento de  $\mu_{X_r, m, a, x}$  de  $0,10 \text{ h}^{-1}$  para  $0,12 \text{ h}^{-1}$  com o aumento da temperatura de 30 para  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Por meio da alimentação contínua da fonte de nitrogênio na fase de produção, um aumento expressivo da concentração celular e de biopolímero foi alcançado, resultando em elevada produtividade ( $0,72 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Neste ensaio, a concentração de biomassa total atingida foi de  $60,0 \text{ g L}^{-1}$ , contendo 59% de PHB ( $X_r = 24,5 \text{ g L}^{-1}$  e  $P = 35,5 \text{ g L}^{-1}$ ).

A partir dos cultivos realizados foi possível determinar os parâmetros cinéticos relacionados ao crescimento celular, à produção de PHB e ao consumo de oxigênio.

A avaliação da transferência de oxigênio para a fase líquida resultou na proposta de novos coeficientes para a equação matemática que descreve seu comportamento a partir das condições operacionais. Além disso, um

modelo que relaciona estas últimas e parâmetros cinéticos à formação de biomassa e PHB, assim como a concentração de oxigênio dissolvido, foi proposto. A otimização das grandezas de entrada por meio da minimização do erro favoreceu a capacidade preditiva deste modelo, sendo capaz de determinar as grandezas de saída com notável qualidade. Esta foi a primeira vez que a concentração de oxigênio dissolvido foi matematicamente prevista na produção de PHB. Por meio de uma nova otimização, propôs-se um cultivo, no qual é estimada a obtenção de  $108,7 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa total, contendo 56% de PHB, e produtividade de  $1,36 \text{ g}_p \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Dessa maneira, os resultados do presente trabalho contribuem para a viabilização de alternativas aos plásticos de origem petroquímica que resultem em menor impacto ambiental.

## Capítulo 6

# Sugestões para trabalhos futuros

Frente ao exposto neste estudo, sugere-se a realização experimental do cultivo proposto nas condições ótimas de operação. Além disso, um estudo de ampliação de escala e verificação da capacidade de ajuste do modelo apresentado seria de grande importância na implementação industrial da produção de PHB.

Durante o desenvolvimento do modelo matemático buscou-se trabalhar com computação fluidodinâmica (CFD). Um modelo geométrico tridimensional do biorreator empregado foi criado utilizando o *software* Comsol Multiphysics (Comsol Inc., v. 5.3a) e o problema foi abordado no Fluent (Ansys, v. 14). Apesar da boa capacidade computacional disponível, a alta complexidade do sistema simulado resultou em um tempo de processamento estimado na ordem de anos para simular apenas algumas dezenas de segundos de tempo real de cultivo. Inicialmente, procurou-se empregar balanço populacional para as bolhas de ar e uma abordagem Euler-Euler multifásica em uma malha não estruturada. Contudo, diversas simplificações foram realizadas para reduzir o tempo de processamento, de modo que avaliações experimentais seriam necessárias para confirmar o perfil de escoamento sugerido. Dado o tempo disponível para finalização do estudo, optou-se por não dar continuidade a esta metodologia. Ainda assim, o emprego de CFD na modelagem de cultivos para produção de PHB



é uma abordagem interessante e pode apresentar resultados valiosos.

# Referências

- ABARDI, V. Sparged vessels agitated by multiple turbines. In: 6TH European Conference on Mixing. Cranfield, 1988. p. 329–336. Citado nas pp. 44, 152, 153.
- ACKERMANN, J. U., BABEL, W. Growth-associated synthesis of poly(hydroxybutyric acid) in *Methylobacterium rhodesianum* as an expression of an internal bottleneck. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 144–149, 1997. Citado na p. 35.
- AESCHELMANN, F., CARUS, M. Biobased Building Blocks and Polymers in the World: Capacities, Production, and Applications–Status Quo and Trends Towards 2020. **Industrial Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 154–159, 2015. Citado na p. 26.
- ALBUQUERQUE, P. B. S., MALAFAIA, C. B. Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 615–625, 2018. Citado na p. 25.
- ALLAIRE, G., CRAIG, A. **Numerical analysis and optimization**. 1. ed.: Oxford University Press, 2007. Citado na p. 37.
- ALVA MUNOZ, L. E., RILEY, M. R. Utilization of cellulosic waste from tequila bagasse and production of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics by *Saccharophagus degradans*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 5, p. 882–8, 2008. Citado na p. 28.
- AMULYA, K.; JUKURI, S., VENKATA, S. Sustainable multistage process for enhanced productivity of bioplastics from waste remediation through aerobic dynamic feeding strategy: Process integration for up-scaling. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 231–9, 2015. Citado na p. 36.
- ANDREWS, G. F.; FONIA, J. P.; MARROTTA, E., STROEVE, P. The effects of cells on oxygen transfer coefficients I: Cell accumulation around bubbles. **The Chemical Engineering Journal**, v. 29, n. 3, b39–b46, 1984. Citado na p. 47.
- ANJUM, A. et al. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 161–74, 2016. Citado na p. 34.
- ANP. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. 2017. Disponível em: <[www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br)>. Citado na p. 29.

- ARAGAO, G. M. F.; LINDLEY, N. D.; URIBELARREA, J. L., PAREILLEUX, A. Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 8, p. 937–942, 1996. Citado nas pp. 61, 62, 84, 119.
- ARAGÃO, G. M. F. **Production de poly-B-hydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus* : caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures**. 1996. Tese (Doutorado) – L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. Citado na p. 55.
- ARDI, M. S.; AROUA, M. K., HASHIM, N. A. Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1164–1173, 2015. Citado na p. 30.
- ASCANIO, G. Mixing time in stirred vessels: A review of experimental techniques. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 7, p. 1065–1076, 2015. Citado na p. 45.
- BADER, F. G. Modelling mass transfer and agitator performance in multiturbine fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 1, p. 37–51, 1987. Citado na p. 45.
- BAKKER, A.; SMITH, J. M., MYERS, K. J. How to disperse gases in liquids. **Chemical Engineering**, v. 101, n. 12, p. 98, 1994. Citado nas pp. 41–43.
- BHATIA, S. K. et al. Starch based polyhydroxybutyrate production in engineered *Escherichia coli*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 8, p. 1479–84, 2015. Citado na p. 27.
- BHATTACHARYYA, A. et al. Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 34, 2012. Citado na p. 28.
- BLOWER, S., DOWLATABADI, H. Sensitivity and Uncertainty Analysis of Complex Models of Disease Transmission: An HIV Model, as an Example. **International Statistical Review**, v. 62, n. 2, p. 229, 1994. Citado na p. 49.
- BOEIRA, C. Z. **Produção de PHB por *Cupriavidus necator* recombinante em glicerina e vinhaça**. 2018. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Citado nas pp. 17, 19, 118.
- BORZANI, W. Calculation of fermentation parameters from the results of a batch test taking account of the volume of biomass in the fermenting medium. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 22, p. 1953–1956, 2008. Citado na p. 201.
- BOSCO, F., CHIAMPO, F. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge production of bioplastics using dairy residues. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 418–21, 2010. Citado na p. 29.
- BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W., FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a Source for novel Poly(B-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1977–1982, 1988. Citado na p. 62.

- CANNAVÓ, F. Sensitivity analysis for volcanic source modeling quality assessment and model selection. **Computers & Geosciences**, v. 44, p. 52–59, 2012. Citado na p. 50.
- CARROLL, M., ZHOU, X. Panacea in progress: CRISPR and the future of its biological research introduction. **Microbiological Research**, v. 201, p. 63–74, 2017. Citado na p. 33.
- CAVALHEIRO, J. M. B. T.; ALMEIDA, M. C. M. D. de; GRANDFILS, C., FONSECA, M. M. R. da. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 509–515, 2009. Citado nas pp. 30–33, 80, 85, 96, 108, 109.
- CESARIO, M. T. et al. Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. **New Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 104–13, 2014. Citado na p. 28.
- CHAE, Y., AN, Y. Current research trends on plastic pollution and ecological impacts on the soil ecosystem: A review. **Environmental Pollution**, v. 240, p. 387–395, 2018. Citado na p. 23.
- CHEN, G.-Q. Q. Polyhydroxyalkanoates. In: BIODEGRADABLE polymers for industrial applications. 2005. Citado na p. 25.
- CHOI, W. J. Glycerol-based biorefinery for fuels and chemicals. **Recent patents on biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 173–80, 2008. Citado na p. 29.
- CIESIELSKI, S.; MOŹEJKO, J., PISUTPAISAL, N. Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production. **Journal of Cleaner Production**, v. 106, p. 408–421, 2015. Citado na p. 29.
- COELLO, C. A.; LAMONT, G. B., VAN VELDHIJZEN, D. A. **Evolutionary Algorithms for Solving Multi-Objective Problems**. 2 ed.: Springer, 2007. Citado na p. 53.
- COOPER, C. M.; FERNSTROM, G. A., MILLER, S. A. Performance of Agitated Gas-Liquid Contactors. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 36, n. 9, p. 504–509, 1944. Citado na p. 46.
- COUPER, J. R.; PENNEY, W. R.; FAIR, J. R., WALAS, S. M. **Chemical Process Equipment Selection and Design**. 3. ed., 2012. Citado na p. 41.
- CRUZ, M. V. et al. Valorization of fatty acids-containing wastes and byproducts into short- and medium-chain length polyhydroxyalkanoates. **New Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 206–15, 2016. Citado na p. 29.
- CUSTÓDIO, A. L.; MADEIRA, J. F. A.; VAZ, A. I. E., VICENTE, L. N. Direct Multisearch for Multiobjective Optimization. **SIAM Journal on Optimization**, v. 21, n. 3, p. 1109–1140, 2011. Citado na p. 53.
- DAVIS, R. et al. High cell density cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440 using glucose without the need for oxygen enriched air supply. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 4, p. 725–33, 2015. Citado na p. 35.
- DE MATOS, C. T. et al. **Environmental Sustainability Assessment of Bioeconomy Products and Processes – Progress Report 1**. 2015. Citado na p. 28.

- DORAN, P. **Bioprocess engineering principles**. 2 ed. Amsterdam: Elsevier, 2013. Citado na p. 77.
- DUTTA, R. Agitation and Aeration. In: **FUNDAMENTALS of biochemical Engineering**. 2009. Citado na p. 101.
- EGGERS, J., STEINBUCHER, A. Impact of *Ralstonia eutropha*'s poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Depolymerases and Phasins on PHB storage in recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environment Microbiology**, v. 80, n. 24, p. 7702–9, 2014. Citado na p. 33.
- FISCHER, H. P. Mathematical modeling of complex biological systems: from parts lists to understanding systems behavior. **Alcohol research & health**, v. 31, n. 1, p. 49–59, 2008. Citado na p. 38.
- FRIEDLI, G.-L. **Interaction of Deamidated Soluble Wheat Protein (SWP) With Other Food Proteins and Metals**. 1996. Tese (doutorado) – University of Surrey. Citado na p. 62.
- FRITZSCHE, K.; LENZ, R. W., FULLER, R. C. An unusual bacterial polyester with a phenyl pendant group. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 191, n. 8, p. 1957–1965, 1990. Citado na p. 24.
- FUKUI, T.; MUKOYAMA, M.; ORITA, I., NAKAMURA, S. Enhancement of glycerol utilization ability of *Ralstonia eutropha* H16 for production of polyhydroxyalkanoates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 17, p. 7559–68, 2014. Citado na p. 33.
- GAHLAWAT, G., SONI, S. K. Valorization of waste glycerol for the production of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Cupriavidus necator* and extraction in a sustainable manner. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 492–501, 2017. Citado nas pp. 23, 26.
- GAHLAWAT, G., SRIVASTAVA, A. K. Model-Based Nutrient Feeding Strategies for the Increased Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 2, p. 530–542, 2017. Citado nas pp. 78, 105.
- GARCIA-BRIONES, M. A., CHALMERS, J. J. Flow parameters associated with hydrodynamic cell injury. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 9, p. 1089–98, 1994. Citado na p. 41.
- GARCIA-OCHOA, F., GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 153–76, 2009. Citado nas pp. 40, 45, 46.
- GARCIA-OCHOA, F., GOMEZ, E. Prediction of gas-liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 92, n. 6, p. 761–72, 2005. Citado na p. 48.
- GARCÍA, A. et al. High production of poly-B-hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 117–123, 2014. Citado na p. 201.

- GEN, M.; CHENG, R., LIN, L. **Network Models and Optimization: Multiobjective Genetic Algorithm Approach**. Londres: Springer, 2010. Citado na p. 52.
- GOGATE, P. R.; BEENACKERS, A. A., PANDIT, A. B. Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 2, p. 109–144, 2000. Citado nas pp. 41, 46, 47.
- GOMEZ, J. G. C. et al. Making Green Polymers Even Greener: Towards Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoates from Agroindustrial By-Products. **Advances in Applied Biotechnology**, 2012. Citado na p. 28.
- GOULARTE, P. G. **Comparação da Produção de Poli-hidroxibutirato por Cupriavidus necator parental e recombinante a partir de glicerol e glicose combinados**. 2018. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Citado nas pp. 17, 19, 27, 93, 94.
- GROUSSEAU, E. et al. Impact of sustaining a controlled residual growth on polyhydroxybutyrate yield and production kinetics in *Cupriavidus necator*. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 30–8, 2013. Citado na p. 119.
- GUMEL, A. M.; ANNUAR, M. S. M., CHISTI, Y. Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 580–605, 2012. Citado na p. 25.
- EL-HADI, A.; SCHNABEL, R.; STRAUBE, E.; MULLER, G., RIEMSCHEIDER, M. Effect of melt processing on crystallization behavior and rheology of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and its blends. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 287, n. 5, p. 363–372, 2002. Citado nas pp. 104, 105, 107.
- HAND, S.; GILL, J., CHU, K. H. Phage-based extraction of polyhydroxybutyrate (PHB) produced from synthetic crude glycerol. **Science of the Total Environment**, v. 557-558, p. 317–21, 2016. Citado na p. 26.
- HASSAN, M. A. et al. Sustainable production of polyhydroxyalkanoates from renewable oil-palm biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 50, p. 1–9, 2013. Citado na p. 24.
- HASSETT, A.; BLAETTLER, W., KNOWLES, J. R. Pyruvate kinase: is the mechanism of phospho transfer associative or dissociative? **Biochemistry**, v. 21, n. 25, p. 6335–6340, 1982. Citado na p. 36.
- HEINZLE, E., LAFFERTY, R. A kinetic model for growth and synthesis of poly-B-hydroxybutyric acid (PHB) in *Alcaligenes eutrophus* H 16. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 8–16, 1980. Citado na p. 38.
- HELTON, J., DAVIS, F. Illustration of Sampling-Based Methods for Uncertainty and Sensitivity Analysis. **Risk Analysis**, v. 22, n. 3, p. 591–622, 2002. Citado na p. 50.
- HERMANN-KRAUSS, C. et al. Archaeal production of polyhydroxyalkanoate (PHA) co- and terpolyesters from biodiesel industry-derived by-products. **Archaea**, v. 2013, p. 1–10, 2013. Citado na p. 30.
- HORNG, Y. T. et al. Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production via the coexpressed phaCAB and vgb genes controlled by arabinose P promoter in *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 158–67, 2010. Citado na p. 33.

- HUDCOVA, V.; MACHON, V., NIENOW, A. W. Gas-liquid dispersion with dual Rushton turbine impellers. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, n. 5, p. 617–28, 1989. Citado nas pp. 42, 43.
- HUGHMARK, G. A. Power Requirements and Interfacial Area in Gas-Liquid Turbine Agitated Systems. **Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development**, v. 19, n. 4, p. 638–641, 1980. Citado nas pp. 43, 152, 153.
- IBRAHIM, M. H., STEINBUHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. **Applied and Environment Microbiology**, v. 75, n. 19, p. 6222–31, 2009. Citado nas pp. 30, 32.
- IENCZAK, J. L. **Estratégia de cultivo em alta concentração celular para a produção de poli(3-hidroxibutirato) em substratos com moderada concentração da fonte de carbono**. 2011. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Citado na p. 81.
- IENCZAK, J. L. et al. High cell density strategy for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 4, p. 585–596, 2011. Citado na p. 85.
- IENCZAK, J. L. et al. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production in Repeated fed-Batch with Cell Recycle Using a Medium with low Carbon Source Concentration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 408–17, 2016. Citado nas pp. 27, 35, 96.
- INOUE, Y., YOSHIE, N. Structure and physical properties of bacterially synthesized polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 17, n. 4, p. 571–610, 1992. Citado na p. 64.
- JAHODA, M., MACHOŇ, V. Homogenization of liquids in tanks stirred by multiple impellers. **Chemical Engineering & Technology**, v. 17, n. 2, p. 95–101, 1994. Citado na p. 45.
- JIN, H., NIKOLAU, B. J. Evaluating PHA productivity of bioengineered *Rhodospirillum rubrum*. **PLOS ONE**, v. 9, n. 5, e96621, 2014. Citado na p. 33.
- JU, L. K., SUNDARARAJAN, A. The effects of cells on oxygen transfer in bioreactors. **Bioprocess Engineering**, v. 13, n. 5, p. 271–278, 1995. Citado nas pp. 47, 48.
- KARR, D. B.; WATERS, J. K., EMERICH, D. W. Analysis of Poly(3-Hydroxybutyrate) in *Rhizobium japonicum* Bacteroids by Ion-Exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV Detection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1339–1344, 1983. Citado na p. 63.
- KATOH, T.; YUGUCHI, D.; YOSHII, H.; SHI, H., SHIMIZU, K. Dynamics and modeling on fermentative production of poly (B-hydroxybutyric acid) from sugars via lactate by a mixed culture of *Lactobacillus delbrueckii* and *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Biotechnology**, v. 67, n. 2-3, p. 113–134, 1999. Citado na p. 38.
- KAWASE, Y., MOO-YOUNG, M. Mass transfer at a free surface in stirred tank bioreactors. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 68, p. 189–194, 1990. Citado na p. 47.
- KHANNA, S., SRIVASTAVA, A. K. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2173–2182, 2005. Citado na p. 25.

- KIM, B. S. et al. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, n. 9, p. 892–8, 1994. Citado na p. 27.
- KOLLER, M. et al. Assessment of formal and low structured kinetic modeling of polyhydroxyalkanoate synthesis from complex substrates. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 29, n. 5-6, p. 367–77, 2006. Citado na p. 38.
- KONG, Y., HAY, J. N. The measurement of the crystallinity of polymers by DSC. **Polymer**, v. 43, n. 14, p. 3873–3878, 2002. Citado na p. 106.
- KORZ, D.; RINAS, U.; HELLMUTH, K.; SANDERS, E., DECKWER, W.-D. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 59–65, 1995. Citado na p. 35.
- LANGENBACH, S.; REHM, B. H., STEINBUCHER, A. Functional expression of the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 150, n. 2, p. 303–9, 1997. Citado na p. 33.
- LEE, S. Y.; CHOI, J., WONG, H. H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, n. 1-3, p. 31–6, 1999. Citado na p. 129.
- LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 11, p. 431–438, 1996. Citado nas pp. 24, 25.
- LIU, C. C.; ZHANG, L. L.; AN, J.; CHEN, B., YANG, H. Recent strategies for efficient production of polyhydroxyalkanoates by micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 9–15, 2016. Citado nas pp. 28, 33.
- LU, W.-M., CHEN, H. Flooding and Critical Impeller Speed for Gas Dispersion in Aerated Turbine Agitated Vessels. **The Chemical Engineering Journal**, v. 33, n. 2, p. 57–62, 1986. Citado na p. 41.
- LUO, X.; GE, X.; CUI, S., LI, Y. Value-added processing of crude glycerol into chemicals and polymers. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 144–154, 2016. Citado na p. 30.
- MAHISHI, L. H.; TRIPATHI, G., RAWAL, S. K. Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: effect of various carbon and nitrogen sources. **Microbiological Research**, v. 158, n. 1, p. 19–27, 2003. Citado na p. 33.
- MANFREDINI, R.; CAVALLERA, V.; MARINI, L., DONATI, G. Mixing and oxygen transfer in conventional stirred fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 12, p. 3115–31, 1983. Citado na p. 45.
- MARINO, S.; HOGUE, I. B.; RAY, C. J., KIRSCHNER, D. E. A methodology for performing global uncertainty and sensitivity analysis in systems biology. **Journal of Theoretical Biology**, v. 254, n. 1, p. 178–96, 2008. Citado nas pp. 49–51.
- MEHER, L.; VIDYASAGAR, D., NAIK, S. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248–268, 2006. Citado na p. 29.



- MENDES, D. B., SERRA, J. C. V. Glicerina : uma abordagem sobre a produção e o tratamento. **Revista Liberato**, v. 13, n. 20, p. 1–9, 2012. Citado na p. 29.
- MICHEL, B. J., MILLER, S. A. Power requirements of gas-liquid agitated systems. **AICHE Journal**, v. 8, n. 2, p. 262–266, 1962. Citado na p. 43.
- MOTTA, S., PAPPALARDO, F. Mathematical modeling of biological systems. **Brief Bioinform**, v. 14, n. 4, p. 411–22, 2013. Citado na p. 38.
- MOZEJKO-CIESIELSKA, J., KIEWISZ, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? **Microbiological Research**, v. 192, p. 271–282, 2016. Citado na p. 36.
- MOZEJKO, J., CIESIELSKI, S. Saponified waste palm oil as an attractive renewable resource for mcl-polyhydroxyalkanoate synthesis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 4, p. 485–92, 2013. Citado na p. 29.
- MOZUMDER, M. S.; DE WEVER, H.; VOLCKE, E., GARCIA-GONZALEZ, L. A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 3, p. 365–373, 2014a. Citado nas pp. 31, 38, 108.
- MOZUMDER, M. S.; GOORMACHTIGH, L.; GARCIA-GONZALEZ, L.; DE WEVER, H., VOLCKE, E. I. Modeling pure culture heterotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB). **Bioresource Technology**, v. 155, p. 272–80, 2014b. Citado na p. 32.
- MOZUMDER, S. **Optimization of a two-phase fermentation process for the production of polyhydroxybutyrate (PHB) from organic and inorganic (industrial waste) substrate**. 2015. Tese (doutorado) – Universidade de Gent. Citado na p. 35.
- MULCHANDANI, A.; LUONG, J., GROOM, C. Substrate inhibition kinetics for microbial growth and synthesis of poly-B-hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, 1989. Citado na p. 38.
- NARANJO, J. M.; POSADA, J. A.; HIGUITA, J. C., CARDONA, C. A. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: the PHB case using *Bacillus megaterium*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 38–44, 2013. Citado nas pp. 28–30.
- NIKEL, P. I.; PETTINARI, M. J.; GALVAGNO, M. A., MENDEZ, B. S. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol by a recombinant *Escherichia coli* arcA mutant in fed-batch microaerobic cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 6, p. 1337–43, 2008. Citado nas pp. 27, 96.
- NOVAK, M. Mathematical Modelling as a Tool for Optimized PHA Production. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 29, n. 2, p. 183–220, 2015. Citado nas pp. 38, 40.
- O'CONNOR, G. M.; SANCHEZ-RIERA, F., COONEY, C. L. Design and evaluation of control strategies for high cell density fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, n. 3, p. 293–304, 1992. Citado na p. 122.
- OCAMPO-LÓPEZ, C.; COLORADO-ARIAS, S., RAMÍREZ-CARMONA, M. Modeling of microbial growth and ammonia consumption at different temperatures in the production of a polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolymer. **Journal of Applied Research and Technology**, v. 13, n. 5, p. 498–503, 2015. Citado na p. 38.

- OLIVEIRA, F. C.; DIAS, M. L.; CASTILHO, L. R., FREIRE, D. M. Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 633–8, 2007. Citado nas pp. 104, 105.
- OOSTERHUIS, N. M., KOSSEN, N. W. Dissolved oxygen concentration profiles in a production-scale bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 5, p. 546–50, 1984. Citado nas pp. 45, 46.
- PAGLIANO, G.; VENTORINO, V.; PANICO, A., PEPE, O. Integrated systems for biopolymers and bioenergy production from organic waste and by-products: a review of microbial processes. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, p. 113, 2017. Citado nas pp. 23, 28.
- PAIS, J. et al. Improvement on the yield of polyhydroxyalkanotes production from cheese whey by a recombinant *Escherichia coli* strain using the proton suicide methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 55, p. 151–8, 2014. Citado na p. 33.
- PAN, C.; MIN, J.; LIU, X., GAO, Z. Investigation of Fluid Flow in a Dual Rushton Impeller Stirred Tank Using Particle Image Velocimetry. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n. 5, p. 693–699, 2008. Citado na p. 42.
- PARNAUDEAU, V.; CONDOM, N.; OLIVER, R.; CAZEVIELLE, P., RECOUS, S. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1553–62, 2008. Citado na p. 99.
- PATNAIK, P. R. Perspectives in the modeling and optimization of PHB production by pure and mixed cultures. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 153–71, 2005. Citado na p. 40.
- PAUL, E. L.; ATIEMO-OBENG, V. A., KRESTA, S. M. **Handbook of Industrial Mixing. Science and Practice**. 1 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2004. Citado na p. 43.
- PAVAN, F. A. **Análise de viabilidade econômica da produção de Poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator***. 2015. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Citado nas pp. 18, 26.
- PENLOGLOU, G.; CHATZIDOUKAS, C., KIPARISSIDES, C. Microbial production of polyhydroxybutyrate with tailor-made properties: an integrated modelling approach and experimental validation. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 1, p. 329–37, 2012. Citado nas pp. 36, 37.
- PENLOGLOU, G.; ROUSSOS, A.; CHATZIDOUKAS, C., KIPARISSIDES, C. A combined metabolic/polymerization kinetic model on the microbial production of poly(3-hydroxybutyrate). **New Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 358–67, 2010. Citado na p. 39.
- PÉREZ RIVERO, C.; SUN, C.; THEODOROPOULOS, C., WEBB, C. Building a predictive model for PHB production from glycerol. **Biochemical Engineering Journal**, v. 116, p. 113–121, 2016. Citado na p. 38.
- PIRT, S. J. Maintenance energy: a general model for energy-limited and energy-sufficient growth. **Archives of Microbiology**, Springer Nature, v. 133, n. 4, p. 300–302, 1982. Citado na p. 130.

- PLASTIC-EUROPE. **Plastics - The Fact**. 2018. Citado na p. 23.
- PLISCHKE, E.; BORGONOVO, E., SMITH, C. L. Global sensitivity measures from given data. **European Journal of Operational Research**, v. 226, n. 3, p. 536–550, 2013. Citado na p. 49.
- POSADA, J. A.; NARANJO, J. M.; LÓPEZ, J. A.; HIGUITA, J. C., CARDONA, C. A. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 310–317, 2011. Citado na p. 32.
- PRADHAN, S. et al. Microbial production, ultrasound-assisted extraction and characterization of biopolymer polyhydroxybutyrate (PHB) from terrestrial (*P. hysterophorus*) and aquatic (*E. crassipes*) invasive weeds. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 304–310, 2017. Citado na p. 26.
- QUINES, L. K. **Extração de poli(3-hidroxibutirato), produzido por *Cupriavidus necator*, utilizando carbonato de propileno combinado com métodos mecânicos**. 2015. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Citado nas pp. 63, 104, 105.
- RAMÍREZ, O.; ZAMORA, R.; QUINTERO, R., LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: The case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 10, p. 895–903, 1994. Citado na p. 201.
- RAMSAY, B. Physiological factor affecting PHA production. Physiology, kinetics, production and use of biopolymers. In: PROCEEDINGS. 1994. p. 9–7. Citado na p. 24.
- REHM, B. H., STEINBÜCHEL, A. PHA Synthases: The Key Enzymes of PHA Synthesis. **Biopolymers Online**, 2005. Citado na p. 36.
- REHM, B. H. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 578–92, 2010. Citado na p. 25.
- REHM, B. H. Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: a platform technology for the production of tailor-made bioparticles. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 9, n. 1, p. 41–62, 2007. Citado na p. 25.
- REINECKE, F., STEINBÜCHEL, A. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 1-2, p. 91–108, 2009. Citado na p. 30.
- RIESENBERG, D., GUTHKE, R. High-cell-density cultivation of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 4, p. 422–430, 1999. Citado na p. 35.
- RIVERA-TERCEROS, P et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis* in an air-lift reactor. **Journal of biological research (Thessalonike, Grécia)**, v. 22, n. 1, p. 8, 2015. Citado na p. 36.
- ROBINSON, C. W., WILKE, C. R. Simultaneous measurement of interfacial area and mass transfer coefficients for a well-mixed gas dispersion in aqueous electrolyte solutions. **AIChE Journal**, v. 20, n. 2, p. 285–294, 1974. Citado na p. 47.

- RODRIGUEZ-CONTRERAS, A. et al. High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 5, p. 1378–87, 2013. Citado nas pp. 27, 104.
- RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A. et al. Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 94, p. 50–57, 2015. Citado na p. 106.
- RUDOLPH, L.; SCHÄFER, M.; ATIEMO-OBENG, V., KRAUME, M. Experimental and Numerical Analysis of Power Consumption for Mixing of High Viscosity Fluids with a Co-Axial Mixer. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 85, n. 5, p. 568–575, 2007. Citado na p. 40.
- RUSHTON, J. H. Power Characteristics of Mixing Impellers - part I. **Chemical Engineering Progress**, v. 46, p. 395–404, 1950. Citado na p. 42.
- RYU, H. W.; HAHN, S. K.; CHANG, Y. K., CHANG, H. N. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55, n. 1, p. 28–32, 1997. Citado na p. 35.
- SAITO, Y., DOI, Y. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Comamonas acidovorans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 16, n. 2, p. 99–104, 1994. Citado na p. 25.
- SALTELLI, A. Introduction to Sensitivity Analysis. In: SALTELLI, A. (Ed.). 1 ed., 2004. (Handbook of Uncertainty Quantification). Citado nas pp. 49, 50.
- SCHAEPE, S. et al.  $k_L a$  of stirred tank bioreactors revisited. **Journal of Biotechnology**, v. 168, n. 4, p. 576–83, 2013. Citado nas pp. 46, 47, 153.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. D. E. A.; AQUARONI, E., BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. Edgard blücher, 2001. v. 2. Citado na p. 69.
- SCHMIDT, M. et al. Predição da concentração celular a partir da velocidade de respiração e validação em cultivos visando a produção de Poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator*. In: XX Simpósio nacional de bioprocessos. Fortaleza, 2015. Citado nas pp. 94, 99, 118.
- SHAHZAD, K. et al. Comparison of ecological footprint for biobased PHA production from animal residues utilizing different energy resources. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 15, n. 3, p. 525–536, 2013. Citado na p. 29.
- SHULER, M. L., KARGI, F. **Bioprocess Engineering Basic Concepts**. 2 ed.: Prentice Hall PTR, 2002. Citado na p. 40.
- SINCLAIR, C. G., RYDER, D. N. Models for the continuous culture of microorganisms under both oxygen and carbon limiting conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 17, n. 3, p. 375–398, 1975. Citado na p. 45.
- SINGH SAHARAN, B.; GREWAL, A., KUMAR, P. Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments. **Chinese Journal of Biology**, v. 2014, p. 1–18, 2014. Citado nas pp. 24, 25, 28.

- SPO LJARIC, I. V. et al. In silico optimization and low structured kinetic model of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesis by *Cupriavidus necator* DSM 545 by fed-batch cultivation on glycerol. **Journal of Biotechnology**, v. 168, n. 4, p. 625–35, 2013a. Citado na p. 81.
- SPO LJARIC, I. V. et al. Mathematical modeling of poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] synthesis by *Cupriavidus necator* DSM 545 on substrates stemming from biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 482–94, 2013b. Citado na p. 39.
- SRIVASTAVA, V. C.; MISHRA, I. M., SURESH, S. Oxygen Mass Transfer in Bioreactors. In: **COMPREHENSIVE Biotechnology**. 2011. p. 947–956. Citado nas pp. 46, 47.
- STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. John Wiley & Sons, 2004. Citado na p. 104.
- SUMMER, T. **Sensitivity analysis in systems biology modelling and its application to a multi-scale model of blood glucose homeostasis**. 2010. Tese (doutorado) – University College London. Citado na p. 49.
- SUWANNASING, W.; IMAI, T., KAEWKANNETRA, P. Cost-effective defined medium for the production of polyhydroxyalkanoates using agricultural raw materials. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 67–74, 2015. Citado na p. 28.
- SWEET, G. et al. Glycerol facilitator of *Escherichia coli*: cloning of *glpF* and identification of the *glpF* product. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 1, p. 424–30, 1990. Citado na p. 36.
- TAGHAVI, M.; ZADGHAFARI, R.; MOGHADDAS, J., MOGHADDAS, Y. Experimental and CFD investigation of power consumption in a dual Rushton turbine stirred tank. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, n. 3, p. 280–290, 2011. Citado nas pp. 44, 153.
- TAMBOLI, D. P.; KURADE, M. B.; WAGHMODE, T. R.; JOSHI, S. M., GOVINDWAR, S. P. Exploring the ability of *Sphingobacterium* sp. ATM to degrade textile dye Direct Blue GLL, mixture of dyes and textile effluent and production of polyhydroxyhexadecanoic acid using waste biomass generated after dye degradation. **Journal of Hazardous materials**, v. 182, n. 1-3, p. 169–76, 2010. Citado na p. 29.
- TANADCHANGSAENG, N., YU, J. Microbial synthesis of polyhydroxybutyrate from glycerol: gluconeogenesis, molecular weight and material properties of biopolyester. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 11, p. 2808–18, 2012. Citado nas pp. 32, 36, 37, 85, 109.
- TERVASMÄKI, P.; LATVA-KOKKO, M.; TASKILA, S., TANSKANEN, J. Mass transfer, gas hold-up and cell cultivation studies in a bottom agitated draft tube reactor and multiple impeller Rushton turbine configuration. **Chemical Engineering Science**, v. 155, p. 83–98, 2016. Citado na p. 41.
- TOHYAMA, M.; TRAYANKA, P.; ZIWEN, Q., KAZUYUKI, S. Modeling of the Mixed Culture and Periodic Control for PHB Production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, 157–173, 2002. Citado na p. 38.

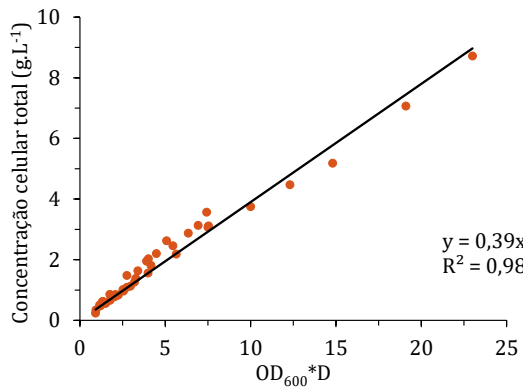
- TSAO, G. T. N. Simultaneous gas-liquid interfacial mass transfer and uptake by small particles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 11, n. 6, p. 1071–1087, 1969. Citado na p. 48.
- URTUVIA, V.; VILLEGAS, P.; GONZALEZ, M., SEEGER, M. Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 208–13, 2014. Citado na p. 24.
- VAN TRIET, K. Review of Measuring Methods and Results in Nonviscous Gas-Liquid Mass Transfer in Stirred Vessels. **Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development**, v. 18, n. 3, p. 357–364, 1979. Citado nas pp. 47, 152, 153.
- VASCONCELOS, J. M. T.; ORVALHO, S. C. P.; RODRIGUES, A. M. A. F., ALVES, S. S. Effect of Blade Shape on the Performance of Six-Bladed Disk Turbine Impellers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 39, n. 1, p. 203–213, 2000. Citado nas pp. 45, 47, 153.
- VELAZQUEZ, F.; PFLUGER, K.; CASES, I.; DE EUGENIO, L. I., LORENZO, V. de. The phosphotransferase system formed by PtsP, PtsO, and PtsN proteins controls production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 12, p. 4529–33, 2007. Citado na p. 24.
- WALLACH, D.; MAKOWSKI, D.; JONES, J. W., BRUN, F. Model Evaluation. In: WALLACH, D.; MAKOWSKI, D.; JONES, J. W., BRUN, F. (Ed.). **Working with Dynamic Crop Models**. 3 ed.: Academic Press, 2019. p. 311–373. Citado na p. 54.
- WALLE, G. A. M. van der; KONING, G. J. M. de; WEUSTHUIS, R. a., EGGINK, G. Properties, Modifications and Applications of Biopolyesters. In: **ADVANCES in biochemical engineering/biotechnology**. 2001. p. 263–291. Citado na p. 24.
- WANG, H.; ZHOU, X. R.; LIU, Q., CHEN, G. Q. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 1497–507, 2011. Citado na p. 24.
- WANG, H. et al. CFD modeling of hydrodynamic characteristics of a gas–liquid two-phase stirred tank. **Applied Mathematical Modelling**, v. 38, n. 1, p. 63–92, 2014. Citado na p. 33.
- WANG, Q. et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate) from glycerol by recombinant *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 548–51, 2013. Citado na p. 27.
- ZANFONATO, K. **Aproveitamento de subprodutos da indústria de biocombustíveis para a produção de poli(3-hidroxitirato) por *Ralstonia eutropha***. 2016. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Citado nas pp. 17, 19, 34, 99, 104.
- ZHENG, Z.; SUN, D.; LI, J.; ZHAN, X., GAO, M. Improving oxygen transfer efficiency by developing a novel energy-saving impeller. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 130, p. 199–207, 2018. Citado na p. 41.
- ZHU, C.; NOMURA, C. T.; PERROTTA, J. A.; STIPANOVIC, A. J., NAKAS, J. P. Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from biodiesel-glycerol by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 2, p. 424–30, 2010. Citado na p. 27.



# Apêndice A

## Curvas de calibração

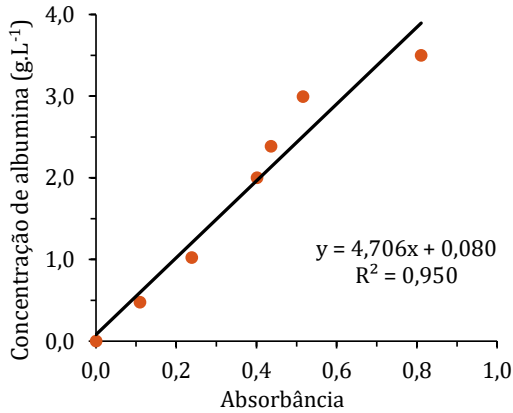
Figura A.1: Relação entre a absorvância a 600 nm e concentração celular, onde D é a diluição da amostra analisada.



Fonte: autor (2019).

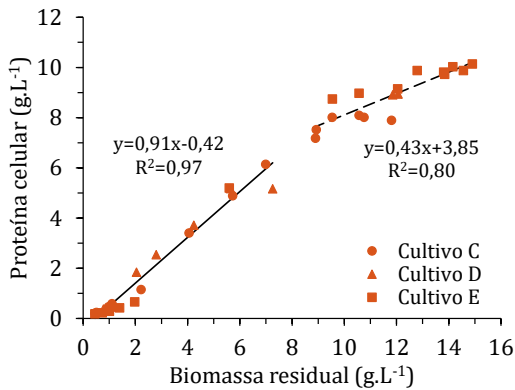


Figura A.2: Relação entre a absorbância a 560 nm e concentração de albumina bovina.



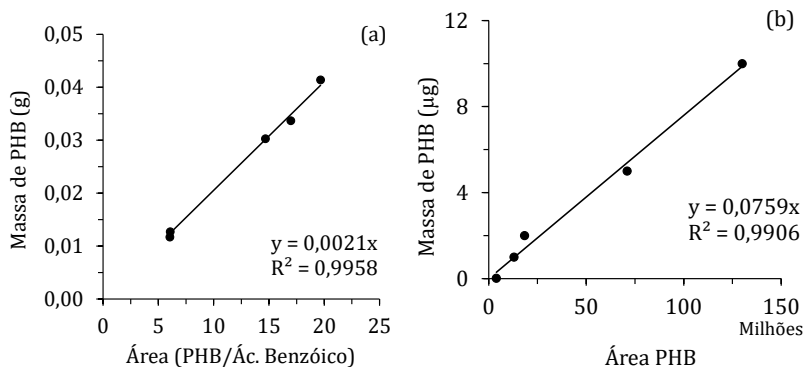
Fonte: autor (2019).

Figura A.3: Relação entre a concentração de biomassa residual e proteína celular.



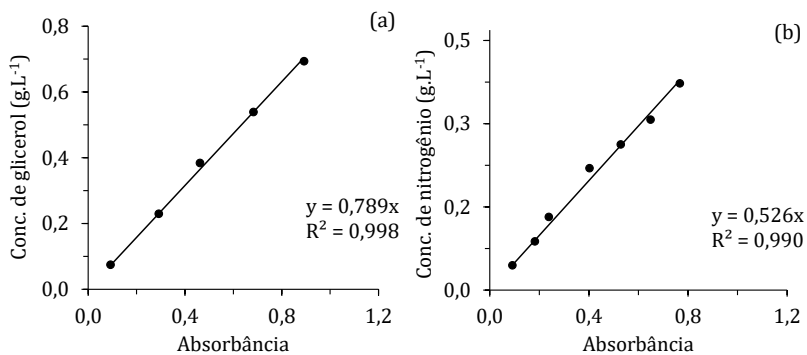
Fonte: autor (2019).

Figura A.4: Exemplo de curva de calibração para determinação da concentração de PHB por (a) cromatografia gasosa e (b) líquida.



Fonte: autor (2019).

Figura A.5: Exemplo de curva de calibração utilizada na determinação da concentração de (a) glicerol e (b) nitrogênio.



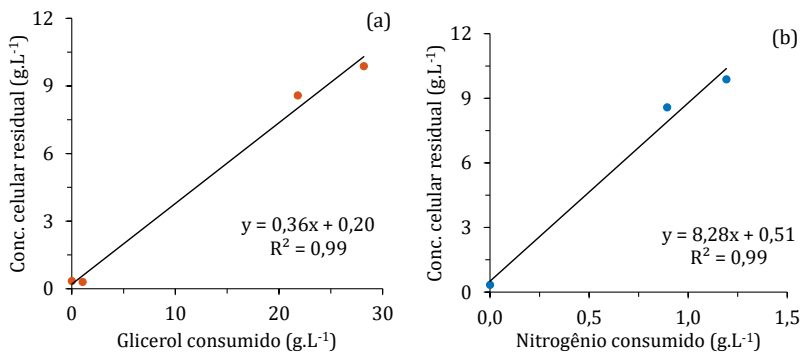
Fonte: autor (2019).



## Apêndice B

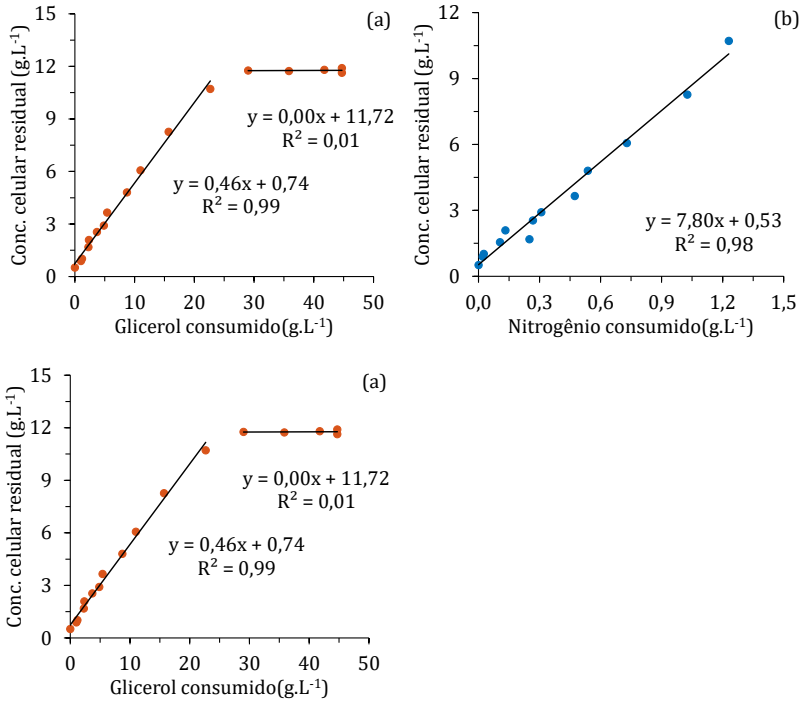
# Fatores de conversão

Figura B.1: Cultivo A - Concentração celular residual em função do (a) glicerol e (b) nitrogênio consumido.



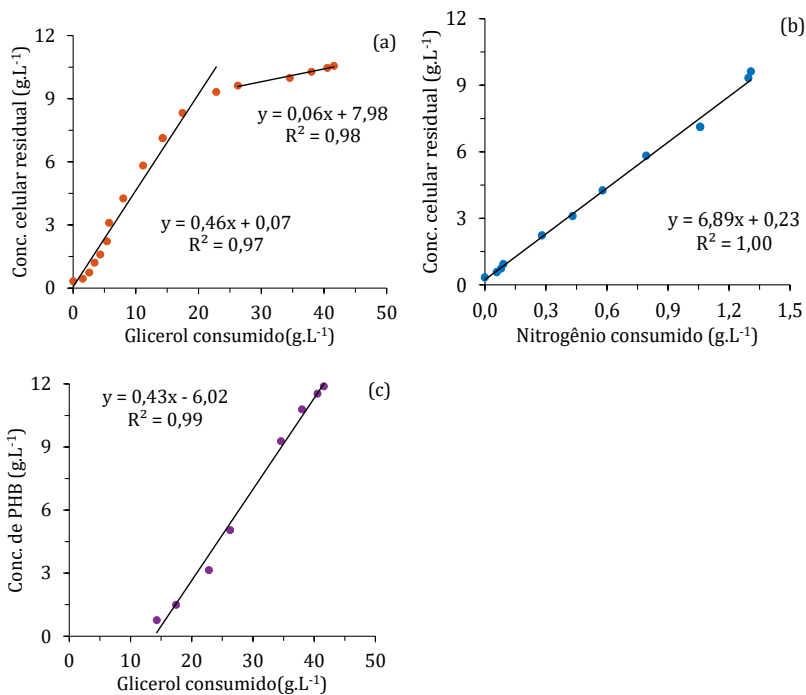
Fonte: autor (2019).

Figura B.2: Cultivo B - Concentração celular residual em função do (a) glicerol e (b) nitrogênio consumido e (c) concentração de PHB em função do glicerol consumido.



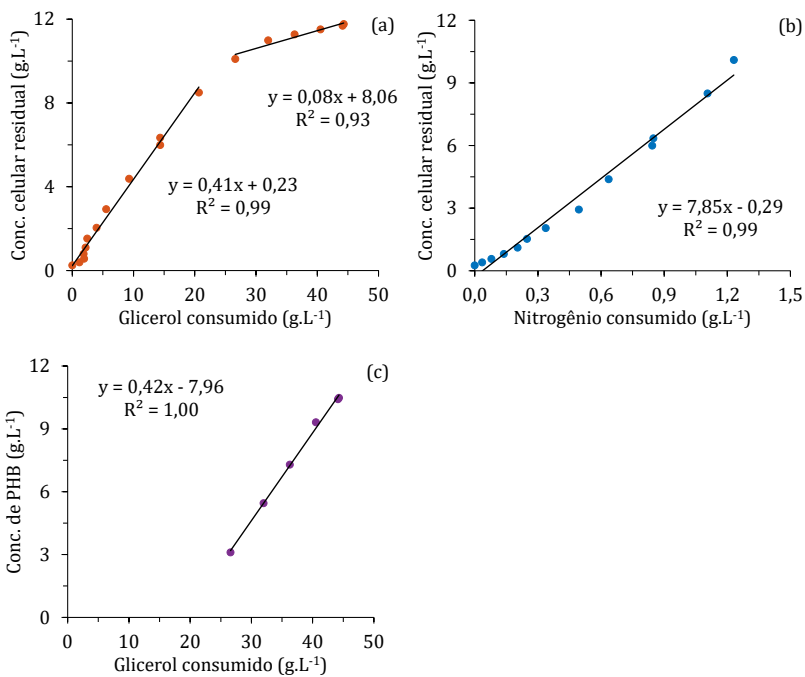
Fonte: autor (2019).

Figura B.3: Cultivo C - Concentração celular residual em função do (a) glicerol e (b) nitrogênio consumido e (c) concentração de PHB em função do glicerol consumido.



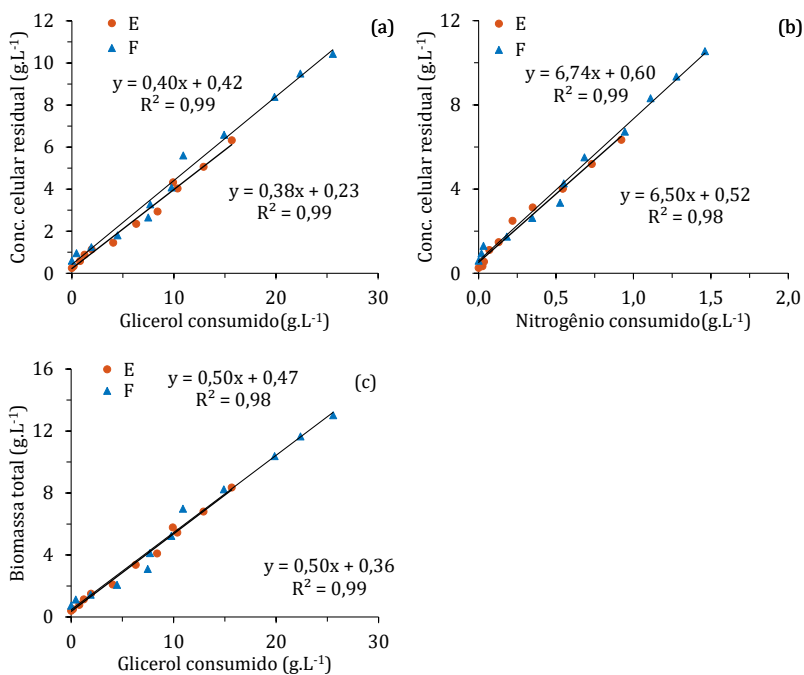
Fonte: autor (2019).

Figura B.4: Cultivo D - Concentração celular residual em função do (a) glicerol e (b) nitrogênio consumido e (c) concentração de PHB em função do glicerol consumido.



Fonte: autor (2019).

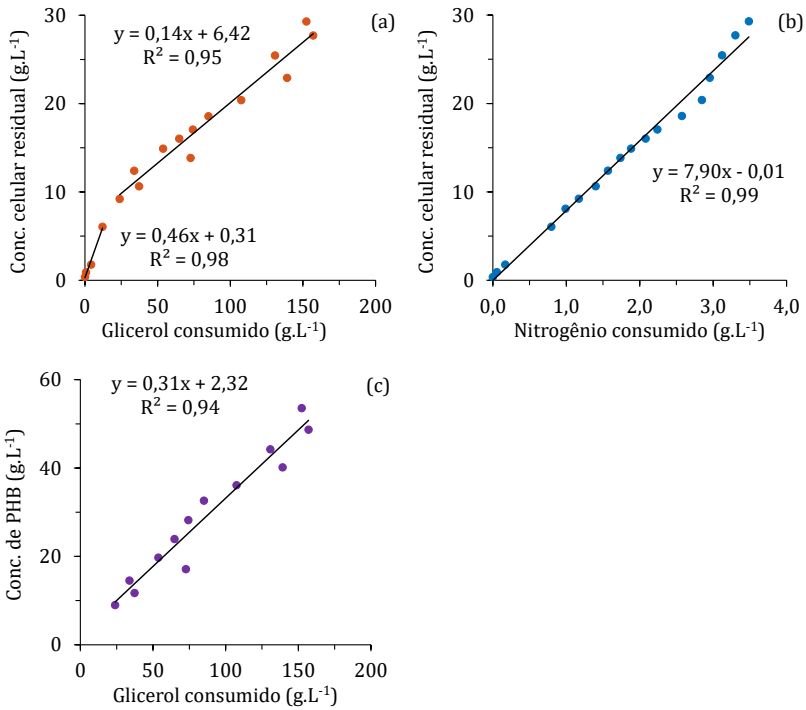
Figura B.5: Cultivo E e F - Concentração celular residual em função do (a) glicerol e (b) nitrogênio consumido e (c) concentração de PHB em função do glicerol consumido.



Fonte: autor (2019).

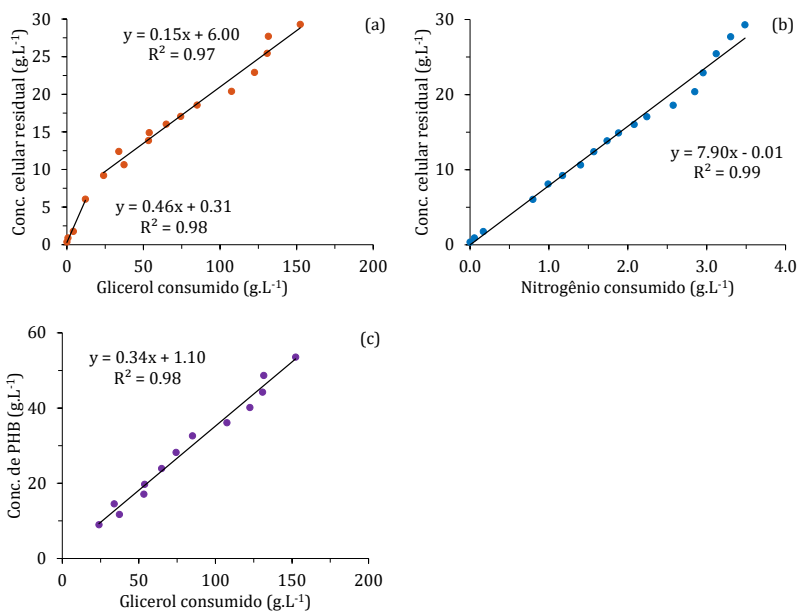


Figura B.6: Cultivo G - Concentração celular residual em função do (a) glicerol e (b) nitrogênio consumido e (c) concentração de PHB em função do glicerol consumido.



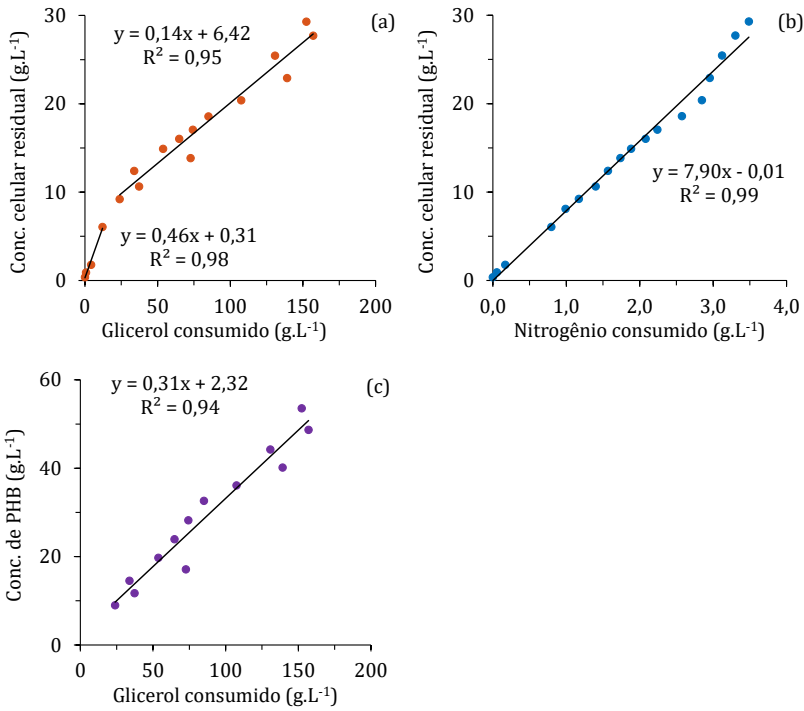
Fonte: autor (2019).

Figura B.7: Cultivo H - Concentração celular residual em função do (a) glicerol e (b) nitrogênio consumido e (c) concentração de PHB em função do glicerol consumido.



Fonte: autor (2019).

Figura B.8: Cultivo I - Concentração celular residual em função do (a) glicerol e (b) nitrogênio consumido e (c) concentração de PHB em função do glicerol consumido.



Fonte: autor (2019).

## Apêndice C

# Parâmetros cinéticos em batelada alimentada

Os valores dos parâmetros do processo, como fatores de conversão e velocidade específica de crescimento e produção, calculados a partir de medidas de concentração celular (peso seco) e concentração de substrato podem ser significativamente afetados pela variação de volume ao longo de um processo em batelada alimentada. A adição de ácido e base para controle do pH e adição de substratos diluem o meio; coletas de amostra, reduzem a massa celular presente no biorreator. Dessa forma, este capítulo visa demonstrar quanto a variação de volume em um cultivo tal qual, como os apresentados neste trabalho, afeta os parâmetros cinéticos e, além disso, mostrar um cálculo corretivo. Para tal, um exemplo numérico é utilizado.

A partir do balanço de massa para células, pode-se determinar a concentração celular esperada no meio quando se adiciona um volume  $V_{ad}$  livre de biomassa no biorreator, apresentado na Equação C.1. O valor dado por esta relação seria o mesmo, caso uma determinação de concentração celular por gravimetria (descrito em 3.1.1, página 61) em fosse realizada.

$$\begin{aligned}
 X_1 &= X_0 e^{\mu(t_1-t_0)} \\
 X_1 V_1 + 0V_{ad} &= X_2(V_1 + V_{ad}) \\
 X_2 &= X_0 e^{\mu(t_1-t_0)} \frac{V_1}{(V_1 + V_{ad})} \tag{C.1}
 \end{aligned}$$

Sendo:

- $X_1$  concentração celular logo antes a diluição ( $g, L^{-1}$ );
- $X_0$  concentração celular no tempo  $t_0$  ( $g, L^{-1}$ );
- $\mu$  velocidade esp. de crescimento ( $h^{-1}$ );
- $t_1$  instante de tempo; (h)
- $t_0$  instante de tempo anterior à  $t_1$  (h);
- $V_1$  volume de meio logo antes a diluição (L);
- $V_{ad}$  volume adicionado (L);
- $X_2$  concentração celular logo após a diluição ( $g, L^{-1}$ ).

O experimento ilustrativo a seguir obedece, de certa maneira, as condições ensaiadas nos cultivos retratados no presente trabalho.

Suponha um cultivo celular onde a velocidade específica de crescimento seja  $0,130 h^{-1}$  ao longo de todo o experimento; a concentração inicial de biomassa,  $0,25 g L^{-1}$ ; o volume inicial de reação, 4 L; para controle do pH, sejam consumidos ao total 125 mL de soluções ácidas e alcalinas; sejam realizados 3 pulsos de substrato com volume unitário de 160 mL. Este cultivo é operado por 50 horas e a cada 3 horas, 25 mL de meio são coletados. A variação de volume e biomassa ao longo do tempo é apresentada na Tabela C.1, sendo a concentração de biomassa determinada por meio da Equação C.1.

Se o cultivo fosse operado como batelada simples, a concentração celular atingida no mesmo período e sob a mesma velocidade específica de crescimento seria de  $166,28 g L^{-1}$ . Dado a discrepância entre as concentrações finais de biomassa, é esperado uma redução da velocidade específica de crescimento celular aparente, como mostra a Equação C.2.

$$\mu = \frac{\ln \frac{142,92}{0,25}}{(50 - 0)} = 0,1270 h^{-1} \tag{C.2}$$

Tabela C.1: Dados de tempo, volume adicionado, removido e total e biomassa em um cultivo fictício. Os valores de concentração celular simulam os obtidos por análise gravimétrica.

Tempo (h)	VOLUME Adicionado (L)	VOLUME Removido (L)	Total (L)	Conc. celular (g L <sup>-1</sup> )
0	0,000	0,025	3,975	0,25
6	0,013	0,050	3,938	0,54
12	0,013	0,050	3,901	1,18
18	0,014	0,050	3,865	2,57
24	0,026	0,050	3,841	5,57
30	0,026	0,050	3,817	12,06
36	0,160	0,050	3,927	25,26
42	0,160	0,050	4,037	52,94
45	0,160	0,050	4,147	75,21
48	0,020	0,050	4,117	110,55
50	0,013	0,050	4,080	142,92
Soma	0,605	0,525		

Fonte: autor (2019).

Além da divergência na velocidade específica de crescimento, outros parâmetros cinéticos são afetados, como o fator de conversão de substrato em célula. Admitindo um valor fixo de  $0,50 \text{ g}_{\text{Xr}} \text{ g}_{\text{S}}^{-1}$  para  $Y_{\text{X/S}}$ , no crescimento celular previsto de  $166,28 \text{ g L}^{-1}$  em 4 L de volume de reação, deve ser adicionado 1.328,28 g de glicerol no meio  $((166,28 - 0,25)/0,50 * 4)$ . Porém, quando se quantifica este parâmetro a partir de dados de biomassa obtidos por gravimetria (Tabela C.1), se obtém o valor de  $0,43 \text{ g}_{\text{Xr}} \text{ g}_{\text{S}}^{-1}$   $((142,92 - 0,25)/1.328,28 * 4)$ . O mesmo raciocínio empregado na conversão de nitrogênio em biomassa, o valor de  $Y_{\text{X/N}}$  de  $8 \text{ g}_{\text{Xr}} \text{ g}_{\text{N}}^{-1}$  se torna  $6.86 \text{ g}_{\text{Xr}} \text{ g}_{\text{N}}^{-1}$ .

Uma alternativa no tratamento dos dados em cultivos batelada alimentada poderia ser trabalhar com os valores de massa ao invés de concentração, uma vez que não seriam afetados pela diluição do meio. Isto posto, o conjunto de Equações C.3 apresenta o cálculo da velocidade específica

de crescimento a partir dos dados da Tabela C.1.

$$V_0 X_0 = 4 * 0,25 = 1g$$

$$V_f X_f = 4,080 * 142,92 = 583,11g$$

$$\mu = \frac{\ln \frac{583,11}{1}}{(50 - 0)} = 0,1274 \tag{C.3}$$

Como pode ser observado, a velocidade específica de crescimento é menor que a real (0,13 h<sup>-1</sup>). Esta diferença é causada pela coleta de amostras para análise da cinética de crescimento. Tomando a biomassa retirada do reator, pode-se entender que se não houvesse sido coletada, continuaria a se reproduzir desde o momento de sua suposta coleta até o final do cultivo. A quantificação da massa de célula que deveria ter sido produzida pode ser dada pela Equação C.4 e sua aplicação no exemplo instrutivo é apresentada na Tabela C.2 .

$$\sum_{i=0}^{t_f} X_i V_i e^{0,13(t_f - t_i)} \tag{C.4}$$

Sendo i um instante de coleta de amostra.

Corrigindo a Equação C.3 com o valor adicional de biomassa pode-se determinar a velocidade específica de crescimento celular, conforme Equação C.5. O valor obtido, é o estipulado no início do capítulo, 0,13 h<sup>-1</sup>.

$$\mu = \frac{\ln \frac{583,11+82,03}{1}}{(50 - 0)} = 0,1300 \text{ h}^{-1} \tag{C.5}$$

Entretanto, para realizar a correção nesta forma o valor correto da velocidade específica de crescimento é previamente necessário, o qual não é conhecido. Dessa forma, uma nova correção é proposta (Equação C.6), dada termos de concentração por se tratar de uma propriedade intensiva. Tal correlação foi obtida por meio do princípio da conservação da massa.

$$\theta'_i = \theta_i \prod_{j=0}^i \frac{V_{j-1} + V_{ad_j}}{V_{j-1}} \tag{C.6}$$

Tabela C.2: Quantificação da massa de célula que deveria ser gerada caso não houvesse coleta de amostra no cultivo ilustrativo.

Tempo (h)	Volume removido (L)	Biomassa (g)
0	0,025	4,16
6	0,050	8,29
12	0,050	8,26
18	0,050	8,23
24	0,050	8,18
30	0,050	8,12
36	0,050	7,79
42	0,050	7,49
45	0,050	7,20
48	0,050	7,17
50	0,050	7,15
	Total	82,03

Fonte: autor (2019).



Sendo:

$\theta'_i$  concentração (celular, de produto ou de substratos) no tempo de coleta  $i$  corrigida ( $\text{g L}^{-1}$ );

$\theta_i$  concentração (celular, de produto ou de substratos) no tempo de coleta  $i$  ( $\text{g L}^{-1}$ );

$V$  volume de meio (L);

$V_{ad}$  volume adicionado (ácido, base e substrato) entre o tempo de coleta  $(i - 1)$  e  $i$  (L).

A mesma abordagem pode ser realizada para a concentração de glicerol, produto e nitrogênio. Vale ressaltar que o valor obtido não corresponde ao real no instante  $i$  mas sim uma medida corretiva com a finalidade de se obter parâmetros cinéticos mais fidedignos à realidade do cultivo.

A determinação apenas do termo produto da Equação C.6 gera uma espécie de fator de correção, o qual é apresentado na Tabela C.3. Ainda na mesma tabela, este fator de correção é aplicado à concentração de biomassa e a partir de tais valores, encontra-se o valor de  $0,13 \text{ h}^{-1}$  para a velocidade específica de crescimento.

Tabela C.3: Fator de correção da diluição do meio aplicado ao exemplo numérico.

Tempo (h)	Fator de correção (-)	Conc. celular ( $\text{g L}^{-1}$ )
0	1,00	0,25
6	1,00	0,55
12	1,01	1,19
18	1,01	2,60
24	1,02	5,66
30	1,02	12,35
36	1,07	26,94
42	1,11	58,77
45	1,15	86,81
48	1,16	128,21
50	1,16	166,29

Fonte: autor (2019).

Diferentes abordagens já foram dadas à este problema. Borzani (2008) considerou o volume ocupado pela biomassa, além deste, diversos autores consideram a variação de volume devido à adição de soluções ao meio porém, o efeito da coleta de amostras é negligenciado (RAMÍREZ et al., 1994; GARCÍA et al., 2014).



# Apêndice D

## Código-fonte

O código escrito em Matlab para a realização das simulações discutidas ao longo deste trabalho é apresentado a seguir.

```
1 function modelo
2 clear; clc;
3 % Ler dados experimentais para determinação do rRMSE
4 exp_02=csvread('exp_02.csv'); exp_P =csvread('exp_P.csv');
5 exp_Xt=csvread('exp_Xt.csv'); exp_S=csvread('exp_S.csv');
6 exp_N=csvread('exp_N.csv'); exp_Q02X=csvread('exp_Q02X.csv');
7 save('Variaveis','exp_02','exp_P','exp_Xt','exp_S','exp_N','exp_Q02X')
8
9 Salvar=1; % Exportar dados para planilha excel
10 Otimizacao=1; % Interpolar dados de tempo do modelo para corresponder aos
    experimentais
11
12 Xri=0.25; Pi=0.07; Si=24.17; Ni=1.23; % [g/L] Condições iniciais
13 % Cinética microbiana
14 Csat=0.00571; % [gO2/L] Concentração de saturação
15 Kpn=0.424; % [g/L] Constante de afinidade nitrogênio–produto
16 Kps=0.285; % [g/L] Constante de afinidade glicerol–produto
17 Kxn=0.075; % [g/L] Constante de afinidade nitrogênio–biomassa
18 Kxs=3.59270; % [g/L] Constante de afinidade glicerol–biomassa
19 Ypo=2.65; % [gP/gO2] Fator de conversão de oxigênio em PHB
20 Yps=0.4383; % [gP/gS] Fator de conv. de glicerol em produto
21 Yxn=8.1707; % [gX/gN] Fator de conv. de nitrogênio em biomassa
22 Yxo=1.825; % [gXr/gO2] Fator de conversão de oxigênio em célula
23 Yxs=0.46; % [gX/gS] Fator de conv. de substrato em biomassa
24 mo=0; % [gO2/gXr/h] Consumo de O2 para manutenção celular.
```

```

25 ms=0;           % [gS/gX/h] Consumo de S para manutenção celular
26 mu_Pmax=0.106; % [gP/gXr/h] Velocidade máxima de produção
27 mu_Xrmax=0.158;% [h-1] Vel. específica de crescimento
28 theta=0.4609;  % [-] Expoente do termo fração acumulada
29
30 PXmax=4;       % [-] Capacidade de acúmulo máxima
31 Ci=Csat*0.90;  % [gO2/L] Concentração inicial
32 % AGITAÇÃO E MISTURA
33 V=4;           % [L] Volume inicial de meio
34 Nrot=450;      % [rpm] Velocidade de agitação
35 Q=0.2;         % [lpm] Vazão de aeração (1 atm 20C)
36
37 ncond=5; % Número de condições (var. de agitação/aeração ou pulso de
           % glicerol]
38 tf=[12 18.6 23 27 48];
39 Fs=0; Sm=0; % Solução de glicerol (alim. contínua)
40 Fn=0; Nm=0; % Solução de nitrogênio (alim. contínua)
41
42 %Executar modelo das condições iniciais (t=0) a t=tf(1)
43 tspan=linspace(0,tf(1),tf(1)*4+1);
44 par=[Yxs Yxn Yps Yxo Ypo mu_Xrmax mu_Pmax Kxs Kxn Kps Kpn PXmax theta mo ms
       Csat Nrot Q Fs Sm Fn Nm];
45 [t,y]=ode45(@balancos,tspan,[Xri Si Ni Pi Ci],[],par);
46 ED0=[t,y];
47 kLa(1,1)=0; kLa(1,2)=agitacao(Nrot,Q,V);
48 kLa(2,1)=tf(1); kLa(2,2)=kLa(1,2);
49
50 for j=2:ncond
51     Xri=y(end,1);Si=y(end,2);Ni=y(end,3);Pi=y(end,4);Ci=y(end,5);
52     switch j
53         case 2 % Caso para t=j-1
54             Nrot=600;
55         case 3
56             Q=0.4;
57         case 4
58             Nrot=750;
59         case 5
60             Si=30.02;
61     end
62     tspan=linspace(tf(j-1)+0.01,tf(j),(tf(j)-tf(j-1))*4+1);
63     par=[Yxs Yxn Yps Yxo Ypo mu_Xrmax mu_Pmax Kxs Kxn Kps Kpn PXmax theta mo
          ms Csat Nrot Q Fs Sm Fn Nm];
64     [t,y]=ode45(@balancos,tspan,[Xri Si Ni Pi Ci],[],par);
65     ED0=[ED0;t,y];
66     kLa(j*2-1,1)=tf(j-1); kLa(j*2-1,2)=agitacao(Nrot,Q,V);

```

```

67     kLa(j*2,1)=tf(j); kLa(j*2,2)=agitacao(Nrot,Q,V);
68 end
69 % CÁLCULOS DENTRO DA EDO
70 P=zeros(1,length(EDO)); muP=zeros(1,length(EDO)); S=zeros(1,length(EDO));
71 muS=zeros(1,length(EDO)); N=zeros(1,length(EDO)); Q02=zeros(1,length(EDO));
72 C=zeros(1,length(EDO)); muXr=zeros(1,length(EDO)); Xt=zeros(1,length(EDO));
    Xr=zeros(1,length(EDO)); Q02X=zeros(1,length(EDO));
73
74 for i=1:length(EDO)
75     t(i)=EDO(i,1); Xr(i)=EDO(i,2); S(i)=EDO(i,3);
76     N(i)=EDO(i,4); P(i)=EDO(i,5); C(i)=EDO(i,6);
77
78     muXr(i)=mu_Xrmax*(S(i)/(Kxs+S(i)))*(N(i)/(Kxn+N(i)));
79     muP(i)=mu_Pmax*(1-N(i)/(N(i)+Kpn))*(S(i)/(S(i)+Kps))*(1-((P(i)/Xr(i))/
        PXmax)^theta);
80     muS(i)=muXr(i)/Yxs+muP(i)/Yps+ms;
81     Q02(i)=muXr(i)/Yxo+muP(i)/Ypo+mo;
82     Xt(i)=Xr(i)+P(i);
83     Q02X(i)=Q02(i)*Xr(i);
84 end
85 % OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS — Cálculo de rRMSE
86 if Otimizacao>0
87     n_func_obj=6;
88     C=C(:); P=P(:); Xt=Xt(:); S=S(:); N=N(:); Q02X=Q02X(:);
89     SSE=zeros(1,n_func_obj); Ef=SSE; Ef_den=SSE; rRMSE=SSE;
90     dados_modelo=unique([t,C,P,Xt,S,N,Q02X],'rows');
91     dados_modelo=unique(dados_modelo,'rows');
92     load('Variaveis');
93     w=[length(exp_02) length(exp_P) length(exp_Xt) length(exp_S) length(
        exp_N) length(exp_Q02X)];
94     for j=1:n_func_obj
95         switch j
96             case 1
97                 dados_exp=exp_02;
98             case 2
99                 dados_exp=exp_P;
100            case 3
101                dados_exp=exp_Xt;
102            case 4
103                dados_exp=exp_S;
104            case 5
105                dados_exp=exp_N;
106            case 6
107                dados_exp=exp_Q02X;
108        end

```

```

109     modelo_interp=zeros(1,w(j));
110     media_dados_exp=mean(dados_exp(:,2));
111     for i=1:w(j)
112         modelo_interp(i)=interp1(dados_modelo(:,1),dados_modelo(:,j+1),
113             dados_exp(i,1));
114         SSE(j)=SSE(j)+(modelo_interp(i)-dados_exp(i,2))^2; % Função
115             multiobjetivo
116     end
117     rRMSE(j)=[(SSE(j)/w(j))^0.5]/media_dados_exp;
118 end
119 % RESULTADOS
120 if Salvar>0 % Salvar dados em planilha excel
121     muXr=muXr(:);muS=muS(:);muP=muP(:);Xt=Xt(:);Q02=Q02(:);
122     Dados=[E00 Xt muXr muS muP Q02];
123     xlswrite('Modelo.xlsx',Dados,1,'A6');xlswrite('Modelo.xlsx',kLa,1,'06');
124     xlswrite('Modelo.xlsx',par,1,'B3');
125     winopen('Modelo.xlsx')
126 end
127
128 function dy=balancos(t,y,par)
129 persistent VDados
130 % Redefinição dos parâmetros
131 Yxs=par(1); Yxn=par(2); Yps=par(3); Yxo=par(4); Ypo=par(5);
132 mu_Xrmax=par(6); mu_Pmax=par(7);
133 Kxs=par(8); Kxn=par(9); Kps=par(10); Kpn=par(11);
134 PXmax=par(12); theta=par(13); mo=par(14); ms=par(15); Csat=par(16);
135 Nrot=par(17); Q=par(18); Fs=par(19); Sm=par(20); Fn=par(21); Nm=par(22);
136 dy=zeros(5,1); Xr=y(1); S=y(2); N=y(3); P=y(4); C=y(5);
137
138 muXr=mu_Xrmax*(S/(Kxs+S))*(N/(Kxn+N));
139 muP=mu_Pmax*(S/(S+Kps))*(1-N/(N+Kpn))*[1-((P/Xr)/PXmax)^theta];
140 muS=muXr/Yxs + muP/Yps+ms;
141 Q02=muXr/Yxo + muP/Ypo+mo;
142
143 if t<0.5 VDados=csvread('exp_Volume.csv');end % Dados experimentais
144 dvdt = interp1(VDados(:,1),VDados(:,2),t);
145 V = interp1(VDados(:,1),VDados(:,3),t);
146
147 kLa=agitacao(Nrot,Q,V); % Rotina para cálculo de kLa
148
149 dy(1)= Xr*muXr - dvdt/V*Xr; % Biomassa residual
150 dy(2)= -Xr*muS - dvdt/V*S + Fs*Sm/V; % Glicerol
151 dy(3)= -Xr*muXr/Yxn - dvdt/V*N + Fn*Nm/V; % Nitrogênio

```

```

152 dy(4)= Xr*muP - dVdt/V*P; % PHB
153 dy(5)= kLa*(Csat-C) - Q02*Xr - dVdt*C; % Oxigênio dissolvido
154 end

```

```

1 function kLa=agitacao(Nrot,Q,V)
2 % Geometria do biorreator
3 Dt=0.18; % [m] Diâmetro do tanque
4 Di=0.059; % [m] Diâmetro do agitador
5 Wi=0.018; % [m] Largura do agitador
6 % Geral
7 g=9.81; % [m/s^2] Gravidade
8 Np=5.5; % [-] Número de potência
9 rho=1000; % [kg/m^3] Densidade
10 % Conversões
11 Nrot=Nrot/60; % [min^-1] to [s^-1]
12 Q=Q*303.15/298.15; % Correção do volume pela mudança de T
13 Q=Q/1000/60; % [lpm] to [m^3/s]
14 Vliq=V/1000; % [L] to [m^3]
15 % Transferência de pot.
16 % Como deltaC=Di, P2=1.5*P1 (Hudcova, 1989)
17 P=Np*rho*(Nrot^3)*(Di^5)*1.5; % [W]
18 As=(pi*Dt^2)/4; % [m^2] Área superficial do líquido
19 vs=Q/As; % [m/s] Velocidade superficial
20 % pot. transferida sob aeração
21 Pg=1.224*(P^2*Nrot*Di^3/(Q^0.56))^0.432; % [W] Abarði (1988)
22 % kLa
23 % Van't Riet (1979)
24 %c=0.002; alpha=0.7; beta=0.36;
25 % Este trabalho
26 c=0.012; alpha=0.308; beta=0.165;
27
28 kLa=c*(Pg/Vliq)^alpha*(vs)^beta*3600; % [h^-1]
29 end

```

```

1 function SensGlobal
2 amostra=csvread('SensGlobal5000.csv'); N=length(amostra);
3 Y=[];
4 for i=1:N % Executa o modelo com os valores gerados por LHS
5 Csat=amostra(i,1); Kpn=amostra(i,2); Kps=amostra(i,3); Kxn=amostra(i,4);
6 Kxs=amostra(i,5); Ypo=amostra(i,6); Yps=amostra(i,7); Yxn=amostra(i,8);
7 Yxo=amostra(i,9); Yxs=amostra(i,10); mo=amostra(i,11); ms=amostra(i,12);
8 mu_Pmax=amostra(i,13); mu_Xrmax=amostra(i,14); theta=amostra(i,15);
9
10 [t,Xr,P,C]=modelo(Csat, Kpn, Kps, Kxn, Kxs, Ypo, Yps, Yxn, Yxo, Yxs, mo, ms
, mu_Pmax, mu_Xrmax, theta);

```



```

11 Y=[Y,Xr,P,C];
12 end
13 x=zeros(N,1); y=zeros(N,1);[a,b]=size(Y);PRCC=zeros(a,2);pvalue=zeros(a,2);
14 for i=1:3           % Para cada output
15     for j=1:15      % Para cada parâmetro
16         for m=1:a   % Para cada passo de tempo
17             for k=1:N % Para cada execução
18                 x(k,1)=amostra(k,j);
19                 if k==1
20                     y(k,1)=Y(m,k+i-1);
21                     z=amostra;
22                     z(:,j)=[];
23                 else
24                     y(k,1)=Y(m,k*3-3+i);
25                     if k==N
26                         [rho,p]=partialcorr(x,y,z,'Type','Spearman');
27                         PRCC(m,j)=rho;
28                         pvalue(m,j)=p;
29                     end
30                 end
31             end
32         end
33     end
34     xlsxwrite('SensGlobal5000.xlsx',t,i,'A3');
35     xlsxwrite('SensGlobal5000.xlsx',PRCC,i,'B3');
36 end

```