

CLÁUDIA REGINA SQUIO

**ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE
SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS NA PRODUÇÃO DE POLI(3-
HIDROXIBUTIRATO-*co*-3-HIDROXIVALERATO) POR
*RALSTONIA EUTROPHA***

FLORIANÓPOLIS - SC

2003

CLÁUDIA REGINA SQUIO

**ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE
SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS NA PRODUÇÃO DE POLI(3-
HIDROXIBUTIRATO-*co*-3-HIDROXIVALERATO) POR RALSTONIA
EUTROPHA**

**Dissertação submetida à Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do grau
de mestre em Engenharia de Alimentos.**

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

FLORIANÓPOLIS, JULHO DE 2003

TERMO DE APROVAÇÃO

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

AGRADECIMENTOS

Ao finalizar esta etapa, gostaria de aqui deixar meu sincero agradecimento àqueles que de alguma forma colaboraram com este trabalho e tornaram possível sua realização:

- aos meus pais, Iolita e Clóvis, pelo carinho e constante incentivo;
- ao meu irmão, Clovizinho, e meus cunhados pela amizade e hospedagem;
- às minhas amigas Cínthia De Vecchi, Cíntia Maria Ferreira e Mônica, pela amizade, companhia nas muitas noites de fermentação passadas no laboratório, e acima de tudo, pela enorme ajuda e dedicação, sem os quais este trabalho não teria se realizado;
- aos amigos Leandro Finkler e Cíntia Marangoni, que me ensinaram os passos desta pesquisa;
- a todos os amigos Engebianos, pela amizade e companheirismo do dia-a-dia;
- a UFSC, onde cursei a graduação e agora tive a oportunidade de cursar a pós-graduação, e assim, estendo a todos os professores e funcionários com os quais convivi;
- à CAPES pelo apoio financeiro;
- às empresas Expresso do Sul e Catarinense, com as quais viajei seguramente, todos os finais de semana;

E, por fim, com imensa alegria e de uma forma muito especial, agradeço às duas pessoas que mais me incentivaram e tornaram este momento possível:

- à minha querida amiga e orientadora Profa. Gláucia, sempre confiante e presente em todos os momentos, na orientação, nas críticas e correções e mais do que isso, nas conversas, conselhos e diversões;
- ao meu grande amor Jeder, sempre me incentivando a buscar e realizar meus objetivos, mesmo que para isso a distância seja necessária; pela compreensão, amizade, companheirismo e amor a cada novo dia, meu enorme reconhecimento e retribuição.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE ABREVIATURAS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	2
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 DESCRIÇÃO DOS POLIHIDROXIALCANOATOS	6
2.1.1 <i>Histórico dos polihidroxicanoatos</i>	6
2.1.2 <i>Características e propriedades</i>	8
2.1.2.1 Estrutura química	8
2.1.2.2 Propriedades físicas	10
2.2 ORGANISMOS PRODUTORES DE PHA'S	12
2.2.1 <i>Microrganismos metilotróficos</i>	13
2.2.2 <i>Bactérias do gênero Azotobacter</i>	14
2.2.3 <i>Bactérias do gênero Alcaligenes</i>	14
2.2.4 <i>Bactérias do gênero Pseudomonas</i>	15
2.2.5 <i>Ralstonia eutropha</i>	15
2.2.6 <i>Bactérias do gênero Burkholderia</i>	16
2.2.7 <i>Organismos recombinantes</i>	16
2.2.7.1 <i>Escherichia coli</i> recombinante	17
2.2.7.2 <i>Ralstonia eutropha</i> recombinante	18
2.2.7.3 Plantas transgênicas	18
2.3 DESCRIÇÃO GERAL DE <i>RALSTONIA EUTROPHA</i>	19
2.4 METABOLISMO EM <i>RALSTONIA EUTROPHA</i>	21
2.4.1 <i>Metabolismo durante crescimento balanceado</i>	21
2.4.2 <i>Biossíntese de P(3HB)</i>	22
2.4.2.1 Enzimas envolvidas na biossíntese de P(3HB)	23
2.4.2.1.1 3-β-cetotiolase	23
2.4.2.1.2 Acetoacetyl-CoA redutase	23
2.4.2.1.3 PHA sintase	24
2.4.2.2 Genes responsáveis pela biossíntese de P(3HB)	25
2.4.3 <i>Biossíntese de P(3HB-co-3HV)</i>	26
2.4.4 <i>Regulação da síntese de PHA's</i>	27
2.4.5 <i>Degradação intracelular de P(3HB)</i>	30
2.5 BIODEGRADABILIDADE	31

2.6 FATORES QUE AFETAM O CUSTO DE PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS.....	35
2.6.1 Produtividade de PHA's.....	36
2.6.2 Conteúdo de PHA's nas células.....	37
2.6.3 Custo do substrato e rendimento em PHA's.....	37
2.6.4 Custos de recuperação.....	38
2.7 PRODUÇÃO INDUSTRIAL.....	39
2.8 EXTRAÇÃO DE PHA'S.....	40
2.9 APLICAÇÃO DE PHA'S.....	41

CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS..... 45

3.1 MICRORGANISMO.....	45
3.2 MEIOS DE CULTURA.....	45
3.3 CONDIÇÕES DE CULTURA.....	47
3.3.1 Pré-culturas.....	47
3.3.2 Culturas em frascos agitados.....	47
3.3.3 Culturas em Biorreator.....	48
3.3.3.1 Estratégias de alimentação.....	49
3.3.3.1.1 Alimentação em Fosfato.....	49
3.3.3.1.2 Alimentação em Açúcar.....	49
3.3.3.1.3 Alimentação em ácido propiônico.....	50
3.3.3.1.4 Alimentação em ácidos graxos.....	50
3.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	50
3.4.1 Amostragem.....	50
3.4.2 Determinação da concentração de biomassa.....	51
3.4.2.1 Medida por espectrometria.....	51
3.4.2.2 Medida por gravimetria.....	51
3.4.3 Dosagem de açúcares.....	51
3.4.4 Dosagem de Proteínas.....	52
3.4.5 Dosagem de Fosfato.....	52
3.4.6 Dosagem de P(3HB-co-3HV).....	53
3.5 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE P(3HB-co-3HV).....	54
3.5.1 Extração de P(3HB-co-3HV).....	54
3.5.2 Caracterização de P(3HB-co-3HV).....	55
3.6 TRATAMENTO DE DADOS.....	56
3.6.1 Ajuste dos dados experimentais.....	56
3.6.2 Análise Cinética.....	56
3.6.2.1 Velocidades específicas de crescimento.....	56
3.6.2.2 Velocidade específica de produção de P(3HB-co-3HV).....	57
3.6.3 Produtividade média de P(3HB-co-3HV).....	57
3.6.4 Produtividade de P(3HB-co-3HV) na fase de produção.....	57

CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1 ESTRATÉGIA DE ALIMENTAÇÃO DE FOSFATO DURANTE A FASE DE PRODUÇÃO DE P(3HB-CO-3HV)	60
4.1.1 Conclusão.....	71
4.2 IDENTIFICAÇÃO DA FASE DE PRODUÇÃO DE P(3HB-CO-3HV) POR <i>R. EUTROPHA</i> ATRAVÉS DO POTENCIAL REDOX.....	72
4.2.1 Conclusão.....	84
4.3 ESTRATÉGIA DE UTILIZAÇÃO DE SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS	85
4.3.1 Utilização dos ácidos graxos linoleico e oleico	85
4.3.1.1 Conclusão	92
4.3.2 Utilização de óleos vegetais	92
4.3.2.1 Conclusão	98
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO P(3HB-CO-3HV) PRODUZIDO.....	99
 CAPÍTULO V - CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	103
CAPÍTULO IV - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
ANEXOS.....	112
ANEXO I - CURVAS PADRÃO.....	113
ANEXO II - RESULTADOS EXPERIMENTAIS - BIORREATOR	116
ANEXO III - RESULTADOS EXPERIMENTAIS - FRASCOS AGITADOS	119
ANEXO IV - ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS.....	120

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - ESTRUTURA GERAL DOS PHA'S PARA DIFERENTES MONÔMEROS	9
FIGURA 2.2(A): RALSTONIA EUTROPHA EM FASE DE CRESCIMENTO	20
FIGURA 2.2(B) : RALSTONIA EUTROPHA NA FASE DE PRODUÇÃO.....	20
FIGURA 2.3: PRODUTOS DO ACETIL-COA EM CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO BALANCEADO E DE EXCESSO DE CARBONO	22
FIGURA 2.4 : REPRESENTAÇÃO DA FORMAÇÃO DE GRÂNULOS DE PHA	25
FIGURA 2.5 : GENES RESPONSÁVEIS PELA BIOSÍNTESE DE P(3HB) EM <i>R. EUTROPHA</i>	26
FIGURA 2.6: VIAS DE SÍNTESE DE P(3HB-CO-3HV) A PARTIR DE PRECURSORES DE ACETIL-COA, E ÁCIDO PROPIÔNICO OU VALÉRICO EM <i>R. EUTROPHA</i>	28
FIGURA 2.7: VIA DE SÍNTESE DE P(3HB) POR <i>R. EUTROPHA</i> E SEU CIRCUITO REGULATÓRIO	29
FIGURA 2.8: BIOSÍNTESE E DEGRADAÇÃO DO P(3HB).....	31
FIGURA 2.9: DEGRADAÇÃO DE FRASCOS DE P(3HB-CO-3HV) EM ÁGUA DE ESGOTO.....	34
FIGURA 2.10: BIOCICLO DE POLIHIDROXIALCANOATOS	35
FIGURA 3.1: EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NO ESTUDO (BIORREATOR, CROMATÓGRAFO, ETC).....	48
FIGURA 4.1 CURVA OBTIDA PARA ANÁLISE DE DSC PARA AMOSTRA DE P(3HB-CO-3HV) INDUSTRIAL (1), P(3HB-CO-3HV) EXPERIMENTAL (2) E P(3HB) INDUSTRIAL (3).....	100
FIGURA A1: CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR A PARTIR DA ABSORBÂNCIA	114
FIGURA A2: CURVA PADRÃO DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES PELO MÉTODO DO ÁCIDO 3-5-DINITROSALICÍLICO (DNS)	114
FIGURA A3: CURVA PADRÃO DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BIURETO, UTILIZANDO-SE ALBUMINA BOVINA COMO PADRÃO.....	115
FIGURA A4: CURVA DE PADRÃO DE DETERMINAÇÃO DE P(3HB-CO-3HV), UTILIZANDO-SE ÁCIDO BENZÓICO COMO PADRÃO INTERNO	115
FIGURA A5: EVOLUÇÃO DA BIOMASSA TOTAL (□), P(3HB-CO-3HV) (▲); BIOMASSA RESIDUAL (—); PROTEÍNA (O) E CONSUMO DE SUBSTRATO (●) PARA AS CULTURAS EM BIORREATOR.....	117
FIGURA A6: EVOLUÇÃO DA BIOMASSA RESIDUAL, EM LN (●), POTENCIAL REDOX (◆) E FOSFATO RESIDUAL (▲) PARA AS CULTURAS EM BIORREATOR.....	118
FIGURA A7: EVOLUÇÃO DA ABSORBÂNCIA COM O TEMPO PARA AS CULTURAS EM FRASCOS AGITADOS, COM SUPLEMENTAÇÕES	119

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.2: BIODEGRADAÇÃO DE UM FILME DE 1MM DE P(3HB-co-3HV) EM DIFERENTES AMBIENTES....	33
TABELA 3.1: COMPOSIÇÃO DO MEIO MM	46
TABELA 3.2: COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO CONCENTRADA DE OLIGO-ELEMENTOS.....	46
TABELA 3.3: CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES DE FOSFATO E R _x CORRESPONDENTE	49
TABELA 3.4: SEQUÊNCIA PARA A DOSAGEM DE FOSFATO.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

μ	velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
μ_{Max}	velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})
Abs	Absorbância
DSM	Deutsche Sammlung Vor Mikroorganismen Und Zellkulturen
PHA	Polihidroxiacanoato
P(3HB)	poli-3-hidroxiacetato
P(3HB-co-HV)	poli-3-hidroxiacetato-co-3-hidroxi-valerato
3HV	3-hidroxi-valerato
3HB	3-hidroxi-acetato
rpm	rotações por minuto
S	substrato utilizado (g)
t	tempo (h)
vvm	volume de ar por volume de meio por minuto
Xr	biomassa residual (g)
Xt	biomassa total (g)
Eh	potencial óxido-redutor, potencial de óxido-redução
ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
TCA	ciclo dos ácidos tricarbóxicos
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
CoASH	coenzima A
BSA	albumina bovina
DSC	calorimetria de varredura diferencial
r_x	velocidade de crescimento residual

RESUMO

Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) [P(3HB-co-3HV)] é um biopolímero acumulado por muitos microrganismos, como reserva de carbono e energia, em condições desbalanceadas do meio. Possui propriedades termoplásticas semelhantes às dos plásticos petroquímicos e a vantagem de ser biocompatível e completamente biodegradável. Entretanto, possui custo elevado de produção frente aos plásticos convencionais, o que limita seu uso. Diversas estratégias de produção de P(3HB-co-3HV) por *Ralstonia eutropha* foram estudadas, com o objetivo de aumentar a produção de polímero, visando à redução de seus custos. A alimentação do elemento limitante, fosfato, durante a fase de produção, aumentou o acúmulo de polímero. Demonstrou-se que a melhor velocidade de produção de biomassa (r_x) a ser mantida na fase de produção é de $0,02 \text{ gXr.L}^{-1}\text{h}^{-1}$. O monitoramento do potencial redox indicou as mudanças metabólicas do microrganismo e sinalizou o momento da limitação da cultura. Esta sinalização facilita o processo produtivo, permitindo que as alimentações de fosfato e ácido propiônico sejam realizadas a partir do momento exato do início da fase de produção, sem desperdício de co-substrato. Estudou-se a utilização de suplementos nutricionais na produção de polímero, como o ácido linoleico e oleico, na concentração de $0,3 \text{ g.L}^{-1}$, os quais mostraram-se eficientes, levando a um aumento de cerca de 11% de acúmulo de polímero. Óleos vegetais que possuem esses ácidos graxos em sua composição também foram testados, na concentração equivalente a $0,3 \text{ g ácido oleico.L}^{-1}$, em frascos agitados. Os óleos de canola e oliva apresentaram os maiores aumentos de produção de polímero. Por fim, a caracterização dos polímeros produzidos em biorreator neste estudo, mostrou que suas propriedades térmicas são semelhantes às do biopolímero comercial.

Palavras-chave: polihidroxi-alcanoatos, *Ralstonia eutropha*, biopolímeros, P(3HB-co-3HV).

ABSTRACT

Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) [(P(3HB-*co*-3HV))] is a biopolymer accumulated by many microorganisms, as carbon and energy storage, under unbalanced growth. It possesses thermoplastic properties similar to the conventional plastics with advantages of biocompatibility and complete biodegradability. However, its high cost of production related to conventional plastics limits its use. Some strategies of P(3HB-*co*-3HV) production by *Ralstonia eutropha* were studied, aiming to increase polymer production, and seeking costs reduction. Phosphate feeding, during the production phase, improved the polymer storage. It was demonstrated that the best rate of biomass production (r_x), in production phase, to be maintained is $0,02 \text{ gXr.L}^{-1}\text{h}^{-1}$. Culture redox potential indicated the metabolic state changes in *R. eutropha* and precisely identified the limitation point during the culture. Further, it facilitated the production process allowing that phosphate and propionic acid feedings were realized from the beginning of the production phase, without co-substrate waste. It was studied the use of nutritional supplements, as linoleic and oleic acids, in the polymer production, in the concentration of $0,3 \text{ g.L}^{-1}$, which increased the polymer storage in about 11%. Vegetable oils, containing these fat acids, were also tested, in the equivalent concentration of $0,3 \text{ g oleic acid.L}^{-1}$, in shaken flasks. Canola and olive oils presented the best results on improving polymer production. Polymer characterization showed that thermal properties were similar to the conventional polymer.

Key words: polyhydroxyalkanoates; *Ralstonia eutropha*; biopolymer; P(3HB-*co*-3HV)

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

Os plásticos têm papel fundamental na sociedade moderna, onde são utilizados de inúmeras formas, inclusive em algumas aplicações para as quais anteriormente eram utilizados outros materiais como metais, vidro, madeira e papel. Possuem, dessa forma, um grande mercado e também representam um mercado em crescimento. Entretanto, estes materiais têm despertado grande preocupação devido à sua rápida descartabilidade, como por exemplo, na aplicação em embalagens, e à sua grande dificuldade de degradação no meio ambiente (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997).

O crescimento populacional e econômico, na maioria dos países, tem como consequência um grande aumento na produção de lixo. Só no Brasil, são despejadas diariamente 51 mil toneladas de plásticos em aterros e lixões, o que representa cerca de 19% do total de lixo gerado (SOTERO, 2000). A presença do plástico de origem petroquímica nesses aterros representa um grave problema pois, como demoram a se decompor, acabam comprometendo a circulação de gases e líquidos, dificultando a degradação de outros materiais constituintes do lixo, retardando a estabilização das áreas dos aterros (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997).

Para contornar esse problema, estão sendo estudadas alternativas como a reciclagem de produtos constituídos de plásticos e a substituição por plásticos biodegradáveis, mais compatíveis com a filosofia de preservação ambiental (SOTERO, 2000).

Os plásticos biodegradáveis, ou bioplásticos, são polímeros que se degradam completamente ao ataque microbiano em um curto espaço de tempo, sob condições apropriadas do meio ambiente. Dentre os biopolímeros em desenvolvimento estão os polihidroxicanoatos (PHA's). Além da vantagem em serem biodegradáveis, os PHA's ainda apresentam outras importantes características como serem

biocompatíveis, serem produzidos a partir de recursos renováveis como açúcares e ácidos graxos e terem propriedades termoplásticas e características físicas e mecânicas semelhantes às do polipropileno, polímero derivado do petróleo (SARTORI, 1998).

Os PHA's são polímeros acumulados por diversos microrganismos, na forma de grânulos intracelulares, que podem representar até 80% da massa seca celular (ANDERSON e DAWES, 1990). Esses microrganismos sintetizam e acumulam PHA's como reserva de carbono e energia, sob condições de excesso da fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial (DAWES e SENIOR, 1973).

Mais de 100 monômeros diferentes já foram identificados como constituintes de PHA's sintetizados por organismos naturais ou recombinantes, o que demonstra a grande diversidade de PHA's que podem ser produzidos (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997). Entre os PHA's mais estudados e produzidos industrialmente estão o polihidroxibutirato (P(3HB)) e o copolímero polihidroxibutirato-*co*-hidroxivalerato (P(3HB-*co*-3HV)), sendo que este copolímero possui propriedades mecânicas superiores às do homopolímero, sendo mais flexível, o que o torna mais atrativo para fins industriais (BYROM, 1987).

Muitos são os microrganismos produtores de PHA's, sendo que a espécie *Ralstonia eutropha* é uma das que apresenta condições favoráveis à produção industrial, destacando-se por obter alta taxa de produção de polímero (RAMSAY et al., 1990).

Os PHA's podem ser utilizados em um amplo campo de aplicações como embalagens para produtos de limpeza, higiene, cosméticos e alimentos. Também servem para produzir sacos descartáveis, vasos para mudas, brinquedos e material escolar. Além disso, por serem biocompatíveis, podem ser empregados na área médico-farmacêutica em fabricação de fios de sutura, próteses ósseas, suportes de culturas de tecidos para implantes e encapsulação de fármacos para liberação controlada (VASCONCELOS, 2002).

Apesar desta grande possibilidade de aplicações, os plásticos biodegradáveis ainda têm participação mínima no mercado internacional, em virtude de seu alto custo

em relação aos plásticos petroquímicos. A redução dos custos de produção depende da obtenção de linhagens altamente eficientes na conversão dos substratos no produto desejado, de utilização de substratos de baixo custo, do desenvolvimento de processos que permitam explorar ao máximo o potencial dessas linhagens e do desenvolvimento de processos de extração-purificação de forma a tornar os custos de recuperação do produto os menores possíveis (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997).

O **objetivo** deste trabalho é desenvolver estratégias de alimentação na fase de produção de P(3HB-co-3HV) por *Ralstonia eutropha* que possam aumentar o acúmulo de polímero, visando à redução de seus custos de produção.

Os **objetivos específicos** são:

- Estudar a influência de diferentes alimentações de fosfato durante a fase de produção, na produção do copolímero;
- Verificar a influência das alimentações de co-substrato a partir da limitação do nutriente, indicada pelo potencial redox;
- Utilizar suplementos nutricionais, como ácidos linoleico, oleico e óleos vegetais, na produção do copolímero;
- Caracterizar os polímeros produzidos.

Este trabalho é apresentado em diferentes partes. O capítulo II traz uma revisão bibliográfica sobre polihidroxicanoatos. O capítulo III trata do material e dos métodos utilizados nesse estudo. Os resultados estão apresentados, na forma de artigos, no Capítulo IV, e serão apresentados no formato das respectivas revistas e anais de congressos para os quais foram submetidos. Na seqüência, no Capítulo V estão as conclusões e sugestões. Ao final, estão incluídos alguns anexos para complementação do trabalho.

CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma revisão sobre os polihidroxicanoatos, desde sua identificação, características e propriedades, passando pelos organismos produtores e vias de biossíntese e degradação de PHA's. Além disso, também são apresentados os fatores que afetam o custo de produção, sua extração, biodegradabilidade e diversas aplicações.

2.1 DESCRIÇÃO DOS POLIHIDROXIALCANOATOS

2.1.1 Histórico dos polihidroxicanoatos

Os polihidroxicanoatos (PHA's) são estocados em forma de grânulos no interior dos microrganismos. A primeira determinação da composição de PHA's ocorreu na década de 20 por Maurice Lemoigne, que verificou que em *Bacillus megaterium* a degradação de um material desconhecido levava à excreção de ácido 3-hidroxi-butírico. Lemoigne identificou esse material como um homopolímero de hidroxiácido, 3-hidroxi-butirato ou poli-3-hidroxi-butirato [P(3HB)]. Em 1958, a via funcional de P(3HB) foi proposta por Macrae e Wilkinson, que observaram que *Bacillus megaterium* estocava o homopolímero especialmente quando a razão das fontes de glicose/nitrogênio no meio estava alta, e que a subsequente degradação ocorria rapidamente na ausência da fonte de carbono e energia. Concluíram, então, que P(3HB) era um material de reserva de carbono e energia (BRAUNEGG et al., 1998).

A partir de 1974, começaram a ser descobertos outros hidroxicanoatos (HA) além do 3-hidroxi-butirato (3HB), entre eles 3-hidroxi-valerato (3HV), 3-hidroxi-hexanoato (3HHx), 3-hidroxi-heptanoato (3HHp), 3-hidroxi-octanoato (3HO), etc. A identificação dessas outras unidades HA levou a um maior impacto nas

pesquisas e maior interesse comercial para esse polímero de reserva microbiano, pois, enquanto o homopolímero é um material rígido, com aplicações limitadas, a incorporação de outros monômeros ao P(3HB) pode melhorar significativamente as suas propriedades. Desde a sua descoberta, em torno de aproximadamente 125 diferentes HA já são conhecidos (SUDESH et al., 2000).

Em 1976, a Imperial Chemical Industries (ICI), da Inglaterra, iniciou suas pesquisas de produção de P(3HB) por fermentação bacteriana e no início dos anos 80 lançou patentes para a produção, extração e mistura de P(3HB) com outros polímeros orgânicos. A companhia também desenvolveu um processo de produção, por fermentação, do copolímero de 3HB e 3HV, a partir de substratos como glicose e ácido propiônico (BRAUNEGG et al., 1998). Em 1990, foi lançado na Alemanha, o primeiro produto obtido a partir de PHA, uma embalagem de “shampoo” de uma indústria de cosméticos (SUDESH et al., 2000).

Em 1996, a empresa Monsanto adquiriu o processo de produção do copolímero poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato (P(3HB-co-3HV)), vendido sob nome de BIOPOL, da Zeneca BioProducts, da Inglaterra, empresa essa resultante de uma divisão parcial da ICI em 1993 (BRAUNEGG et al., 1998). Entretanto, em vista do alto custo de produção e resolvendo manter seu foco em aplicação da biotecnologia para a agricultura, a Monsanto parou a produção do copolímero em 1998. Em maio de 2001, a Metabolix, Inc. comprou o processo de fabricação do BIOPOL da Monsanto, reiniciando sua produção (METABOLIX, 2001).

No Brasil, a partir de 1991, começaram as pesquisas para produção de P(3HB) por via fermentativa. Em 1998, iniciou-se a operação de uma planta piloto de produção de P(3HB) na Usina da Pedra (Serrana – SP), decorrente de uma parceria do IPT-Copersucar-ICB/USP. Em 2000, teve início a produção de P(3HB) pela então indústria brasileira PHB industrial SA. Essa é a única produção industrial de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) a partir de cana-de-açúcar, utilizando produção integrada em usina sucroalcooleira. A resina, comercialmente conhecida como Bio Cycle, está sendo produzida em escala-piloto e destinada a universidades, empresas e centros de

pesquisa e desenvolvimento. Até 2005, a empresa pretende produzir cerca de 10 mil toneladas por ano. Os custos de produção da PHB industrial são os menores do mundo. Enquanto na Europa o polímero é produzido a US\$ 15-20 / Kg, no Brasil esses custos estão entre US\$ 2,5 – 5 / Kg, porém ainda cerca de 4 a 5 vezes o custo dos polímeros convencionais (SANTOS, 2002; VIVEIROS, 2002).

Na década de 80, iniciou-se o estudo de produção de PHA's a partir de microrganismos recombinantes envolvendo a clonagem dos genes responsáveis pela biossíntese de PHA de microrganismos produtores e, nos anos 90, a produção por plantas transgênicas passou a ser estudada e vista como potencial forma de produção de PHA's para o futuro (SUDESH et al., 2000).

2.1.2 Características e propriedades

Polihidroxialcanoatos (PHA's) são poliésteres estruturalmente simples sintetizados por muitos microrganismos. São acumulados pela célula microbiana em forma de grânulos, podendo chegar até ao nível de 90% de seu peso seco, como substâncias naturais de reserva de carbono e de energia (MADISON e HUISMAN, 1999). O PHA é formado em condições de crescimento não balanceadas proporcionadas pela limitação de um nutriente, entre outros, das fontes de nitrogênio e fósforo e excesso da fonte de carbono (DAWES e SENIOR, 1973; LEE, 1996b).

2.1.2.1 Estrutura química

A estrutura química da unidade monomérica do PHA está apresentada na Figura 2.1. O tipo de radical R e o valor de n dão origem às diferentes unidades monoméricas que constituem os polímeros e co-polímeros. O radical R pode variar de um único átomo de H, até tridecil (C₁₃), podendo conter insaturações, grupos aromáticos ou ainda ligações a elementos como flúor, cloro e cromo (MADISON e HUISMAN, 1999).

$\left[\text{—O—CH—(CH}_2\text{)}_n\text{—C—} \right]_{100-3000}$ <div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 20px;"> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \\ \text{R} \end{array}$ </div> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \\ \text{O} \end{array}$ </div> </div>		
n=1	R= hidrogênio R= metil R= etil R= propil R= pentil R= nonil	Poli (3-hidroxiopropionato) Poli (3-hidroxiбутирато) Poli (3-hidroxiуalerato) Poli (3-hidroxihexanoato) Poli (3-hidroxiocetanoato) Poli (3-hidroxiodecanoato)
n=2	R= hidrogênio R= metil	Poli (4-hidroxiбутирато) Poli (4-hidroxiуalerato)
n=3	R= hidrogênio R= metil	Poli (5-hidroxiуalerato) Poli (5-hidroxihexanoato)
n=4	R= hexil	Poli (6-hidroxiodecanoato)

FIGURA 2.1 - ESTRUTURA GERAL DOS PHA'S PARA DIFERENTES MONÔMEROS
FONTE: LEE, 1996b

Os 3-hidroxiálcanoatos são os monômeros mais encontrados, porém 4, 5 e 6-hidroxiálcanoatos também têm sido incorporados (MADISON e HUISMAN, 1999).

A variação do comprimento e composição das cadeias é a base da diversidade de polímeros da família de PHA's e de seu vasto potencial de aplicação. Desde que o primeiro P(3HB) foi descoberto, em 1926, já foram detectados mais de 125 diferentes unidades monoméricas como constituintes de PHA's, em mais de 300 diferentes bactérias (LEE, 1996a; SUDESH et al., 2000).

Polihidroxiбутирато (P(3HB)) é o tipo mais comum de PHA e historicamente o que tem sido mais estudado. Copolímeros de P(3HB) podem ser formados pela adição conjunta de substratos específicos como propionato ou valerato, levando à formação de polímeros contendo, por exemplo, 3-hidroxiуalerato (3HV) ou 4-hidroxiбутирато (4HB), modificando e melhorando as propriedades do polímero produzido (MADISON e HUISMAN, 1999).

PHA's podem ser classificados em dois grupos: os polímeros constituídos de unidades monoméricas de 5 carbonos ou menos, são denominados de cadeia lateral curta – (short-side-chain) (PHA_{SSC}). Os polímeros com unidades monoméricas com

mais de 6 carbonos são os de cadeia lateral média ou cadeia lateral longa (PHA_{MSC}) (RAMSAY, 1994). Os PHA_{SSC} possuem características próximas às dos termoplásticos, enquanto que os PHA_{MSC} aproximam-se às de termofixos (TIM e STEINBÜCHEL, 1990).

2.1.2.2 Propriedades físicas

O peso molecular dos polímeros depende do microrganismo que os produzem e das condições de crescimento, mas varia normalmente de 2×10^5 a 3×10^6 Daltons (LEE, 1996a). Estudos, com vários microrganismos, mostraram que os grânulos típicos de P(3HB) têm um diâmetro de 0,2 – 0,7 μ m e são circundados por uma membrana de espessura de 2 nm composta por cerca de 2% de proteínas e 0,5% de lipídios (¹BOATMAN, 1964, citado por BRAUNEGG et al, 1998). As cadeias de polímeros geralmente formam hélices e cada grânulo contém, provavelmente, um mínimo de 1000 moléculas (ANDERSON e DAWES, 1990).

A família de PHA's possui grande variedade de propriedades mecânicas, do fortemente cristalino ao elástico, dependendo da composição das unidades monoméricas. A tabela 2.1 apresenta uma comparação das propriedades físicas entre diferentes PHA's.

P(3HB) possui resistência aos raios UV superior à do polipropileno e excelente impermeabilidade ao oxigênio (HOLMES, 1985). É completamente estereoespecífico, com todos os átomos de carbono assimétricos na configuração D(-), o que o torna altamente cristalino (55-80%), e relativamente frágil. Sua temperatura de transição vítrea é aproximadamente 5⁰C e a temperatura de fusão, conforme Tabela 2.1, aproximadamente 179⁰C (LEE, 1996a).

¹ BOATMAN, E. S. Observation on the fine structure of spheroplasts of *Rhodospirillum rubrum*. **J. Cell Biol.**, v. 20, p. 297-311, 1964.

TABELA 2.1 - COMPARAÇÃO ENTRE AS PROPRIEDADES DOS POLÍMEROS

Polímero	Temperatura de fusão (°C)	Módulo de Young (GPa)	Tensão de cisalhamento (MPa)	Resistência à ruptura (%)
P(3HB)	179	3,5	40	5
P(3HB-co-3HV)				
3 mol% 3HV	170	2,9	38	-
9 mol% 3HV	162	1,9	37	-
14 mol% 3HV	150	1,5	35	-
20 mol% 3HV	145	1,2	32	-
25 mol% 3HV	137	0,7	30	-
P(3HB-co-4HB)				
3 mol% 4HB	166	-	28	45
10 mol% 4HB	159	-	24	242
16 mol% 4HB	-	-	26	444
64 mol% 4HB	50	30	17	591
90 mol% 4HB	50	100	65	1080
P (4HB)	53	149	104	1000
P(3HHx-co-3HO)⁽¹⁾	61	-	10	300
Polipropileno	170	1,7	34,5	400
Polietileno-tereftalato	262	2,2	56	7300
Poliestireno	110	3,1	50	-

FONTE: LEE, 1996a

⁽¹⁾Poly(3-hidroxihexanoato-co-3-hidroxiocetanoato)

Ainda segundo LEE (1996a), há dois grandes problemas no uso comercial de P(3HB). Primeiro, tem baixa estabilidade na fusão, pois se decompõe a aproximadamente 200°C, que é uma temperatura muito próxima à sua temperatura de fusão. Em segundo lugar, começa a ficar quebradiço em poucos dias em estocagem sob condições ambientes. Melhoramentos têm sido feitos para diminuir a fragilidade de P(3HB) pela incorporação de monômeros 3-hidroxivalerato ou por mistura com outros polímeros.

As propriedades mecânicas do P(3HB), incluindo Módulo de Young e tensão de cisalhamento, são similares às do polipropileno (PP), porém, sua resistência à ruptura (5%) é muito menor do que a do PP (400%). O P(3HB-co-3HV) tem melhores propriedades mecânicas. O copolímero é mais flexível e tem maior resistência à ruptura conforme aumenta a fração de 3-hidroxivalerato. Além disso, o decréscimo da temperatura de fusão com o aumento da fração 3HV, sem afetar a temperatura de

degradação, permite melhor processamento térmico do copolímero, o que o torna mais atrativo para alguns usos especiais como moldagem por sopro, etc. Assim, as propriedades do P(3HB-*co*-3HV) podem ser controladas pelo ajuste da fração de 3HV durante a cultura em biorreator (LEE, 1996a). Uma porcentagem de 3HV entre 17 a 20 mol% já permite a obtenção de um copolímero com propriedades mais desejáveis, em particular, com melhor flexibilidade e resistência ao impacto (HOLMES, 1985).

Os polímeros PHA_{MSC} têm menor nível de cristalinidade e são mais elásticos, tendo aplicações potencialmente diferentes dos PHA_{SSC} (MADISON e HUISMAN, 1999).

Durante o período de estocagem em temperatura ambiente, a rigidez do P(3HB) e dos seus copolímeros tende a se desenvolver (²SCANDOLA et al., 1992 citado por SAVENKOVA et al., 2000; LEE, 1996a). SAVENKOVA et al. (2000) mantiveram P(3HB) e seu copolímero com 0 – 20 mol% de 3HV, durante 224 dias à temperatura ambiente. Relataram que os mesmos demonstraram, ao final, valores de resistência à ruptura de 5-10 vezes menores do que no início da estocagem, sendo que para o P(3HB) variou de 5,6 para 3,3 % e para o copolímero P(3HB-*co*-20mol%3HV) variou de 690 para 182% ao final. Dessa forma, mesmo após esse período, a elasticidade do copolímero continuava muitas vezes maior que a do homopolímero, mesmo havendo diferença entre os valores obtidos nas diferentes amostras, dependendo da fração de 3HV existente.

2.2 ORGANISMOS PRODUTORES DE PHA'S

Uma grande variedade de organismos é capaz de acumular PHA's, incluindo espécies Gram positivas, Gram negativas e cianobactérias (BYROM, 1987), e podem ser encontrados na natureza, ou seja, no solo, na água do mar, efluentes, etc.

² SCANDOLA, M.; CECCORULLI, G.; PIZZOLI, M.; GAZZANO, M. Study of the crystal phase and crystallization rate of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate). *Macromolecules*, v. 25, p. 1405-1410, 1992.

Apesar de existir mais de 300 diferentes microrganismos que acumulam PHA's, somente alguns podem ser utilizados para a produção industrial, entre eles *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, algumas espécies de metilotróficos e alguns outros microrganismos recombinantes como *R. eutropha* recombinante, *Escherichia coli* recombinante e *Klebsiella aerogenes* recombinante (LEE, 1996b).

A seleção do microrganismo e do substrato para a produção industrial de polímero tem uma influência crítica sobre os custos de produção (BYROM, 1987) e devem ser baseados em alguns fatores como a habilidade das células de utilizar fontes baratas de carbono e ter alta velocidade de crescimento e de síntese de polímero, além de elevada porcentagem de acúmulo de PHA, em relação à massa seca total (LEE, 1996a). Para que o processo de extração do polímero seja rentável, é necessário que a cepa seja capaz de acumular pelo menos 60% de sua massa celular em polímero. Dessa forma, se eliminam da seleção para a produção industrial, todas as bactérias Gram-positivas e aquelas que não acumulam grande quantidade do polímero (RAMSAY et al., 1990).

Os microrganismos usados para a produção de PHA's podem ser divididos em dois grupos, baseados nas condições de cultura requeridas para a síntese do polímero. O primeiro grupo de microrganismos requer a limitação de um nutriente essencial como N, P, Mg, K, O ou S para a eficiente síntese de PHA, paralelamente ao excesso da fonte de carbono. Desse grupo fazem parte *R. eutropha*, *Protomonas extorquens*, *Pseudomonas oleovorans* entre muitos outros. O segundo grupo de microrganismos não requer a limitação de nutriente para a síntese de polímero, acumulando-o durante o crescimento. Estão incluídos neste grupo, *A. latus*, *A. vinelandii* recombinante e *E. coli* recombinante (LEE, 1996b).

2.2.1 Microrganismos metilotróficos

São microrganismos que consomem metanol como fonte de carbono e o

baixo custo deste substrato tornou interessante o estudo com metilotróficas, no início dos estudos de PHA's. Entretanto, o processo de produção é lento, gera baixa quantidade de polímero com baixo peso molecular, ou seja, baixa produtividade. Alguns microrganismos pesquisados são *Methylobacterium extorquens* e *Methylobacterium organophilum*. O conteúdo de PHA tipicamente obtido por metilotróficos é de aproximadamente 50 – 60% do peso seco da célula, o que precisa ser melhorado para que se tenha uma extração mais eficiente do polímero (BYROM, 1987; LEE, 1996b).

2.2.2 Bactérias do gênero *Azotobacter*

São microrganismos capazes de sintetizar PHA a partir de glicose e sacarose, entretanto, as cepas são instáveis, produzindo polissacarídeos paralelamente ao P(3HB), diminuindo a produtividade do polímero (BYROM, 1987). A formação de alginato e P(3HB) é interrelacionada, e em *A. vinelandii*, o conteúdo formado é dependente da oxigenação, sendo que pouca aeração promove maior síntese do polímero do que de alginato. A utilização de mutantes de *A. vinelandii* pode levar à diminuição da formação do alginato e maior acúmulo de P(3HB) (MARTÍNEZ et al., 1997).

2.2.3 Bactérias do gênero *Alcaligenes*

Alcaligenes latus pode utilizar sacarose como fonte de carbono, tem uma velocidade específica de crescimento elevada e acumula PHA durante a fase de crescimento (LEE,1996a), embora, sob condições de limitação, possa acumular quantidade bem maior de polímero (WANG e LEE, 1997; CHOI e LEE, 1999b). Tem como desvantagem, a sua sensibilidade aos precursores utilizados para produção de copolímero (RAMSAY et al., 1990).

2.2.4 Bactérias do gênero *Pseudomonas*

P. oleovorans tem sido empregada para a produção de PHA_{MSC}, obtendo-se relativamente alta concentração (LEE, 1996b). Este microrganismo pode sintetizar PHA_{MSC} a partir de n-alcanos, alcanóis ou alcanosatos de cadeia médias, entretanto, melhoramentos são necessários para que a produção desses polímeros seja economicamente viável. Como *P. oleovorans* é uma cepa estável, de difícil contaminação, o cultivo contínuo pode ser boa estratégia para a produção de PHA_{MSC}, com alta produtividade (LEE, 1996a).

Apesar de *P. oleovorans* não ser capaz de utilizar glicose e outros açúcares para acumular PHA's, outras pseudomonas como *P. putida* e *P. aeruginosa* o fazem. Os PHA's, formados de gluconato e outros açúcares, têm composição diferente dos formados a partir de ácidos graxos, prevalecendo nos primeiros o 3-hidroxidecanoato e pequenas parcelas de monômeros insaturados, enquanto que nos últimos, prevalece como maior constituinte o 3-hidroxiocetanoato (HAYWOOD et al., 1990; HUIJBERTS et al., 1992; TIM e STEINBÜCHEL, 1990).

2.2.5 *Ralstonia eutropha*

Por possuir elevados rendimento e velocidade de produção, *Ralstonia eutropha* tem sido o microrganismo mais utilizado na produção industrial de polímero (RAMSAY et al., 1990). Pode acumular mais de 80% de sua massa seca celular em polímero com um alto peso molecular (BYROM, 1987), utilizando diferentes tipos de substratos como frutose, glicose e sacarose (espécies mutantes), soro de leite, etc.

Quando o ácido propiônico é adicionado ao meio, *R. eutropha* sintetiza o copolímero contendo monômeros 3HB e 3HV. A proporção de unidades 3HV depende da razão de alimentação ácido propiônico/açúcar, durante a fase de acúmulo. *R. eutropha* também é capaz de acumular polímero contendo monômeros 4HB e 5HV, dependendo do substrato utilizado (ANDERSON e DAWES, 1990).

2.2.6 Bactérias do gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* está sendo estudado para produção de PHA's. Este microrganismo foi isolado do solo e pode acumular PHA's contendo unidades 3HB e 3HB-4-ácido pentenóico (3HPE), a partir de fontes simples de carbono como sacarose ou gluconato (ANDRADE RODRIGUES et al., 2000). Uma das linhagens isoladas, a *Burkholderia sacchari*. IPT 101, apresenta boa produção do copolímero P(3HB-co-3HV), entretanto, assim como a maioria dos microrganismos produtores de PHA's, com baixa conversão de ácido propiônico em unidades 3HV (GOMEZ et al., 1997). Com o intuito de aumentar essa eficiência de conversão e utilização do ácido propiônico, SILVA et al. (2000) desenvolveram mutantes da *Burkholderia* sp. IPT 101 incapazes de crescer em ácido propiônico, porém ainda capazes de acumular unidades 3HV a partir do ácido.

Um grupo de pesquisadores brasileiros também está estudando a produção de P(3HB) por *B. sacchari*, a partir de hidrolisado de bagaço de cana, resíduo da indústria sucroalcooleira (VASCONCELOS, 2002; VIVEIROS, 2002)

2.2.7 Organismos recombinantes

O desenvolvimento de novas linhagens de microrganismos que apresentem características importantes na produção de PHA's, como alta eficiência na conversão dos substratos em produtos, utilização de substratos mais baratos, alta produtividade e conteúdo de PHA's, deve proporcionar redução dos custos de produção do polímero (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997; CHOI e LEE, 1999b).

Técnicas de DNA recombinante podem ser usadas para modificar ou introduzir novas vias metabólicas no intuito de aumentar a faixa de substratos utilizáveis, melhorar a capacidade de síntese de polímero e produzir novos PHA's (LEE, 1996b).

Apesar dos produtores naturais de PHA serem acostumados a produzi-lo durante sua evolução, eles possuem longo tempo de geração, relativamente baixa

temperatura ótima de crescimento, resistência à lise, além de poder conter vias intracelulares de degradação do PHA. Bactérias como *E.coli* não têm capacidade de sintetizar ou degradar PHA, entretanto, crescem rapidamente, a uma temperatura um pouco mais alta e sofrem fácil lise. O crescimento rápido diminui o tempo do processo de produção e a facilidade de lise das células economiza no processo de purificação dos grânulos de PHA (MADISON e HUISMAN, 1999). Alguns organismos recombinantes, utilizados na produção de PHA's, são descritos a seguir.

2.2.7.1 *Escherichia coli* recombinante

E. coli recombinante tem sido extensivamente estudada para a produção de PHA's. O acúmulo de P(3HB) nesse microrganismo pode chegar a 80-90% do peso seco da célula, com alta produtividade. Sua síntese não requer limitação de um nutriente específico, sendo dependente da quantidade de acetil-CoA disponível (LEE, 1996a).

O uso de *E. coli* na produção de PHA's apresenta algumas vantagens como: rápido crescimento com obtenção de alta densidade de células; acúmulo de grande quantidade de polímero; habilidade de utilizar fontes baratas de carbono; relativamente fácil purificação do PHA produzido e, como não é um produtor natural, a ausência de despolimerases intracelulares que degradam o PHA acumulado (LEE e CHOI, 2001). Entretanto, necessita grande demanda de oxigênio durante a alta densidade de células (LEE, 1996a). Outra desvantagem é a formação de filamentos, durante a síntese do polímero, principalmente em meio definido. A filamentação faz com que as células fiquem alongadas, causa redução na velocidade de crescimento celular e menor atividade metabólica causando, conseqüentemente, menor acúmulo de polímero (LEE et al., 1994).

A produção do copolímero P(3HB-co-3HV) por *E. coli* recombinante é considerada difícil, uma vez que o microrganismo, assim como outros produtores, não utiliza o ácido propiônico eficientemente. Entretanto, melhoramentos genéticos e

induções com suplementos nutricionais podem levar a bons resultados (LEE, 1996b; CHOI e LEE, 1999c).

2.2.7.2 *Ralstonia eutropha* recombinante

A cepa selvagem, *R. eutropha* H16, não utiliza glicose nem sacarose como fontes de carbono. A cepa utilizada na produção industrial de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) é a mutante *R. eutropha* DSM 545, com habilidade de consumir glicose (RAMSAY et al., 1990; MADISON e HUISMAN, 1999).

Outra mutante de *R. eutropha* é *R. eutropha* 290/sac, construída a partir da DSM 545, porém com capacidade para consumir sacarose (FAVA, 1997).

Para aumentar a eficiência de conversão do ácido propiônico em unidades 3HV, foram obtidas cepas mutantes incapazes de utilizar o ácido propiônico para crescimento celular. Nesse caso, estão a *R. eutropha* BK 23 (LEE et al., 1996) e o clone mutante *R. eutropha* UV1 (SARTORI, 1998), ambas derivadas de mutantes capazes de utilizar glicose como fonte de carbono.

2.2.7.3 Plantas transgênicas

A clonagem e expressão dos genes de biossíntese de PHA's de microrganismos em plantas superiores podem se constituir em uma importante forma de redução dos custos de produção de PHA's, uma vez que eliminaria a necessidade de substratos como carboidratos e ácidos orgânicos, os quais representam importante parcela dos custos de produção do polímero em processos fermentativos. A planta necessitaria apenas do CO₂ atmosférico, da energia solar e de alguns nutrientes obtidos através do solo para fazer a síntese do polímero (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997).

O primeiro estudo com plantas transgênicas ocorreu com a expressão dos genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*, no citoplasma de *Arabidopsis thaliana*, resultando em baixo conteúdo de P(3HB) e crescimento retardado da planta (POIRIER et al., 1992). Quando os genes foram expressos nos cloroplastos da planta, esta exibiu

crescimento normal e acumulou 14% de seu peso seco em P(3HB) (³NAWRATH et al., 1994 e ⁴SOMERVILLE et al., 1995 citados por STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

SUDESH et al. (2000) citam a produção de PHA_{MSC} por *A. thaliana* contendo genes de biossíntese de PHA de *P. aeruginosa*.

Outras plantas também em estudo para a produção de PHA's são *Gossypium hirsutum* e *Zea mays* (STEIBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

Algumas dificuldades que estão sendo transpostas no estudo com plantas transgênicas são: a síntese do polímero deve ocorrer em grande quantidade em órgão específico da planta, facilitando sua extração-purificação posterior; a síntese de PHA não deve ocorrer em detrimento do desenvolvimento global da planta e a obtenção de outros PHA's além do P(3HB) (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997).

2.3 DESCRIÇÃO GERAL DE *RALSTONIA EUTROPHA*

Como a produção industrial de polihidroxialcanoatos é realizada com *R. eutropha* e por ser esse um microrganismo amplamente estudado, a seguir serão apresentados a descrição geral, biossíntese e sua regulação e degradação intracelular de PHA por *R. eutropha*.

Ralstonia eutropha (anteriormente *Hydrogenomonas eutropha* e depois *Alcaligenes eutrophus*), é um microrganismo procariótico, Gram-negativo, quimiolitotrófico facultativo, encontrado naturalmente no solo e na água. Possui células na forma de bastonete com dimensões de 0,5 por 1,8 a 2,6 µm. É móvel, possuindo de 1 a 4 flagelos peritríquios. Na fase de acúmulo de polímero, as células

³ NAWRATH, C.; POIRIER, Y.; SOMERVILLE, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 91, p. 12760-12764, 1994.

⁴ SOMERVILLE, C. R.; NAWRATH, C.; POIRIER, Y. PCT Patent Application WO95/05472, 1995.

podem se tornar esféricas (MARANGONI, 2000). A Figura 2.2 apresenta a bactéria em fase de crescimento (a) e em fase de acúmulo de polímero (b).

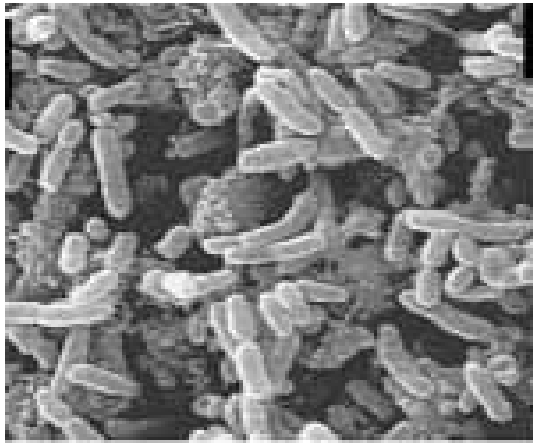


FIGURA 2.2(A): *RALSTONIA EUTROPHA* EM FASE DE CRESCIMENTO
 FONTE: AMPE, 1995

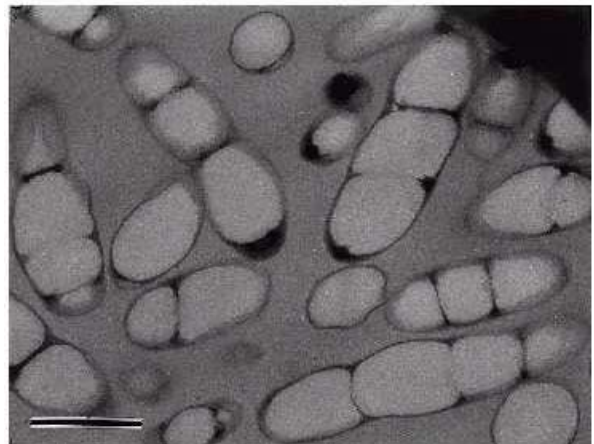


FIGURA 2.2(B): *RALSTONIA EUTROPHA* NA FASE DE PRODUÇÃO.
 FONTE: SUDESH et al., 2000
 NOTA: a barra representa 0,5 μm .

O PHA é acumulado nas células na forma de grânulos discretos, sendo que o tamanho e o número por célula podem variar dependendo da espécie. Em *R. eutropha* foram observados de 8 a 13 grânulos por célula tendo um diâmetro de 0,2 a 0,5 μm (LEE, 1996a).

Ralstonia eutropha pode utilizar vários compostos orgânicos como fonte de carbono, entre os quais, frutose, formato, acetato, propionato, lactato, gluconato, succinato, fenol, benzoato. Não pode utilizar etanol, glicerol e dissacarídeos. Sua temperatura ótima de crescimento é 30⁰C. Pode crescer autotroficamente em atmosfera de gases contendo H₂, O₂ e CO₂ (TANAKA et al., 1994). O pH na cultura de *R. eutropha* geralmente decresce devido à produção de subprodutos no ciclo de Krebs. Um pH ótimo para o crescimento e produção de P(3HB) é aproximadamente 6,9, sendo que em pH de 5,4 há inibição no crescimento (REPASKE, 1962).

Este microrganismo tem também como característica importante, do ponto de vista biotecnológico, a produção de PHA's relacionada à fonte de carbono utilizada

para seu crescimento. Isto porque a via de degradação dos carboidratos (via Entner-Doudoroff), utilizada em *R. eutropha*, leva à formação de piruvato, o qual é oxidativamente descarboxilado a acetil coenzima A (acetil-CoA). Assim, o monômero predominante encontrado em *R. eutropha* é o poli-3-hidroxi-*n*-butirato (P(3HB)), uma vez que é sintetizado a partir de acetil-CoA. Quando se utilizam ácidos propiônico ou valérico como co-substratos da glicose e/ou frutose no meio de cultura, há a formação do copolímero poli(3-hidroxi-*n*-butirato-*co*-3-hidroxi-*n*-valerato) (P(3HB-*co*-3HV)), cujas unidades (3HV) são formadas a partir de propionil-CoA, produto da degradação dos ácidos utilizados (ANDERSON e DAWES, 1990; FAVA, 1997).

2.4 METABOLISMO EM *RALSTONIA EUTROPHA*

2.4.1 Metabolismo durante crescimento balanceado

Em condições de crescimento balanceado, *Ralstonia eutropha* cataboliza carboidratos, pela via Entner-Doudoroff, a piruvato, que pode então ser convertido, através de descarboxilação, a acetil-CoA. Durante o crescimento reprodutivo, acetil-CoA entra no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) com a liberação da coenzima A (CoASH), sendo terminalmente oxidado a CO₂ gerando energia, na forma de ATP, equivalentes redutores (NADH, NADPH e FADH₂) e precursores biossintéticos (2-oxoglutarato, oxaloacetato) (BRAUNEGG et al., 1998).

A aminação ou transaminação direta do oxaloacetato leva à síntese de aminoácidos, que são incorporados nas cadeias polipeptídicas das proteínas em formação. A taxa de admissão do acetil-CoA no TCA é dependente da disponibilidade das fontes de nitrogênio, fósforo e outros elementos, além do potencial oxidativo do ambiente (BRAUNEGG et al., 1998).

2.4.2 Biossíntese de P(3HB)

Em condições balanceadas do meio, como visto anteriormente, o acetil-CoA segue pelo TCA gerando energia e material celular. Por outro lado, em condições de excesso de carbono e limitação de algum nutriente essencial, o acetil-CoA entra na via de biossíntese de P(3HB), conforme Figura 2.3.

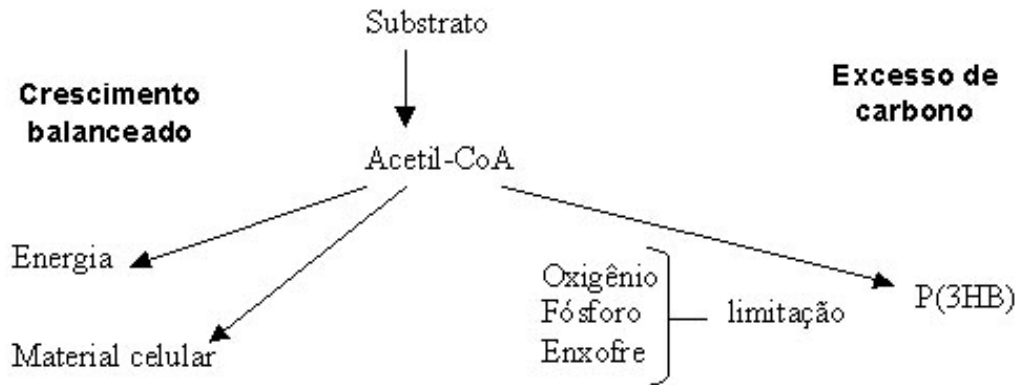
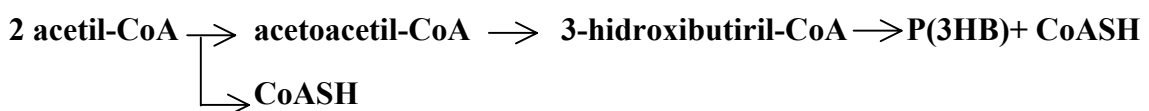


FIGURA 2.3: PRODUTOS DO ACETIL-CoA EM CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO BALANCEADO E DE EXCESSO DE CARBONO

FONTE: BYROM, 1987.

O P(3HB) é sintetizado em *R. eutropha*, e em muitos microrganismos, a partir do acetil-CoA, em condições de excesso da fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial, por uma seqüência de 3 reações catalisadas pelas enzimas β -cetotiolase, acetoacetil-CoA redutase e PHA sintase (OEDING e SCHLEGEL, 1973).

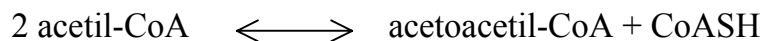
A enzima β -cetotiolase condensa, reversivelmente, 2 moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA. A enzima acetoacetil-CoA redutase, por sua vez, reduz esse substrato a R-3-hidroxi-butiril-CoA, que é incorporado à cadeia de polímero pela ação da PHA sintase.



2.4.2.1 Enzimas envolvidas na biossíntese de P(3HB)

2.4.2.1.1 β -cetotiolase

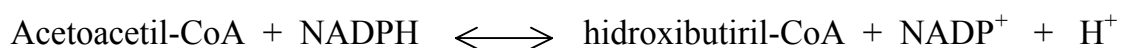
A β -cetotiolase catalisa o primeiro passo na formação do PHA. Seu mecanismo de ação envolve duas reações parciais que resultam na condensação de duas moléculas de acetil-CoA, formando acetoacetil-CoA. Dois resíduos de cisteína fazem parte do sítio ativo da enzima e são responsáveis pela ligação da primeira molécula de acetil-CoA à enzima e pela ativação de uma segunda molécula de acetil-CoA, ocorrendo então, a condensação e formação de acetoacetil-CoA (MADISON e HUISMAN, 1999):



Existem tipos diferentes de β -cetotiolase, possuindo especificidades de acordo com o substrato. A enzima denominada tipo A, é ativa somente para os substratos com C_4 e C_5 , enquanto que a denominada tipo B, é ativa para substratos de cadeia de C_4 a C_{10} . Os dois tipos de enzimas podem ser ativas na síntese de P(3HB) (HAYWOOD et al., 1988a). A existência de três β -cetotiolases em *R. eutropha* foi demonstrada no estudo de SLATER et al. (1998), codificadas pelos genes *phaA*, *bktB* e *bktC*. As enzimas codificadas pelos genes *phaA* e *bktC* atuam na formação do acetoacetil-CoA, enquanto a enzima codificada pelo gene *bktB* atua na formação de cetovaleril-CoA, ou seja, na síntese das unidades 3HV (SLATER et al., 1998).

2.4.2.1.2 Acetoacetil-CoA redutase

Esta enzima catalisa o segundo passo na biossíntese de PHA, convertendo o acetoacetil-CoA em 3-hidroxiacetil-CoA (MADISON e HUISMAN, 1999):



Dois tipos de acetoacetyl-CoA redutases, possuindo diferentes especificidades a substratos e coenzimas, foram encontradas em *R. eutropha*. A enzima NADH dependente é ativa em substratos D(-) e L(+), enquanto a NADPH dependente é estereoespecífica, ativa só com substratos de cadeia C₄ a C₆ D(-)3-hidroxiacil-CoA. Durante a síntese de P(3HB), acetoacetyl-CoA é reduzido a D(-)3-hidroxiacil-CoA, catalisado pela enzima NADPH dependente (HAYWOOD et al., 1988b).

2.4.2.1.3 PHA sintase

A enzima PHA sintase em *R. eutropha* é específica para substratos D(-), capaz de polimerizar 3-hidroxi, 4-hidroxi e 5-hidroxiacanoatos e partir de isômeros de 4 e 5 carbonos de hidroxiacil-CoA (ANDERSON e DAWES, 1990). Esta enzima é isolada sob duas formas, uma solúvel e outra associada ao grânulo. Durante o crescimento não limitado, a forma solúvel é predominante. Quando mudam as condições do meio com limitação de nutriente favorecendo a formação de PHA, há o aparecimento da forma associada ao grânulo de PHA, com concomitante rápido desaparecimento da forma solúvel (ANDERSON e DAWES, 1990).

A Figura 2.4 representa uma proposta do mecanismo de formação de grânulos de P(3HB) pela ação da enzima PHA sintase. Primeiramente, a enzima interage com as moléculas de 3-hidroxiacil-CoA no citoplasma. Durante essa fase inicial, os oligômeros HB são lentamente associados à enzima. Com o aumento do comprimento e da hidrofobicidade, o complexo enzima-oligômeros forma micelas, com as enzimas localizadas na interface, separando o PHA do citosol. A enzima então prossegue rapidamente com a síntese do polímero, unindo mais oligômeros aos grânulos, que vão se tornando maiores. Eventualmente, as micelas podem coalescer

em grandes grânulos que podem ser vistos ao microscópio (⁵GERNGROSS e MARTIN, 1995 citado por MADISON e HUISMANN, 1999).

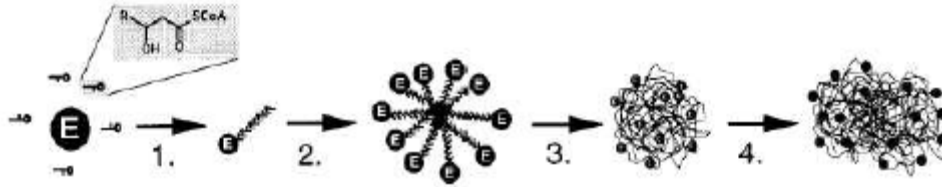


FIGURA 2.4 : REPRESENTAÇÃO DA FORMAÇÃO DE GRÂNULOS DE PHA
 FONTE: MADISON e HUISMAN (1999).

NOTA: A enzima converte monômeros-CoA em oligômeros, que ficam associados a ela (passo 1). A um certo comprimento e concentração enzima-oligômero críticos, o complexo enzima-oligômero forma micelas com as enzimas localizadas na interface, separando o PHA do citosol (passo 2). Pela hidrofobicidade do polímero, essa reação procede rapidamente. As micelas são expandidas e aparecem os grânulos intracelulares (passo 3). Como aumenta muito o número de grânulos, eles podem acoplar-se formando agregados maiores de PHA (passo 4).

2.4.2.2 Genes responsáveis pela biossíntese de P(3HB)

A determinação da seqüência de nucleotídeos dos genes responsáveis pela biossíntese de P(3HB) em *R. eutropha* revelou que as enzimas β -cetotiolase, acetoacil-CoA redutase NADPH dependente e PHA-sintase são codificadas pelos genes estruturais *phbA*, *phbB* e *phbC*, respectivamente, estando organizados em um único operon (*phbCAB*), conforme Figura 2.5. Em uma análise comparativa das seqüências deste operon, verificou-se que este difere estruturalmente dos operons de outras bactérias produtoras, embora genes equivalentes mostrem homologias significativas (FAVA, 1997).

⁵ GERNGROSS, T. U.; MARTIN, D. P. Enzyme-catalyzed synthesis of poly[(R)-(-)-3-hydroxybutyrate]: formation of macroscopic granules *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 6279-6283, 1995.

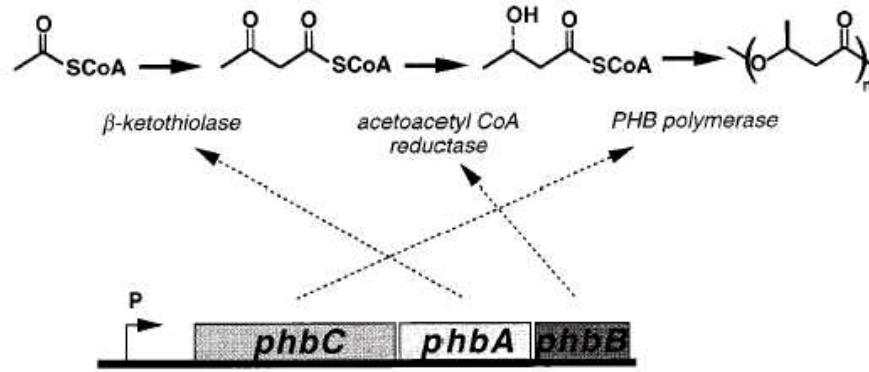


FIGURA 2.5 : GENES RESPONSÁVEIS PELA BIOSÍNTESE DE P(3HB) EM *R. EUTROPHA*.

FONTE: MADISON e HUISMANN, 1999

NOTA: P(3HB) é sintetizado pela ação sucessiva das enzimas β-cetotiolase (*phbA*), acetooacetyl-CoA redutase (*phbB*) e PHA sintase (*phbC*), que estão codificadas pelos genes do operon *phbCAB*.

2.4.3 Biossíntese de P(3HB-co-3HV)

A biossíntese do copolímero em *R. eutropha* somente ocorre quando houver substratos, chamados precursores de unidades 3HV, que possam ser convertidos em propionil-CoA, 3-cetovaleril-CoA ou 3-hidroxicetovaleril-CoA, como o ácido propiônico, valérico ou pentanóico (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSH, 1998).

Quando o ácido propiônico está presente no meio, uma β-cetotiolase condensa uma molécula de propionil-CoA com uma molécula de acetil-CoA formando 3-cetovaleril-CoA que é polimerizado após redução a monômeros de 3-hidroxicetovalerato pela PHA sintase. O acetil-CoA também pode ser formado pela descarboxilação do propionil-CoA, de forma que ambos monômeros, 3HB e 3HV, possam ser sintetizados quando o ácido propiônico é utilizado (DOI et al., 1987).

O ácido valérico também serve como precursor de unidades 3HV e é diretamente incorporado ao polímero via valeril-CoA e sua β-oxidação a 3-hidroxicetovaleril-CoA. O uso do ácido valérico leva a maior conteúdo de unidades 3HV no copolímero do que o ácido propiônico (DOI et al., 1987). A Figura 2.6 mostra as vias de síntese de P(3HB-co-3HV) a partir dos precursores de acetil-CoA e ácido propiônico ou valérico.

2.4.4 Regulação da síntese de PHA's

A síntese de P(3HB) é regulada a nível enzimático (SENIOR e DAWES, 1971a) sendo que as concentrações intracelulares de acetil-CoA e coenzima A livre, têm papel principal nessa regulação (HAYWOOD et al., 1988b). Alta concentração de acetil-CoA é necessária para a síntese do polímero, entretanto, alta concentração de CoA livre, liberada quando o acetil-CoA entra no TCA, inibe a ação da β -cetotiolase (OEDING e SCHLEGEL, 1973), inibindo dessa forma a síntese do polímero. Por outro lado, a síntese de P(3HB) é estimulada pela alta concentração intracelular da enzima NADPH e pela alta razão NADPH/NADP^+ , obtidas em condições de limitação de nutrientes (LEE et al., 1995).

A limitação nutricional para produção de P(3HB) pode ser em oxigênio, nitrogênio, fosfato, entre outros, como já visto anteriormente. A limitação em oxigênio aumenta a relação NADH/NAD^+ por não existir o acceptor final de elétrons na cadeia respiratória, levando à formação de P(3HB). Sob limitação em nitrogênio, as células não produzem mais proteínas e ocorre acúmulo de ATP. O excesso de ATP's provoca diminuição da fosforilação oxidativa, e assim, acúmulo das coenzimas reduzidas (NADH), que leva à formação de P(3HB), cuja via metabólica reoxida estas coenzimas (DAWES e SENIOR, 1973). O fosfato é um componente vital para muitas estruturas celulares como ácidos nucleicos e fosfolipídeos, além de estar envolvido em energética celular. O magnésio por sua vez, é essencial para o crescimento da célula e tem várias funções como manter a integridade dos ribossomos, participar do mecanismo de controle de permeabilidade das membranas da célula, além de ser co-fator em muitas reações enzimáticas (ASENJO et al., 1995).

A enzima citrato sintase, responsável pela entrada do acetil-CoA no ciclo do ácido tricarboxílico, é significativamente inibida pelas coenzimas NADH e NADPH, provocando um acúmulo de acetil-CoA e conseqüentemente redução da CoA, o que torna a β -cetotiolase ativa, ocorrendo a síntese do polímero. Nessas condições há um grande decréscimo do fluxo de carbono pelo TCA (ANDERSON e DAWES, 1990).

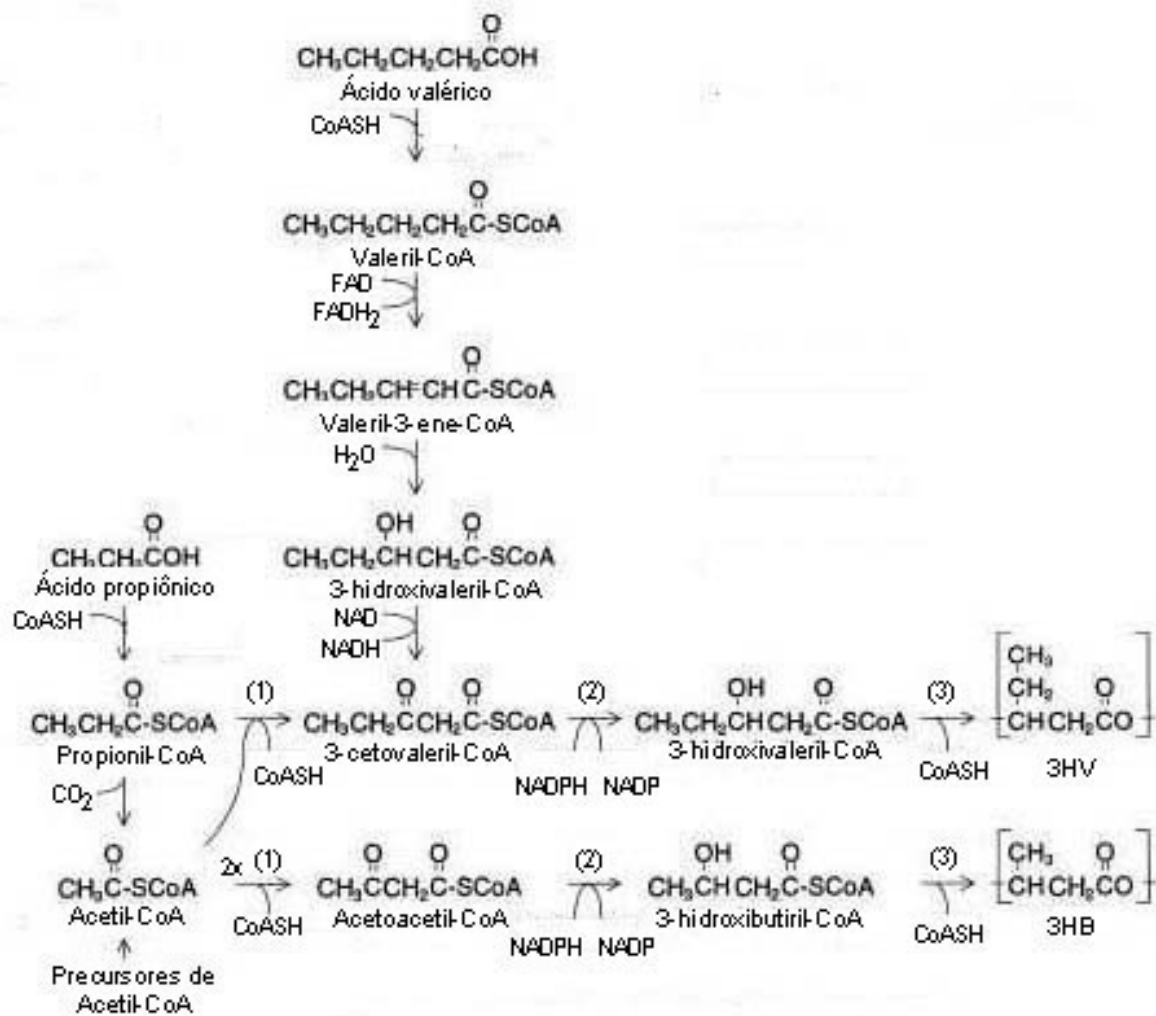


FIGURA 2.6: VIAS DE SÍNTESE DE P(3HB-co-3HV) A PARTIR DE PRECURSORES DE ACETIL-COA, E ÁCIDO PROPIÔNICO OU VALÉRICO EM *R. EUTROPHA*

FONTE: BRAUNEGG et al. (1998).

NOTA: Enzimas: 1 – β -cetotilase; 2- acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente; 3- PHA sintase.

Dessa forma, as condições necessárias para a síntese de PHA's são a elevada concentração de NADPH, baixa concentração de CoA e a elevada concentração de acetil-CoA. Foi proposto por SENIOR e DAWES (1971b) que os polihidroxicanoatos não servem apenas como reserva de carbono e energia, mas também como uma forma de diminuir o poder redutor, atuando como um regulador do poder redox da célula. Um esquema simplificado do circuito de regulação do metabolismo de P(3HB) é mostrado na Figura 2.7.

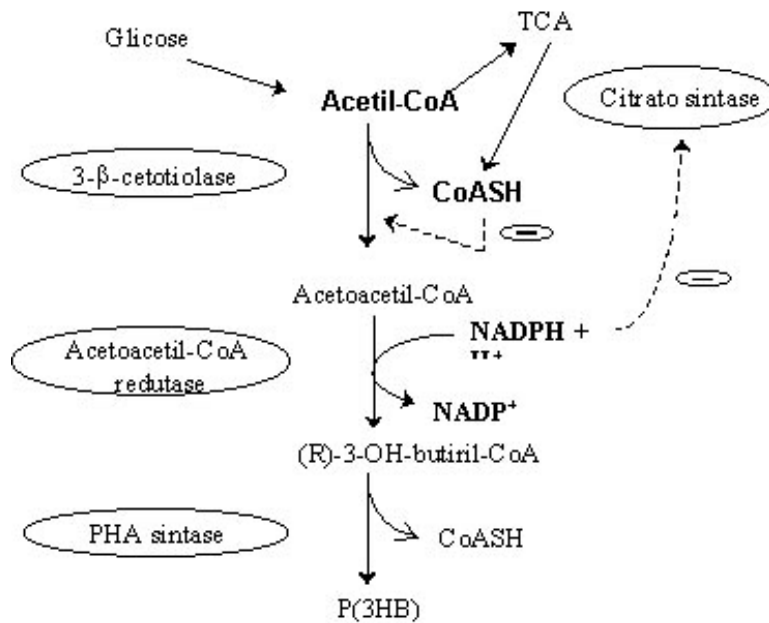


FIGURA 2.7: VIA DE SÍNTESE DE P(3HB) POR *R. EUTROPHA* E SEU CIRCUITO REGULATÓRIO

FONTE: KESSLER e WITHOLT (2001).

NOTA: Duas moléculas de acetil-CoA são acopladas para formar acetoacetil-CoA em uma reação de condensação catilizada pela enzima 3-β-cetotiolase. Essa enzima é negativamente regulada pela coenzima A (CoASH), que também é um produto quando o acetil-CoA entra no TCA sob condições não limitadas. O produto é subsequente estereoseletivamente reduzido a (R)-3-hidroxi-butilil-CoA em uma reação catalisada pela enzima acetoacetil redutase NADPH-dependente. Altas concentrações de NADPH e NADH inibem a enzima citrato sintase, responsável pela entrada do acetil-CoA no TCA, que deixa o acetil-CoA disponível para a β-cetotiolase. Finalmente, P(3HB) é sintetizado pela polimerização de moléculas de (R)-3-hidroxi-butilil-CoA pela enzima PHA sintase. As linhas pontilhadas indicam efeitos regulatórios negativos. Metabólitos e cofatores críticos estão escritos em negrito.

Um outro modelo de regulação da síntese de P(3HB) foi proposto por MADISON E HUISMAN (1999). Este modelo é baseado no fato que a reação preferencial para β-cetotiolase é a clivagem da molécula de acetoacetil-CoA, que ocorre no sentido oposto ao da síntese de P(3HB). Assim, sob condições propícias à multiplicação celular, os níveis de acetil-CoA são baixos e pouco ou nenhum P(3HB) é sintetizado. Entretanto, sob condições propícias ao acúmulo de polímero, a enzima atua na direção contrária àquela termodinamicamente mais favorável, devido ao excesso de acetil-CoA disponível. A ação da acetoacetil-CoA redutase NADPH-

dependente e da PHA sintase permite manter os níveis de acetoacetyl-CoA baixos, bem como o fluxo no sentido da síntese de P(3HB). Neste modelo, a disponibilidade de NADPH é considerada a força que dirige a síntese de P(3HB).

2.4.5 Degradação intracelular de P(3HB)

A degradação intracelular de P(3HB) é afetada pela ação seqüencial de 3 enzimas: PHA despolimerase, D(-)-3-hidroxi-butirato desidrogenase e acetoacetato succinil-CoA transferase (⁶DOI, 1990 citado por BRAUNEGG et al., 1998).

Em *R. eutropha*, inicialmente a enzima PHA despolimerase despolimeriza o polímero P(3HB) a ácido D(-)-3-hidroxi-butírico. A seguir, este produto é oxidado a acetoacetato pela enzima 3-hidroxi-butirato desidrogenase NAD⁺ específica. Por fim, a molécula de acetoacetato é convertida a acetoacetyl-CoA pela acetoacetato succinil-CoA transferase. Em condições balanceadas de cultivo, os altos níveis de NADH, bem como o acetoacetato, podem inibir a ação da enzima 3-hidroxi-butirato desidrogenase, interrompendo portanto a despolimerização do P(3HB), até que os níveis de CoASH sejam novamente reduzidos. Este processo pode ser também visualizado na Figura 2.8 (STEINBÜCHEL e SCHLEGEL, 1991; ⁷STEINBÜCHEL, 1991 citado por FAVA, 1997).

Sob condições de limitação de nitrogênio, em *R. eutropha*, ocorre o ciclo natural do metabolismo de PHA, no qual a biossíntese de PHA procede concomitantemente com sua degradação (DOI et al., 1990). Entretanto, a degradação do polímero é dez vezes mais lenta do que sua síntese (DOI et al., 1992).

Em condições de excesso de energia, o nível de NADH inibe a despolimerização de PHA e o ciclo do ácido tricarbóxico. A diminuição da

⁶ DOI, Y. **Microbial Polyesters**. VCH Publishers Inc., New York, 1990.

⁷ STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: BYROM, D. (ed) **Biomaterials**, New York: Macmillam Press, 1991. p. 123-213.

concentração de CoA permite que a β -cetotiolase possa iniciar a síntese de P(3HB). Em deficiência de energia, o ciclo move-se no outro sentido, conforme Figura 2.8, sendo que a degradação do polímero é controlada pela inibição da enzima 3-hidroxiacetil-CoA desidrogenase pelo acetoacetato e NADH (BYROM, 1987).

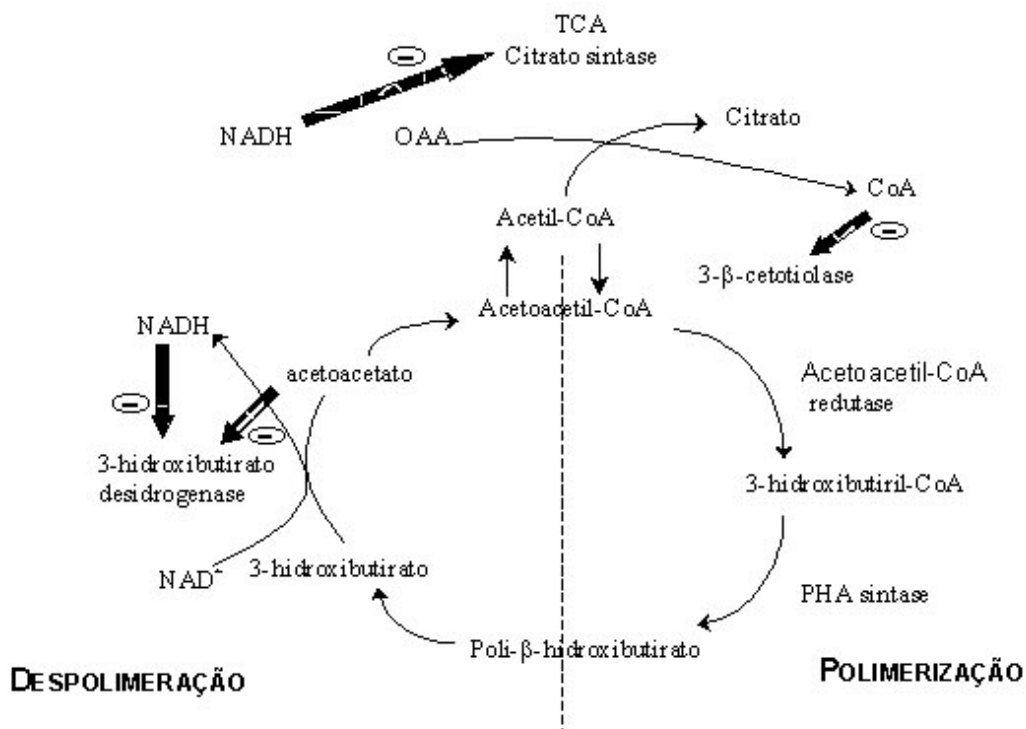


FIGURA 2.8: BIOSÍNTESE E DEGRADAÇÃO DO P(3HB)

FONTE: BYROM, 1987

NOTA: Sob condições de excesso de carbono, o nível de NADH inibe a despolimerização do P(3HB) e o ciclo do ácido tricarbólico (TCA). A resultante redução do nível de CoA livre torna a β -cetotiolase ativa catalisando a condensação de acetil-CoA a acetoacetil-CoA, e assim, o P(3HB) pode ser sintetizado. Em deficiência de energia (carbono), o ciclo move-se no sentido contrário.

2.5 BIODEGRADABILIDADE

Biodegradabilidade é a capacidade de decomposição de materiais, especialmente em produtos inócuos, pela ação de seres vivos como os

microrganismos. Bactérias e fungos são os principais participantes do processo de biodegradação na natureza. A decomposição dos materiais fornece aos microrganismos os precursores para os componentes celulares e energia. Dessa forma, a biodegradabilidade é nada mais que um processo catabólico (BRAUNEGG et al., 1998).

Uma importante característica dos PHA's, atrativa comercialmente, é sua biodegradabilidade. Sua degradação em ambiente natural é efetuada pela atividade enzimática de microrganismos (ANDERSON e DAWES, 1990). Na natureza, um grande número de microrganismos, presentes no solo, esgotos, água do mar, lagos e ar, são capazes de degradar o PHA excretando enzimas extracelulares como PHA-hidrolases e PHA-despolimerases. Estes microrganismos hidrolisam o PHA sólido em oligômeros e monômeros solúveis na água e subseqüentemente utilizam os produtos resultantes como nutrientes para a célula (MADISON e HUISMAN, 1999; SUDESH et al., 2000).

A microscopia eletrônica de amostras, parcialmente degradadas, mostrou que a hidrólise inicia na superfície do polímero, causando lesões físicas (erosões) e prosseguindo então para a parte interior (MOLITORIS et al., 1996). A degradação enzimática do polímero é uma reação heterogênea envolvendo duas etapas, adsorção e hidrólise. A primeira etapa consiste na adsorção da enzima na superfície do polímero e a segunda na hidrólise das cadeias poliméricas pelo sítio ativo das enzimas (SUDESH et al., 2000).

A velocidade de biodegradação de PHA's depende de muitos fatores, alguns relacionados ao ambiente, como temperatura, umidade, pH e suprimento de nutrientes e outros relacionados ao próprio PHA, como composição, cristalinidade, aditivos e área superficial (SUDESH et al., 2000).

A degradação microbiana de PHA's no solo é aumentada com o aumento da temperatura e o copolímero P(3HB-co-3HV) tende a se degradar mais rapidamente do que o homopolímero P(3HB). Os microrganismos presentes no solo e que degradam os PHA's compreendem bactérias Gram-negativas, bacillus Gram-positivos,

estreptomicetos e bolores (MERGAERT et al., 1993).

Os fatores mais importantes relacionados às características dos PHA's, que influenciam na sua biodegradabilidade são: (1) sua estereoespecificidade, uma vez que somente monômeros em configuração (R) são hidrolisados pelas despolimerases; (2) cristalinidade, pois a degradabilidade decresce com o aumento da cristalinidade; (3) peso molecular, sendo que os polímeros de baixo peso molecular são geralmente degradados mais rapidamente do que os com alto peso molecular e (4) composição monomérica do PHA (JENDROSSEK et al., 1996).

P(3HB) e P(3HB-co-3HV) são degradados em sistemas biológicos tanto aeróbios quanto anaeróbios, sendo que a degradação ocorre mais rapidamente em despejos anaeróbios e mais lentamente no mar. Em ambientes aeróbios, os produtos finais são dióxido de carbono, água e humus. Sob condições anaeróbias, metano também é produzido. Durante o processo de degradação, não há produção de intermediários nocivos (LUZIER, 1992).

A Tabela 2.2 apresenta a degradação de um filme de 1 mm P(3HB-co-3HV) em diferentes ambientes.

TABELA 2.2: BIODEGRADAÇÃO DE UM FILME DE 1MM DE P(3HB-co-3HV) EM DIFERENTES AMBIENTES

Ambiente	100 % em perda de massa (semanas)
Ambiente anaeróbio	6
Sedimentos estuários	40
Ambiente aeróbio	60
Solo	75
Água do mar	350

FONTE: LUZIER, 1992

A Figura 2.9 apresenta a degradação de frascos de P(3HB-co-3HV) em sistema aeróbio de água de esgoto, incubados em temperatura média de 20⁰C, por um período de até 10 semanas.

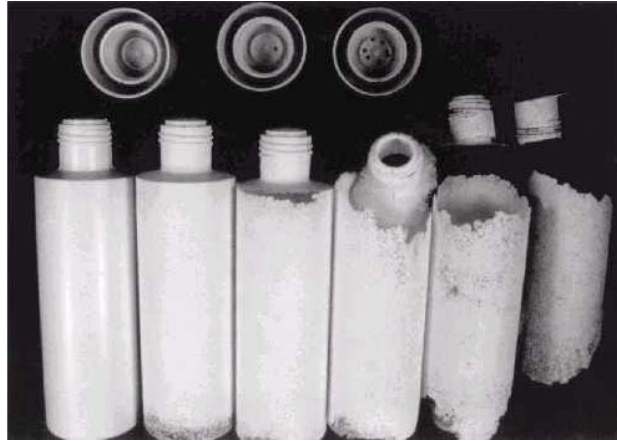


FIGURA 2.9: DEGRADAÇÃO DE FRASCOS DE P(3HB-co-3HV) EM ÁGUA DE ESGOTO

FONTE: MADISON e HUISMAN, 1999.

NOTA: Os frascos foram incubados em temperatura média de 20°C em ambiente de esgoto aeróbio. O progresso da degradação é demonstrado com os frascos que foram sujeitos a esse tratamento por 0, 2, 4, 6, 8 e 10 semanas, da esquerda para a direita.

A Figura 2.10 representa o biociclo de produção e degradação de PHA's. Através da fotossíntese, as plantas utilizam a luz solar, CO₂ e água para produzir carboidratos. Estes podem ser utilizados como substrato em bioprocessos industriais, com microrganismos específicos produzindo PHA que será purificado e processado formando os mais diversos artigos plásticos. Após seu uso, os PHA's podem ser depositados em ambientes microbianos ativos e sua biodegradação formará CO₂ e água. Uma rota direta pela produção de plantas também é possível.

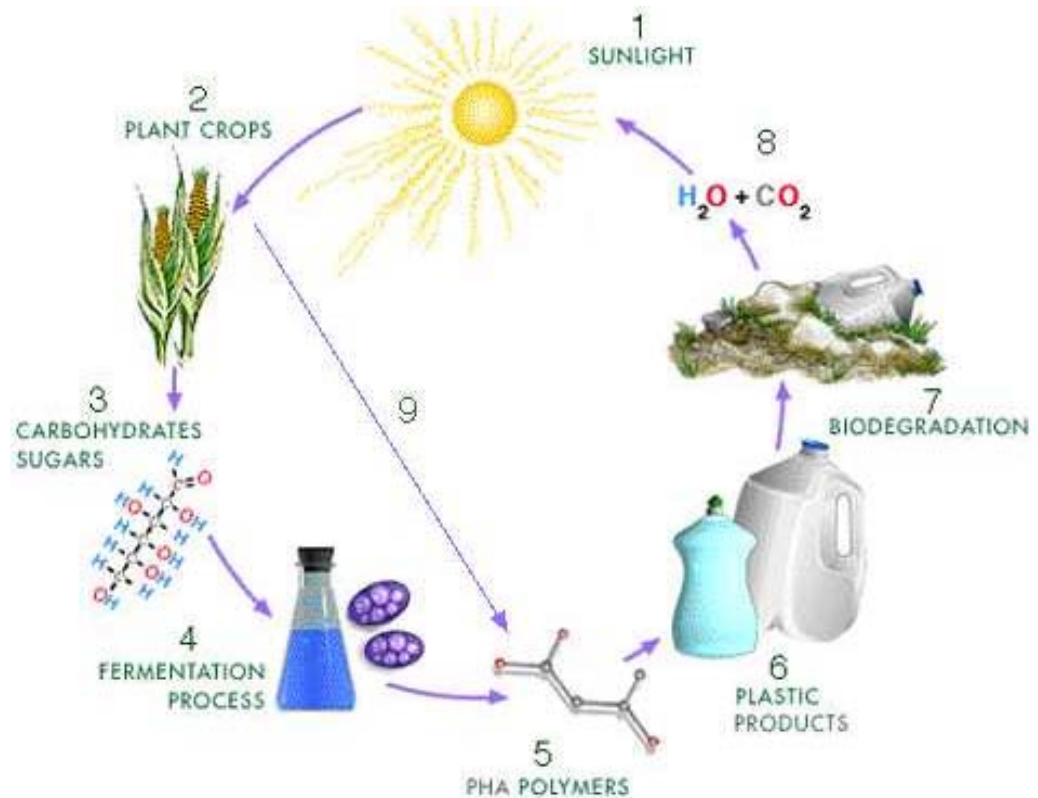


FIGURA 2.10: BIOCICLO DE POLIHIDROXIALCANOATOS
 FONTE: METABOLIX, 2001

2.6 FATORES QUE AFETAM O CUSTO DE PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS

Para que sejam aceitos em grande escala, os polihidroxialcanoatos têm que satisfazer uma série de requisitos: precisa haver demanda; estruturas funcionais de compostagem precisam ser instaladas; precisam possuir características e qualidade como os plásticos utilizados atualmente; têm que ter registro para uso em aplicações com alimentos, e, acima de tudo, precisam ser vendidos a preços adequados, competitivos (HÄNGGI, 1995).

Preço competitivo é o que o consumidor está disposto a pagar pelo produto e, geralmente, é menor ou igual ao preço do produto comparável. No caso dos PHA's, seu preço ainda é muito alto, se comparado aos plásticos convencionais e, enquanto seu custo de produção não puder ser substancialmente reduzido, ele precisa ser

vendido não em substituição aos plásticos convencionais, mas sim, como um produto novo, com novas propriedades, utilizado para alguns fins mais específicos (HÄNGGI, 1995). O consumidor, em geral, não está disposto a pagar um prêmio pela biodegradabilidade e sustentabilidade de produtos (KESSLER et al, 2001).

Dessa forma, para que os PHA's possam ser substitutos dos plásticos convencionais, é de extrema importância a redução de seus custos de produção. Muitos fatores influenciam nos custos dos bioprocessos industriais, entre eles, o rendimento de produto a partir do substrato, a produtividade, o conteúdo total de polímero acumulado, a complexidade da tecnologia empregada, o capital investido na planta de produção, a facilidade ou não do processo de separação, além da influência crítica do substrato utilizado (BYROM, 1987; CHOI e LEE, 1999b).

2.6.1 Produtividade de PHA's

A produtividade é definida como a quantidade de PHA produzida por unidade de volume em uma unidade de tempo. Para a produção de uma mesma quantidade de PHA por ano, um processo com menor produtividade requer equipamentos maiores. Então, os custos relacionados a equipamentos aumentam com o decréscimo da produtividade (CHOI e LEE, 1999b).

Na comparação de dois processos de produção de P(3HB) por *E. coli*, CHOI e LEE (1999b) exemplificam bem a influência da produtividade sobre os custos de produção. Segundo eles, quando a produtividade aumenta de 1,98 g/L.h para 3,2 g/L h, os custos de produção decrescem de US\$ 5,37 para \$ 4,91 / Kg P(3HB). Também mostram que, para a alta produtividade de 4,94 g/L.h de um processo de produção de polímero por *A. latus*, foi obtido o menor custo de produção, de US\$ 2,6 /kg P(3HB), sendo que o alto conteúdo total de P(3HB) obtido (88%) também auxiliou na obtenção do baixo custo.

2.6.2 Conteúdo de PHA's nas células

O conteúdo de PHA's acumulado afeta a eficiência do processo de recuperação e o rendimento da fonte de carbono. O rendimento e pureza do processo de recuperação são fortemente dependentes do conteúdo de PHA's. Menor quantidade de produto de digestão pode ser utilizada para separar os grânulos de PHA's de células com maior conteúdo de polímero. Por outro lado, baixo conteúdo de PHA's leva à grande quantidade de substrato desperdiçado em outros materiais celulares e/ou metabólitos (CHOI e LEE, 1999b).

Comparando uma cultura em batelada alimentada de *A. latus* com 50% de conteúdo de P(3HB) e rendimento de apenas $0,17 \text{ g}_{\text{P(3HB)}}/\text{g}_{\text{sacarose}}$, com um processo que resultou em 88% de polímero com $0,42 \text{ g}_{\text{P(3HB)}}/\text{g}_{\text{sacarose}}$ em termos de custos de recuperação, ⁸LEE e CHOI (1998) citado por CHOI e LEE (1999b), mostram que, no primeiro caso, o custo de recuperação foi de US\$ 4,8/Kg P(3HB) contra apenas US\$ 0,92/Kg P(3HB) no segundo caso.

O efeito da produtividade sobre o custo de produção é somente relacionado aos custos de equipamentos, entretanto, o conteúdo de polímero tem múltiplos efeitos sobre o volume do equipamento e sobre o processo de recuperação. Então, para se produzir PHA economicamente, é essencial se obter alto conteúdo de PHA's (CHOI e LEE, 1999b).

2.6.3 Custo do substrato e rendimento em PHA's

O custo do substrato é um fator de grande importância na determinação dos custos de produção de PHA's (YAMANE, 1993).

Pelo seu baixo custo, alguns substratos brutos como melaços de cana e

⁸ LEE, S. Y.; CHOI, J. Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate)

beterraba, soro de leite, óleos vegetais, hidrolisados de amido podem ser excelentes substratos para a produção de PHA's, porém, geralmente resultam em conteúdo de polímero e produtividade menores do que em substratos de carbono purificados. Entretanto, desenvolvimentos na área podem tornar os processos economicamente viáveis (LEE, 1996b).

Para a produção do copolímero, ainda há que se levar em conta o custo dos co-substratos precursores de 3HV, que normalmente são mais caros que a fonte principal de carbono (CHOI e LEE, 1999b). Assim, para a redução de custos é importante a definição dos substratos que possam ser utilizados como precursores e o aumento da eficiência de conversão desse substrato em unidades 3HV com o uso, por exemplo, de mutantes incapazes de utilizá-los para crescimento (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997).

2.6.4 Custos de recuperação

Vários processos de recuperação de PHA's podem ser utilizados, porém o desenvolvimento de métodos eficientes, que podem ser diferentes para cada microrganismo empregado, é importante para o custo total da produção de PHA's (CHOI e LEE, 1999b).

Os custos de recuperação com diferentes microrganismos, métodos de recuperação e frações de 3HV foram apresentados por CHOI e LEE (1999b), que comparam processos de produção de 100.000 (ton m³/ano). O processo de produção com *R. eutropha* produzindo polímero com 14,3 mol% de 3HV custaria US\$ 9,75/Kg quando a digestão envolvesse surfactante-hipoclorito. Para o mesmo processo, porém com *E. coli* recombinante e fração de 3HV de 10,6 mol%, o custo de produção seria de US\$ 5,05 /Kg PHA e de US\$ 3,95/Kg PHA se utilizado o processo de simples digestão com NaOH apresentado por CHOI e LEE (1999a).

2.7 PRODUÇÃO INDUSTRIAL

A produção industrial de PHA's tem utilizado *R. eutropha* como microrganismo produtor por sua capacidade de produzir grande quantidade de polímero com alto peso molecular (RAMSAY et al., 1990; LEE, 1996a). Dentre os principais PHA's produzidos industrialmente estão o P(3HB) e o copolímero P(3HB-co-3HV). Por apresentar vantagens como ser mais flexível e forte, o P(3HB-co-3HV) apresenta maior aplicação industrial.

BYROM (1987) descreve o processo de produção industrial de P(3HB) da ICI, hoje comprado pela Metabolix, Inc., que utiliza cultura em batelada alimentada realizada em duas etapas. Durante a primeira fase, não limitada, *R. eutropha* cresce em um meio mineral contendo glicose como única fonte de carbono e fosfato suficiente para o crescimento celular até se atingir uma determinada biomassa desejada. Quando ocorre a limitação por fosfato, inicia-se a segunda fase, na qual os microrganismos começam a produzir e estocar P(3HB). O cultivo prossegue com adições de glicose até que se obtenha a quantidade desejada de polímero. O tempo total de cultivo é de aproximadamente 110 – 120 horas com o acúmulo de mais de 75% do peso seco celular total em polímero.

O copolímero P(3HB-co-3HV) é produzido de forma semelhante, em duas fases, sendo que, a partir do início da fase de acúmulo, são adicionados glicose e ácido propiônico. P(3HB-co-3HV) com 0 – 30 mol% de unidades HV é produzido e essa fração pode ser controlada pela razão glicose/ácido propiônico adicionada. Como o ácido propiônico, em níveis acima de 0,1% no meio, é tóxico aos microrganismos e inibe a síntese de polímero, sua taxa de alimentação precisa ser bem controlada (BYROM, 1987).

Um processo diferente de produção industrial de P(3HB) foi desenvolvido em Linz, na Áustria, utilizando a bactéria *Alcaligenes latus* DSM 1124, que pode acumular mais de 80% do peso seco em polímero durante crescimento balanceado em batelada alimentada. A produção é realizada em um único estágio usando meio

mineral e sacarose como única fonte de carbono. A empresa parou a produção de P(3HB) em 1993 (LEE e CHANG, 1995; KESSLER et al, 2001).

No Brasil, a produção industrial de P(3HB) realizada pela PHB Industrial S.A, é feita com *R. eutropha* a partir de açúcar invertido como fonte de carbono e tem o desafio de aproveitar ao máximo os subprodutos das usinas de cana. Toda a energia usada na fábrica provém da queima do bagaço e basicamente são utilizados 3 kg de açúcar e 17,1 kg de bagaço de cana para obter-se 1 kg de P(3HB) (MATEOS, 2000).

A produção de PHA's em batelada é um processo simples, porém, devido à limitação pelo substrato, não se consegue obter uma densidade celular elevada o suficiente para a produção comercial do polímero nestas culturas. O regime mais utilizado para obtenção de altas densidades celulares tem sido batelada alimentada (KOYAMA e DOI, 1995). A produção em sistema contínuo poderia oferecer maior produtividade, porém somente quando a cultura puder ser mantida estável, sem contaminações (LEE e CHANG, 1995).

2.8 EXTRAÇÃO DE PHA'S

Após o cultivo, as células contendo PHA's são separadas por processos convencionais como centrifugação, filtração ou floculação-centrifugação. Em seguida, as células precisam ser rompidas para a recuperação do polímero. Há vários métodos desenvolvidos para essa recuperação, a maior parte aplicados à produção por *R. eutropha*. A maioria dos processos utiliza solventes orgânicos como clorofórmio, carbonato de propileno e dicloroetano (KESSLER et al., 2001). Pela alta viscosidade de soluções contendo PHA, é necessária grande quantidade de solvente tóxico e/ou volátil (aproximadamente 20 partes de solvente para 1 parte de polímero), o que aumenta os custos de produção e causa danos ao meio ambiente (LEE, 1996a).

Outros métodos envolvem o uso de hipoclorito de sódio para a digestão do material celular não-PHA. Entretanto, durante esta digestão há grande degradação de P(3HB), podendo resultar em 50% de redução do peso molecular. Porém, o uso de

hipoclorito de sódio, juntamente com surfactante reduz significativamente esta degradação. Normalmente, obtém-se um polímero com pureza maior que 95% a partir deste processo (LEE, 1996a). No processo de recuperação de P(3HB) utilizando uma dispersão de hipoclorito de sódio e clorofórmio, HAHN et al. (1994) obtiveram 91% de recuperação de polímero com 97% de pureza utilizando uma solução de hipoclorito de sódio 30% e um tempo de tratamento de 90 minutos.

A empresa Zeneca desenvolveu um processo de recuperação diferente, como uma alternativa à extração com solvente, para a produção industrial de P(3HB) e P(3HB-co-3HV). Nesse processo, primeiramente as células sofrem um tratamento térmico que provoca a lise das células e desnaturação de ácidos nucleicos que poderiam interferir nos passos subsequentes. Na sequência, são tratadas com uma mistura de várias enzimas hidrolíticas como lisoenzimas, fosfolipases, lecitinases, proteinases entre outras. A maior parte do material celular é hidrolisado por essas enzimas, enquanto o polímero permanece intacto. Após lavagem e floculação, o polímero é recuperado como um pó branco, que é convertido em chips para ser comercializado (BYROM, 1987; KESSLER et al., 2001). O elevado custo das enzimas e a necessidade de passos adicionais de digestão resultam em maior custo de extração por esse processo (CHOI e LEE, 1999a).

CHOI e LEE (1999a) desenvolveram um método simples de digestão alcalina para recuperar P(3HB) a partir de *E. coli* recombinante. Quando as células de *E. coli* contendo 77% de P(3HB) foram tratadas com NaOH 0,2 M a 30⁰C durante 1 hora, o P(3HB) foi recuperado com uma pureza de 98,5%. Empregando o método de digestão alcalina, o custo de produção de P(3HB) foi 25% menor que o obtido empregando o método de digestão por surfactante-hipoclorito.

2.9 APLICAÇÃO DE PHA'S

Os PHA's são considerados de grande interesse industrial, como plásticos biodegradáveis e/ou biocompatíveis, para diversas áreas de aplicação (LEE, 1996a).

Segundo ROSSEL (2001), o plástico biodegradável deve complementar o plástico petroquímico, conquistando espaços específicos onde suas características de pureza e biodegradabilidade sejam necessárias.

O primeiro produto comercial produzido a partir de PHA's (P(3HB-co-3HV)) foi uma garrafa biodegradável de xampu, de uma empresa alemã de cosméticos, lançado em 1990 (PREUSTING, 1992 citado por GOMEZ, 2000).

Assim, os polímeros P(3HB) e P(3HB-co-3HV), por suas características, foram inicialmente utilizados na manufatura de garrafas, filmes e fibras para embalagens biodegradáveis e sacos de proteção para plantas. Além dessas utilizações, filmes de PHA's podem ser aplicados em papel ou papelão formando uma película impermeável e produzir um material composto completamente biodegradável (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

Os PHA's também têm aplicação na área médica, como materiais osteossintéticos e suturas cirúrgicas. Estes biopolímeros podem ser aplicados como matriz de materiais para liberação lenta de drogas, hormônios, inseticidas e fragrâncias para as indústrias farmacêutica e de alimentos (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998). De acordo com SUDESH et al. (2000), na área médica, os PHA's contendo monômeros 4-hidroxibutirato (4HB), são os mais promissores como polímeros com valor terapêutico potencial.

Ainda na área médica, os PHA's têm sido avaliados para aplicações em engenharia de tecidos, como peças que promovem uma estrutura suporte para as células sendo implantadas. Algumas propriedades que são fundamentais para o uso de determinado material na fabricação destas peças, incluem: (1) biocompatibilidade, (2) capacidade para permitir o crescimento das células teciduais, (3) capacidade para guiar e organizar o desenvolvimento dos tecidos em uma determinada maneira, (4) difusão adequada de nutrientes e metabólitos e (5) biodegradação, quando não mais

9 PREUSTING, H. R. *Pseudomonas oleovorans* as a source of bioplastics: Production and characterization of poly(3-hydroxyalkanoates). 1992. PhD Thesis (University of Gröningen) The Netherlands.

necessário, gerando produtos não tóxicos. Resultados de avaliações preliminares destas propriedades indicam que os PHA's terão um importante papel na engenharia de tecidos e no desenvolvimento de produtos de tecidos vivos para aplicações terapêuticas. Entre as aplicações estudadas estão enxertos vasculares para substituir os auto-enxertos a partir de artérias mamárias ou da veia safena e válvulas cardíacas (WILLIAMS et al., 1999).

CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS

CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados as metodologias e equipamentos utilizados neste estudo. Constatam as descrições do microrganismo, meios e condições de cultura, métodos analíticos de determinação de biomassa, proteína, substrato e polímero, além da metodologia de extração e recuperação do mesmo.

3.1 MICRORGANISMO

A cepa utilizada neste trabalho foi *Ralstonia eutropha* DSM 545, por sua grande capacidade de acúmulo de polímero e possibilidade de crescimento em glicose como fonte de carbono (mutante espontâneo).

3.2 MEIOS DE CULTURA

A cepa de *R. eutropha* foi mantida sob refrigeração, em meio ágar nutriente (NA) composto de 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne, 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne e 1,5 % de ágar.

Como primeira pré-cultura foi utilizado meio nutriente (NB) possuindo a seguinte composição: peptona de carne, 5,0 g.L⁻¹, extrato de carne, 3,0 g.L⁻¹.

O meio mineral (MM), foi utilizado como segunda pré-cultura e como meio final. Este meio foi baseado em ARAGÃO (1996) e sua composição, sem limitação, utilizada na primeira pré-cultura, está apresentada na Tabela 3.1.

Para a realização das culturas em biorreator, utilizou-se o mesmo meio abaixo (Tab. 3.1), porém limitado em fósforo, com concentração final de fosfato no meio de 0,85 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄.12H₂O e 0,15 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, suficiente para obtenção de 10 g.L⁻¹ de biomassa no momento da limitação, baseado em um fator de

conversão de fósforo em biomassa ($Y_{P/X}$) de 100 g.g^{-1} (ARAGÃO, 1996).

Para os ensaios realizados em frascos agitados, o meio utilizado nas culturas foi o mesmo abaixo (Tab. 3.1), porém limitado em nitrogênio, com concentração final de nitrogênio no meio de $2,3 \text{ g.L}^{-1}$, suficiente para obtenção de 5 g.L^{-1} de biomassa no momento da limitação, baseado em um fator de conversão de nitrogênio em biomassa ($Y_{N/X}$) de $7,3 \text{ g.g}^{-1}$ (ARAGÃO, 1996).

TABELA 3.1: COMPOSIÇÃO DO MEIO MM

		Solução Conc. (g.L⁻¹)^a	Volume adic. (ml.L⁻¹ de meio)	Conc. no meio (g.L⁻¹)
SOLUÇÃO 1	Ácido nitrilotriacético	19,1	10	0,19
	Citrato ferroso de amônia	10	6	0,06
	MgSO ₄ .7H ₂ O	50	10	0,5
	CaCl ₂ .2H ₂ O	5	2	0,01
	(NH ₄) ₂ SO ₄	200	25	5
	Solução de oligo-elementos ^b		1	(1ml.L ⁻¹)
	Água			
SOLUÇÃO 2	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	223,8	40	8,95
	KH ₂ PO ₄	37,5	40	1,5
SOLUÇÃO 3	Glicose/Frutose (1:1 v/v)			30

^a concentrações das soluções estoque

^b a composição da solução concentrada de oligo-elementos é dada na Tabela 3.2

TABELA 3.2: COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO CONCENTRADA DE OLIGO-ELEMENTOS.

Elemento	Concentração (g.L⁻¹)
H₃BO₃	0,3 g.L ⁻¹
CoCl₂.6H₂O	0,2 g.L ⁻¹
ZnSO₄.7H₂O	0,1 g.L ⁻¹
MnCl₂.4H₂O	0,03 g.L ⁻¹
Na₂MoO₄.2H₂O	0,03 g.L ⁻¹
NiCl₂.6H₂O	0,02 g.L ⁻¹
CuSO₄.5H₂O	0,01 g.L ⁻¹

O pH da solução 1 foi ajustado a 7,0 com KOH 5M e HCl 1M. As soluções 1, 2 e 3 foram autoclavadas separadamente durante 20 minutos a 120⁰C e adicionadas assepticamente para compor o meio final.

3.3 CONDIÇÕES DE CULTURA

3.3.1 Pré-culturas

Foram realizadas duas pré-culturas. A primeira em frasco erlenmeyer aletado de 500 mL contendo 150 mL de meio NB, inoculado com três alçadas da cepa mantida em meio ágar. Esta pré-cultura foi incubada em shaker a 30⁰C e 150 rpm por 24 h. Após esse período, iniciou-se a segunda pré-cultura em frasco aletado de 1000 mL contendo 300 mL de meio MM não limitado, que recebeu uma quantidade correspondente a 10% de seu volume final de inóculo proveniente do meio NB. Da mesma forma este meio foi incubado em shaker a 30⁰C e 150 rpm por 24 h.

3.3.2 Culturas em frascos agitados

Alguns estudos foram realizados em frascos agitados. Nestes casos, as culturas foram desenvolvidas em frascos erlenmeyer aletados de 1000 mL, contendo 300 mL de meio MM limitado, inoculados com a segunda pré-cultura (MM) na quantidade de 10% de seu volume final. Os frascos foram incubados a 30⁰C sob agitação de 150 rpm durante o tempo necessário para cada experimento.

No início da fase de produção, foram adicionados, na forma de pulsos, propionato de potássio e diferentes ácidos graxos e óleos vegetais, de acordo com o estudo pretendido.

3.3.3 Culturas em Biorreator

As culturas foram realizadas em biorreator de 6 L (BIOFLO III, New Brunswick Scientific CO), utilizando-se o volume útil de 4 L. O biorreator, contendo a solução 1 do meio MM (Tab. 3.1), foi autoclavado durante 20 minutos a 120^oC. No início da cultura, adicionou-se a solução de açúcar com concentração de 500 g.L⁻¹ para compor o meio inicial com 30 g.L⁻¹ de açúcar, e a solução de fosfato para o meio limitado. O inóculo, proveniente da segunda pré-cultura (MM), foi adicionado na quantidade de 10% do volume final de meio no biorreator.

Durante a cultura a temperatura foi mantida em 30^oC e o pH ajustado a 7,0 com soluções de NH₄OH 5% ou HCl 1M. Como antiespumante foi utilizado polipropilenoglicol Mn. ca. 2000 (Sigma-Aldrich).

As condições iniciais de agitação e aeração foram de 400 rpm e 0,12 vvm respectivamente, e aumentaram gradualmente até 780 rpm e 1 vvm.

Durante algumas culturas houve o acompanhamento do potencial redox (Eh) do meio, através de um eletrodo de platina (Analion – Brasil).

A Figura 3.1 ilustra os equipamentos utilizados nos experimentos.



FIGURA 3.1: EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NO ESTUDO (BIORREATOR, CROMATÓGRAFO, ETC)

3.3.3.1 Estratégias de alimentação

As estratégias de alimentação aqui descritas foram realizadas a partir do início da fase de produção de P(3HB-co-3HV), que foi caracterizada a partir da análise de fosfato, conforme será descrito no item 3.4.5, ou a partir da sinalização do potencial redox, conforme item 4.2.

3.3.3.1.1 Alimentação em Fosfato

Uma solução de fosfato, com concentração variando de acordo com o estudo, foi adicionada de forma contínua na vazão de 37 mL.h⁻¹. Cada concentração proporcionou uma diferente velocidade de crescimento residual r_x que foi mantida na fase de produção, de acordo com o fator de conversão de fósforo em biomassa de 100 g.g⁻¹ (ARAGÃO, 1996). Os valores correspondentes de r_x e concentração das soluções de fosfato utilizadas nos estudos estão apresentadas na Tab 3.3.

TABELA 3.3: CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES DE FOSFATO E r_x CORRESPONDENTE

r_x (gXr.L ⁻¹ h ⁻¹)	0,02	0,04	0,07*	0,13*	0,2*
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (g.L ⁻¹)	0,211	0,422	0,87	1,84	2,61
KH ₂ PO ₄	0,0137	0,0274	0,15	0,3	0,44

* realizadas por MARANGONI (2000)

3.3.3.1.2 Alimentação em Açúcar

O açúcar foi alimentado sempre que sua concentração decresceu a aproximadamente 10 g.L⁻¹. Este valor foi monitorado, durante a cultura, através do método de DNS, como descrito no item 3.4.3. A alimentação foi realizada a partir de uma solução de concentração 500 g.L⁻¹ de forma a proporcionar uma concentração final de 30 g.L⁻¹ de açúcar no meio.

3.3.3.1.3 Alimentação em ácido propiônico

A alimentação de ácido propiônico foi realizada de forma contínua a uma vazão de 20 mL.h^{-1} , a partir de uma solução 80 g.L^{-1} deste ácido.

3.3.3.1.4 Alimentação em ácidos graxos

Os ácidos graxos oleico e linoleico/oleico (2:1 v/v - Sigma Aldrich). foram adicionados na forma de pulsos, a fim se obter uma concentração de $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ no meio.

3.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.4.1 Amostragem

Nos ensaios em biorreator, amostras de 20 mL foram retiradas em intervalos de 2 horas até a oitava hora, seguidas de tomadas de amostras a cada 1,5 h até o fim da cultura. O volume de amostra retirado foi de 2 mL para leitura em espectrofotômetro, de 10 mL para determinação da concentração celular por gravimetria e o restante foi centrifugado em tubos eppendorf de 2 mL cada, sendo que o sobrenante foi guardado para posteriores análises de substrato e fosfato, o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e, após a última centrifugação, foi congelado para posterior análise de proteína e polímero.

A amostragem, nos ensaios em frascos agitados, foi realizada em menores proporções, devido ao menor volume de amostra disponível. Neste caso, somente foram retiradas amostras de 2 mL para leitura em espectrofotômetro e pH, 2 mL para determinação de substrato e polímero e no último ponto 5 mL para determinação da concentração celular por gravimetria. Dependendo do tempo de duração de cada experimento, definiu-se a periodicidade de retirada de amostras.

3.4.2 Determinação da concentração de biomassa

3.4.2.1 Medida por espectrometria

A concentração de biomassa das amostras coletadas foi avaliada em um espectrofotômetro (modelo GENESYS 10 Vis, marca Spectronic Unicam, USA) medindo-se a absorvância a 600 nm. Para manter uma precisão adequada (região linear), a faixa de absorvância utilizada foi entre 0,0 e 0,8. A partir deste valor, foram feitas diluições para manter a linearidade.

3.4.1.2 Medida por gravimetria

A concentração celular por gravimetria foi obtida a partir de um volume conhecido de cultura, compreendido entre 3-10 mL, filtrado através de membranas de poliamida (poro de 0,2 μ m) pré-secas e pesadas. O filtrado foi lavado duas vezes com HCl 0,01 M para remoção de íons e sais presentes na biomassa, seguido de secagem em estufa a 90⁰C por 24 h. A existência de uma relação linear entre a biomassa e a absorvância a 600 nm, na fase de acúmulo celular, permitiu obter uma curva padrão de biomassa em função da absorvância que serviu para estimar a concentração de células durante a cultura (Anexo I - Figura A1).

3.4.3 Dosagem de açúcares

A dosagem de glicose e frutose foi determinada pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), que determina a concentração de açúcares redutores. O reativo foi preparado da seguinte forma:

- 300 g de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e 16 g de NaOH foram dissolvidos em água destilada;
- 10 g de ácido dinitrosalicílico foram adicionados muito lentamente;
- O volume foi completado para 1 L com água destilada.

Um volume de 400 μL de sobrenadante, previamente diluído, foi adicionado a 400 μL de reativo DNS e depois colocado em ebulição durante 5 minutos, em banho-maria. Após esse período, fez-se o resfriamento em banho de gelo e adicionaram-se 4 mL de água destilada. Após 15 minutos em repouso para estabilização da temperatura foi realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm contra um branco de água destilada que passou pela mesma reação. A curva padrão expressa a concentração de glicose (g.L^{-1}) versus absorvância em uma escala compreendida entre 0 e 3 g.L^{-1} de glicose. Um exemplo de curva padrão é apresentada no Anexo I - Figura A2.

3.4.4 Dosagem de Proteínas

Amostras de 2 mL do meio de cultura foram centrifugadas a 3.900 rpm por 15 minutos e o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e congelado para posterior análise pelo método de Biureto (STICKLAND, 1951). O precipitado foi ressuspenso em 5,5 mL de água destilada e a lise celular provocada por adição de 1mL de NaOH 20% (p/v) e incubação em banho-maria a 100°C durante 5 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 170 μL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 25% (p/v), agitados e deixados em repouso por 5 minutos. O sobrenadante obtido, após centrifugação a 5000 rpm durante 10 minutos, foi analisado por espectrofotometria em um comprimento de onda de 560 nm. A concentração em g.L^{-1} foi obtida através de uma curva padrão de proteína (g.L^{-1}) vs absorvância (560nm), utilizando albumina bovina (BSA) entre 0 e 3 g.L^{-1} como padrão conforme ilustrado no Anexo I - Figura A3.

3.4.5 Dosagem de Fosfato

Para a dosagem do fosfato foi utilizado um kit colorimétrico (Dolles Reagentes - Brasil). Os reagentes utilizados foram os seguintes:

Solução Padrão: solução aquosa contendo 5 mg.dL^{-1} de fósforo;

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

Reagente Molibdato: solução 0,018 M de molibdato de amônio em H₂SO₄ 1,5 M.

Solução alcalina: solução 16 M de monoetanolamina.

Foram identificados 3 tubos de ensaio com B (branco), T (teste) e P (padrão) e procedeu-se conforme a seqüência apresentada na Tabela 3.4.

TABELA 3.4: SEQÜÊNCIA PARA A DOSAGEM DE FOSFATO

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

Agitou-se e deixou-se repousar por 2 minutos. As absorbâncias de teste e padrão, foram lidas, ajustando-se o zero com o branco, em espectrofotômetro a 660nm.

A concentração de fosfato foi calculada em g.L⁻¹ de acordo com a equação 3.1, onde abs é a absorbância lida.

$$\boxed{\text{fosfato} = \frac{\text{abs teste}}{\text{abs padrão}} \times 0,05 \text{ (g.L}^{-1}\text{)}} \quad (\text{Eq.3.1})$$

3.4.6 Dosagem de P(3HB-co-3HV)

O P(3HB-co-3HV) foi dosado por cromatografia gasosa, conforme o método de metanólise baseado em BRAUNEGG et al. (1978), com as modificações propostas por BRANDL et al.(1988).

As amostras, com volume conhecido de meio de cultura, foram centrifugadas a 3.900 rpm por 15 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e congelado para posterior análise. Após descongelamento, o precipitado foi ressuspenso em um volume de 2 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol acidificado (H₂SO₄ 15%),

contendo ácido benzóico $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ como padrão interno, e a mistura foi então aquecida a 100°C durante 140 minutos. Depois de 1 hora de aquecimento, a mistura foi agitada durante alguns segundos e devolvida ao aquecimento. Após resfriamento à temperatura ambiente, adicionou-se 1mL de água destilada e as amostras foram agitadas durante 30 segundos, seguido de decantação. A fase orgânica (inferior) foi retirada com uma seringa e armazenada sob refrigeração para posterior análise em cromatografia gasosa. A curva padrão (Anexo I - Figura A4) foi feita utilizando-se o poli-3-hidroxi-*butirato-co-3-hidroxi-*valerato** (Sigma) com um teor definido de 12% de 3HV, como padrão externo, com massa variando entre 0,0010 g e 0,050 g. Os padrões foram submetidos à mesma metanólise que as amostras. A coluna utilizada para dosagem do P(3HB-*co*-3HV) foi de sílica fundida ($\varnothing 0,53\text{mm} \times 30\text{m}$) modelo Supercowax-10. O cromatógrafo foi um CG-90 equipado com um detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio). O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a 20 mL/min e as temperaturas de injeção, detecção e coluna foram respectivamente de 185°C , 230°C e 110°C . O volume injetado foi de $2 \mu\text{L}$. A integração e os cromatogramas foram obtidos através de uma placa interface AD/DA-MICROQUÍMICA.

3.5 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE P(3HB-*co*-3HV)

3.5.1 Extração de P(3HB-*co*-3HV)

A técnica utilizada para a recuperação intracelular de P(3HB-*co*-3HV) foi baseada em HAHN et al (1994). Primeiramente, as células foram separadas do caldo de cultivo por floculação. O pH do meio foi ajustado a 9,0 com NH_4OH 5%, o meio foi aquecido a 60°C e o pH novamente ajustado a 4,0 com HCl 1M. Seguiu-se uma centrifugação a 3.600 rpm durante 20 minutos. O precipitado foi congelado para posterior recuperação do polímero. Esta recuperação foi efetuada através das seguintes

etapas:

- 8 g de células foram ressuspensas em uma dispersão de 100 mL de clorofórmio e 100 mL de uma solução de hipoclorito de sódio 30% (esta solução pura contém 5,68 g de cloro ativo, 7,8 g de NaOH e 32 g de Na₂CO₃ por 100 mL);
- a mistura foi mantida a 30^oC por 90 minutos;
- centrifugação a 3990 rpm por 25 minutos;

Ao final foram obtidas 3 fases distintas, a saber:

- Fase superior: solução de hipoclorito
- Fase intermediária: células e outros materiais que não o polímero;
- Fase inferior: clorofórmio com P(3HB-*co*-3HV).

Na seqüência, a parte superior foi removida com uma pipeta e a parte inferior foi então separada por filtração. O P(3HB-*co*-3HV) foi obtido através de precipitação com não-solvente na razão 1:1 (clorofórmio:não-solvente). O não-solvente utilizado foi uma mistura de metanol e água (7:3 v/v). Após evaporação obteve-se o polímero.

3.5.2 Caracterização de P(3HB-*co*-3HV)

Para a análise térmica do polímero foi utilizada a técnica de Calorimetria de varredura diferencial (DSC).

As medidas por DSC foram feitas no equipamento TA Instruments, modelo 2920. As amostras foram seladas em recipientes de alumínio, aquecidas de 25 a 190 °C a 10 °C min⁻¹ e mantidas nesta temperatura por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas a -25 °C numa taxa de 30 °C min⁻¹. Após 5 minutos a -25 °C as amostras foram submetidas a um segundo aquecimento até 190°C, com taxa de 5°C.min⁻¹. A amplitude e o período de oscilação utilizados foram 0,5 °C e 60 s, respectivamente.

As análises foram realizadas no Laboratório de Biomateriais da Pontifícia Universidade Católica - PUC-SP, Sorocaba, Brasil.

3.6 TRATAMENTO DE DADOS

3.6.1 Ajuste dos dados experimentais

Os dados experimentais obtidos foram ajustados pelo programa Lissage, desenvolvido pelo laboratório do “Institut National des Sciences Appliquees de Toulouse” França, por Ardaillon-Simoes, Arroyo, Uribebarrea.

3.6.2 Análise Cinética

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

3.6.2.1 Velocidades específicas de crescimento

As velocidades específicas máximas de crescimento na fase de crescimento não limitado foram calculadas a partir do coeficiente angular da curva linearizada pelo logaritmo neperiano da biomassa residual com o tempo de acordo com a equação 3.2.

$$\ln(X_r) = \ln(X_{r_0}) + \mu \cdot t \quad (\text{Eq. 3.2})$$

Onde:

X_r = biomassa residual (g)

X_{r_0} = biomassa residual inicial (g)

μ = velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})

t = tempo (h)

3.6.2.2 Velocidade específica de produção de P(3HB-co-3HV)

As velocidades específicas de produção de P(3HB-co-3HV), ou de 3-hidroxicaprolato foram calculadas através da relação entre a derivada das curvas ajustadas de produção de polímero dividido pela biomassa residual no programa Lissage.

3.6.3 Produtividade média de P(3HB-co-3HV)

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

$$P_r = \frac{P(3HB-co-3HV)t - P(3HB-co-3HV)t_0}{t - t_0} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

Onde:

P_r = produtividade média de P(3HB-co-3HV) ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

$P(3HB-co-3HV)t$ = quantidade de P(3HB-co-3HV) no instante de tempo t (g).

$P(3HB-co-3HV)t_0$ = quantidade de P(3HB-co-3HV) no tempo t_0 inicial (g).

3.6.4 Produtividade de P(3HB-co-3HV) na fase de produção

A produtividade na fase de produção, (equação 3.4), foi calculada pela diferença entre a quantidade de P(3HB-co-3HV) em um instante de tempo t após o início da fase de produção e a quantidade de P(3HB-co-3HV) no início da fase de produção, dividida pelo intervalo de tempo correspondente a estas concentrações.

$$P_p = \frac{P(3HB-co-3HV)t - P(3HB-co-3HV)t_i}{t - t_i} \quad \text{Eq. 3.4}$$

Onde:

P_p = produtividade na fase de produção ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

$P(3HB-co-3HV)_t$ = quantidade de P(3HB-co-3HV) no instante de tempo t após o início da fase de produção (g).

$P(3HB-co-3HV)_{t_i}$ = quantidade de P(3HB-co-3HV) no tempo t_i inicial da fase de produção (g).

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTRATÉGIA DE ALIMENTAÇÃO DE FOSFATO DURANTE A FASE DE PRODUÇÃO DE P(3HB-co-3HV)

O processo de produção de polímero por *R. eutropha* ocorre em duas fases, sendo uma primeira fase de crescimento exponencial, visando a formação de biomassa, seguida da fase limitada em algum nutriente essencial na qual toma lugar a produção de polímero (DAWES e SENIOR, 1973). Os elementos limitantes mais estudados e utilizados têm sido o nitrogênio e o fósforo. Entre eles, o fósforo oferece algumas vantagens e sua utilização tem apresentado melhores resultados em produtividade e produção de polímero em vários estudos (ARAGÃO, 1996; RYU et al. 1997; PINTO, 1999). Uma explicação assumida por alguns pesquisadores para esse fato, é de que como o fósforo não participa diretamente da síntese de proteínas, a carência e a limitação deste nutriente pode permitir um certo crescimento residual mínimo durante a produção de polímero, o que aumentaria sua produção (ARAGÃO, 1996; PINTO, 1999).

A alimentação de pequena quantidade do elemento limitante durante a fase de produção também tem sido proposta como uma estratégia que permite crescimento residual aumentando a produção de polímero (SUZUKI et al., 1986; BITAR e UNDERHILL, 1990; ARAGÃO et al., 1996; PINTO, 1999; MARANGONI, 2000). Entretanto, a melhor velocidade de crescimento residual a ser mantida ainda não foi estabelecida.

Dessa forma, o objetivo desta etapa foi verificar a influência da estratégia de

alimentação de fosfato e determinar a melhor velocidade de produção de biomassa (r_x) a ser mantida durante a fase de produção de P(3HB-*co*-3HV) por *R. eutropha*. Foram pesquisadas as seguintes velocidades de crescimento residual: 0; 0,02; 0,04; 0,07; 0,13 e 0,2 gXr.L⁻¹h⁻¹, das quais as três últimas foram anteriormente realizadas por MARANGONI (2000). Os resultados estão apresentados no artigo a seguir, traduzido para o português, intitulado "Phosphate feeding strategy during the production phase improves poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) storage by *Ralstonia eutropha*", que foi publicado no periódico **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 257-260, 2003. O artigo está apresentado na forma da publicação no Anexo IV.

Estratégia de alimentação de fosfato durante a fase de produção aumenta o acúmulo de poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por *Ralstonia eutropha*

C.R. SQUIO

C. MARANGONI

C.S. DE VECCHI

G.M.F. ARAGÃO (✉)

Universidade Federal de Santa Catarina,

Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Centro Tecnológico

C.P. 476, 88040-900 – Florianópolis, Brasil

glaucia@enq.ufsc.br

Tel.: +55 – 48 - 3319842

Fax: +55 – 48 – 3319687

Resumo: O efeito da estratégia de alimentação de fosfato e a ótima velocidade de produção de biomassa (r_x) durante a fase de produção de P(3HB-co-3HV), em um fermentador de 6 L, foi determinado em culturas de *Ralstonia eutropha* com o objetivo de aumentar a produtividade de polímero. velocidades de produção de biomassa (r_x) entre 0,00 e 0,20 gXr l⁻¹ h⁻¹ foram monitoradas durante a fase de produção. Quando uma baixa velocidade de crescimento celular foi mantida (r_x de 0,02 gXr l⁻¹ h⁻¹), houve um aumento da produção de polímero, resultando em massa celular, massa de P(3HB-co-3HV) e conteúdo final de P(3HB-co-3HV) de 98,2 g, 44,5 g e 45,3 %, respectivamente, após 27,3 h. A máxima produtividade de polímero obtida durante a fase de produção foi 0,98 g l⁻¹ h⁻¹.

Palavras-chave: biopolímero; polihidroxi-alcanoatos; Ralstonia eutropha

Introdução

Polihidroxicanoatos (PHAs) são materiais de reserva de carbono e energia que são acumulados como grânulos intracelulares em uma grande variedade de microrganismos durante crescimento desbalanceado (Anderson and Dawes 1990). Os PHAs têm recebido muita atenção em função de sua similaridade com os plásticos convencionais e sua completa biodegradabilidade (Lee 1996). O polímero mais estudado desta classe é o polihidroxibutirato (P(3HB)), entretanto o copolímero poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) [P(3-HB-*co*-3HV)] possui propriedades termoplásticas potencialmente mais aplicáveis (Byrom 1987).

Ralstonia eutropha é uma bactéria produtora de PHA usada para produção industrial devido ao seu rápido crescimento, alta produtividade, e habilidade de crescimento a partir de fontes renováveis de carbono (Byrom 1987; Marangoni et al. 2002). P(3HB-*co*-3HV) é sintetizado por *R. eutropha* quando alimentada com fonte de carbono e co-substratos como o ácido propiônico (Byrom 1987).

A produção de polímero por *R. eutropha* é realizada em duas fases: (1) crescimento celular não limitado em nutrientes, visando a geração de biomassa; (2) limitação de nutriente (nitrogênio, fosfato, oxigênio, etc.) com acúmulo de polímero de acordo com a fonte de carbono oferecida (Dawes and Senior 1973). O processo de produção de PHA usualmente utiliza a exaustão total do elemento essencial para o crescimento. Sob essas condições, a biomassa residual (material celular não-PHA) permanece constante durante o acúmulo de polímero (Braunegg et al. 1998). Por outro lado, a adição do elemento limitante durante a fase de produção permite um crescimento das células, aumentando a produtividade de polímero (Suzuki et al. 1986; Bitar and Underhill 1990; Aragão et al. 1996). Entretanto, a melhor velocidade de produção de biomassa a ser mantida durante a fase de produção de polímero ainda não foi definida.

A limitação em nitrogênio e fosfato tem sido a mais aplicada na produção de polímero por *R. eutropha*. Quando a limitação em nitrogênio é utilizada para induzir o acúmulo de polímero, a solução de NH₄OH não pode ser usada para controlar o pH. Em seu lugar, NaOH é utilizado; entretanto, sua toxicidade pode levar a uma significativa lise das células. Estudos mostraram que a limitação em fosfato pode apresentar vantagens uma vez que não é necessário substituir NH₄OH por NaOH para controle de pH e não há lise celular (Ryu et al. 1997). Como o fosfato não participa diretamente da composição de proteínas (Pelczar et al. 1993), sua limitação permite um crescimento celular residual por algum tempo.

Além disso, esse elemento está envolvido na reciclagem dos intermediários energéticos (ATP/ADP), levando a um acréscimo na produção de polímero.

No presente trabalho, o efeito da estratégia de alimentação de fosfato e a melhor velocidade de produção de biomassa (r_x) durante a fase de produção de P(3HB-co-3HV) foram determinados em culturas de *R. eutropha* visando ao aumento da produtividade de polímero.

Materiais e métodos

Microrganismo

O microrganismo utilizado foi *R. eutropha*, DSM 545, mutante que utiliza glicose para crescimento.

Condições de cultura

Inicialmente as células foram cultivadas em um meio de enriquecimento, caldo nutriente (NB), contendo 5 g de peptona de carne l^{-1} e 3 g de extrato de carne l^{-1} , a $30^{\circ}C$ por 24 h. O inóculo utilizado nas culturas foi preparado por 24 h em frascos de 1 l contendo 400 ml de meio mineral (MM) (Aragão et al. (1996)) a $30^{\circ}C$. Após autoclavado o meio de cultura acima citado, uma solução estéril de fosfato foi assepticamente adicionada ao meio de cultura para obter uma concentração final de 8.5 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ l^{-1} e 1.5 g KH_2PO_4 l^{-1} . Da mesma maneira, a fonte de carbono foi adicionada como uma solução estéril de glicose/frutose (1:1) 500 g l^{-1} de forma a obter uma concentração inicial de 30 g l^{-1} no meio.

O inóculo foi transferido para o fermentador de 6 l (Bioflo III – New Brunswick, Edison, USA) contendo 3,6 l de meio de cultura, que foi o mesmo utilizado para o inóculo, exceto que a solução de fosfato foi reduzida para obter uma concentração final de 0.9 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ l^{-1} e 0.15 g KH_2PO_4 l^{-1} . A cultura foi dividida em duas fases: uma fase de crescimento na qual não houve limitação de nutriente, e a fase de produção com limitação de fosfato na qual ácido propiônico e fosfato foram alimentados. O início da fase de produção foi estabelecido quando a concentração de fosfato no meio era menor que 0,1 g l^{-1} . Uma solução de glicose/frutose (500 g l^{-1}) foi adicionada na forma de pulsos a fim de manter a fonte de carbono entre 10 – 30 g l^{-1} no meio de cultura. O pH da cultura foi mantido em 7,0 pela adição de 5% (v/v) NH_4OH ou 1M HCl.

Alimentações de fosfato e ácido propiônico

Várias condições de alimentação de fosfato durante a fase de produção foram investigadas. A solução de fosfato contendo $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e KH_2PO_4 foi adicionada de forma a manter constantes velocidades de produção de biomassa (r_x) ($\text{gXr l}^{-1}\text{h}^{-1}$), levando em conta o coeficiente de conversão de fósforo em biomassa ($Y_{X/P}$) of 100 g g^{-1} , previamente determinado por nosso grupo (dados não publicados). As velocidades de produção de biomassa investigadas foram 0,00, 0,02, 0,04, 0,07, 0,13 e 0,20 $\text{gXr l}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Para a produção do copolímero, uma solução de ácido propiônico foi adicionada durante a fase de produção para obter uma concentração menor que 1 g l^{-1} no meio.

Métodos analíticos

Amostras para determinação da concentração de peso seco (DCW), PHA, glicose/frutose, proteína e fosfato, foram retiradas a cada 2 h até a oitava hora de cultura e após a cada 1,5 h até o final. Para determinação do DCW, as células foram obtidas por filtração, de um volume entre 3 e 10 ml do meio de cultura, através de membranas de poliamida (poro de $0.2 \mu\text{m}$) pré-secas e pesadas, seguidas de secagem a 100°C por 24 h. Para análise de proteínas, amostras do meio de cultura (1-2 ml) foram centrifugadas em tubos Eppendorf, o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e congelado para subsequente análise pelo método de Biureto (Stickland, 1951) usando albumina bovina (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo., USA) como padrão. As amostras de células usadas para análise de P(3HB-co-3HV) foram obtidas da mesma forma que aquelas para análise de proteína e preparadas de acordo com o método descrito por Marangoni et al. (2000). P(3HB-co-3HV) (Aldrich, USA) de origem natural com um teor definido de 3HV (12%) foi utilizado como padrão externo. Os metil-ésteres resultantes foram quantificados por injeção de $2 \mu\text{l}$ em um cromatógrafo a gás (CG-90) equipado com uma coluna semi-capilar (Supercowax-10 – $0.53\text{mm} \times 30\text{m}$). A temperatura utilizada na coluna foi 110°C , o detector de ionização de chama foi mantido a 230°C , e a temperatura de injeção foi 185°C . As concentrações de glicose/frutose e fosfato foram determinadas de acordo com os métodos descritos por Marangoni et al. (2000).

Resultados

A tabela 1 mostra os resultados, em massa, obtidos para biomassa total, polímero, biomassa residual e proteína para todas as culturas. Maiores conteúdos de polímero foram obtidos nas culturas nas quais foram mantidos os menores valores de r_x , 0,02 e 0,04 $\text{gXr l}^{-1} \text{h}^{-1}$.

Tabela 1 Comparação dos resultados obtidos nas culturas com diferentes estratégias de alimentação de fosfato

r_x ($\text{gXr l}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Tempo (h) ^(a)	Xt (g) ^(b)	P(3HB-co-3HV) (g)	Xr (g) ^(c)	Proteína (g)	P(3HB-co-3HV) (%)
0,00	26,8	98,9	35,3	63,5	39,3	35,7
0,02	27,3	98,2	44,5	53,7	28,1	45,3
0,04	24,7	99,2	44,1	55,1	35,0	44,5
0,07	22,5	95,6	36,5	59,2	32,7	38,1
0,13	23,5	74,2	28,5	45,7	34,3	38,4
0,20	26,0	65,5	17,7	47,9	38,8	27,0

^a Tempo total de cultura, considerando-se 10,5 h de fase de produção para todas as culturas

^b Biomassa total

^c Biomassa residual

Produtividade em polímero (P(3HB-co-3HV)) durante toda a cultura e durante a fase de produção estão ilustradas nas Fig. 1a, b respectivamente. A cultura com r_x de 0,02 $\text{gXr l}^{-1} \text{h}^{-1}$ foi a que obteve os maiores valores de produtividade durante a fase de produção, enquanto na cultura com o maior r_x , 0,2 $\text{gXr l}^{-1} \text{h}^{-1}$, foram obtidos os menores valores de produtividade.

A produtividade máxima em polímero durante a fase de produção foi comparada entre todas as culturas e está ilustrada na Fig. 2. Para a cultura sem alimentação obteve-se 0,6 $\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$ enquanto que o maior e menor valores obtidos foram de 0,98 $\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$ e 0,38 $\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$ para as culturas com r_x de 0,02 and 0,2 $\text{gXr l}^{-1} \text{h}^{-1}$, respectivamente.

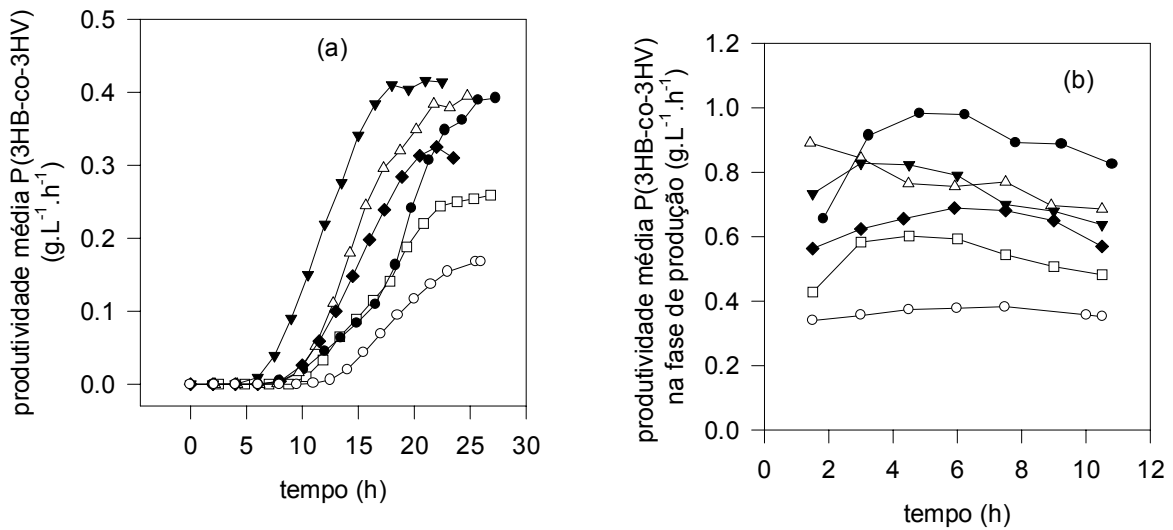


Fig. 1 Produtividade de P(3HB-co-3HV) em toda a cultura (a) e na fase de produção (b) para diferentes r_x (gXr.L⁻¹.h⁻¹): 0,00 (□); 0,02 (●); 0,04 (Δ); 0,07 (▼); 0,13 (◆); 0,20 (○)

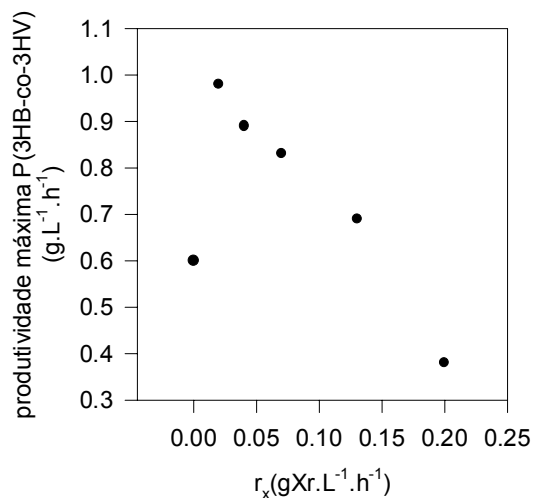


Fig. 2 Produtividade máxima de P(3HB-co-3HV) na fase de produção para diferentes r_x .

Sob as condições de alimentação de fosfato, esperava-se que as células continuassem produzindo proteínas na fase de produção, uma vez que o fósforo não está diretamente envolvido na síntese das proteínas. Visando testar esta suposição, a produtividade máxima em proteína durante a fase de produção foi analisada. Como esperado, maiores valores de r_x resultaram em maiores produtividades máximas de proteína. A relação entre a produtividade máxima de proteína e a produtividade máxima de polímero na fase de produção está apresentada na Fig. 3. Verificou-se que maior produtividade em proteína não significa maior

produção de polímero. Pode ser visto que com o aumento nos valores de r_x , foram obtidas maiores produtividades máximas em proteína; entretanto, menores produtividades máximas em polímero, indicando que valores muito elevados de r_x levam as células a produzir grandes quantidades de proteína em detrimento do acúmulo de polímero. Os resultados obtidos para r_x 0,02 e 0,04 foram muito próximos, com produtividade em proteína suficiente para alcançar as maiores produtividades em polímero. Estes resultados sugerem que a melhor estratégia de alimentação de fosfato seria a manutenção de r_x próximo a esses valores.

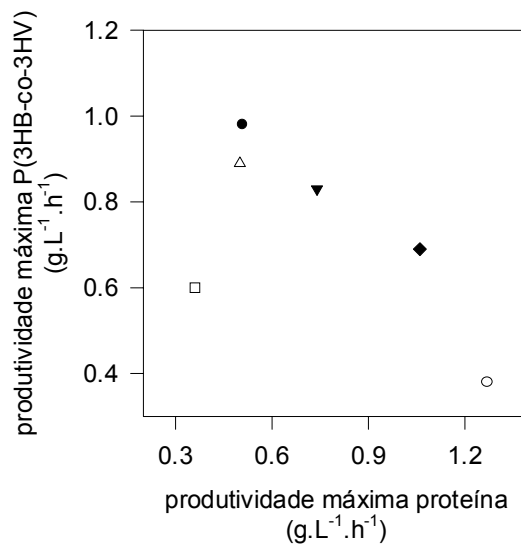


Fig. 3 Relação entre produtividade máxima de proteína e de P(3HB-co-3HV) nas culturas com diferentes r_x (gXr.l⁻¹.h⁻¹): 0,00 (□); 0,02 (●); 0,04 (Δ); 0,07 (▼); 0,13 (◆); 0,20 (○)

Discussão

O efeito da estratégia de alimentação de fosfato na produção de P(3HB-co-3HV) foi analisada. Verificou-se que a alimentação de fosfato mantendo altos níveis de produção de biomassa, especificamente 0,13 gXr l⁻¹ h⁻¹ ou mais, foi prejudicial para a produção de polímero, uma vez que o microrganismo produziu menos polímero do que na carência em fosfato. Os baixos valores de produtividade de polímero obtidos nessas culturas pode ter sido causado pelo alto nível de produção de biomassa residual. Por outro lado, P(3HB-co-3HV) foi acumulado em maiores quantidades quando baixas velocidades de produção de biomassa foram mantidas. Levando em consideração o conteúdo e a produtividade de polímero obtidos, a melhor estratégia de alimentação de fosfato para a produção de polímero requer a manutenção da produção de biomassa em 0,02 gXr l⁻¹ h⁻¹ durante a fase de produção. Sob essa

condição, foi possível produzir 45,3% de P(3HB-co-3HV) com produtividade máxima de polímero de $0,98 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ na fase de produção, comparado com 35,7 % de copolímero com $0,6 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ na cultura em carência de fosfato com r_x de 0,00. A estratégia de alimentação do nutriente limitante durante a fase de produção foi estudada por Bitar e Underhill (1990) e Aragão et al. (1996). Eles utilizaram alimentação de nitrogênio e obtiveram maiores produtividades de polímero comparadas com culturas sem adição de nitrogênio na fase de produção. Da mesma forma, a adição de pequenas quantidades de nitrogênio durante o período de acúmulo permitiu um pequeno, porém constante crescimento de células, o que levou à produção de grandes quantidades de polímero no estudo de Koyama e Doi (1993). Poucos estudos de produção de P(3HB) por *R. eutropha* utilizando limitação de fosfato têm sido publicados. No estudo de Ryu et al. (1997), a alta produtividade obtida em culturas de alta densidade de células de *R. eutropha* pode ter sido resultado das satisfatórias condições fisiológicas das células, que não sofreram lise durante limitação em fosfato. A produtividade obtida nesse caso, poderia ser ainda maior se a estratégia de alimentação de fosfato tivesse sido utilizada durante a fase de produção, conforme proposto neste trabalho. Este estudo demonstrou que a aplicação da estratégia de alimentação de fosfato durante a fase de produção de P(3HB-co-3HV) por *R. eutropha* aumenta o acúmulo de polímero e que a melhor velocidade de produção de biomassa (r_x) a ser mantida durante a fase de produção é de $0,02 \text{ gXr l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Agradecimentos

Suporte financeiro foi obtido na forma de bolsas de pesquisa pela CAPES, para C. R. Squio, e CNPq (Brasil) para C. Marangoni e C. S. De Vecchi. Os experimentos estão de acordo com as leis correntes do Brasil, país no qual os experimentos foram realizados.

Referências

- Anderson AJ, Dawes EA (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev* 54: 450-472
- Aragão GMF, Lindley ND, Uribealrrea JL, Pareilleux A (1996) Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol Lett* 18: 937-942
- Bitar A, Underhill S (1990) Effect of ammonium supplementation on production of poly-b-hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in batch culture. *Biotechnol Lett* 12: 563-568
- Braunegg G, Lefebvre G, Genser KF (1998) Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *J Biotechnol* 65: 127-161
- Byrom D (1987) Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *TIBTECH* 5: 246-250

- Dawes EA, Senior PJ (1973) The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv Microbiol Physiol* 10: 135-266
- Koyama N, Doi Y (1993) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from various carbon sources by batch-fed cultures of *Alcaligenes eutrophus*. *J Environ Polym Degrad* 3:235-240
- Lee SY (1996) Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol Bioeng* 49: 1-14
- Marangoni C, Furigo Jr A, Aragão GMF (2000) Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. *Biotechnol. Lett.* 22: 1635-1638
- Marangoni C, Furigo Jr A, Aragão, GMF (2002) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. *Proc Biochem* 38:137-141
- Pelczar MJ, Krieg NR, Chan ECS (1993) *Microbiology: Concepts and Applications*, 6th edn. McGraw-Hill College Div.
- Ryu HW, Hahn SK, Chang YK, Chang HN (1997) Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. *Biotechnol Bioeng* 55: 28-32
- Stickland LH (1951) The determination of small quantities of bacteria by means of the Biuret reaction. *J Gen Microbiol* 5:689-703
- Suzuki T, Yamane T, Shimizu S (1986) Kinetics and effect of nitrogen source feeding on production of poly- β -hydroxybutyric acid by fed-batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 24: 366-369

4.1.1 Conclusão

Através deste estudo, demonstrou-se que pequenas razões de alimentação de fosfato em culturas de *R. eutropha* aumentam a produção de polímero e foi possível determinar que a melhor velocidade de produção de biomassa residual (r_x) a ser mantida é de $0,02 \text{ gXr.L}^{-1}\text{h}^{-1}$. Também foi verificado que razões maiores de alimentação levam a um grande crescimento residual e de proteínas, ou seja, diminui a condição de limitação de nutriente, desfavorecendo o acúmulo de polímero.

Nas culturas acima citadas, a determinação do início da fase de produção foi realizada pela análise de fosfato durante a cultura. Paralelamente, foi feito o acompanhamento do potencial redox. Na etapa seguinte, foi estudada a possibilidade da utilização do monitoramento do potencial redox para determinação do início da fase de produção, durante a cultura.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DA FASE DE PRODUÇÃO DE P(3HB-co-3HV) POR *R. EUTROPHA* ATRAVÉS DO POTENCIAL REDOX

Em culturas de *R. eutropha*, a identificação do início da fase de produção é uma etapa muito importante do processo, uma vez que é nesse ponto que se iniciam as alimentações de ácido propiônico para a formação do copolímero, de fosfato para a manutenção de determinado crescimento celular (ver item 4.1) e outras possíveis suplementações. Para essa determinação, pode-se utilizar valores de oxigênio dissolvido ou acompanhamento da concentração do elemento limitante durante a cultura. Na indisponibilidade da sonda de oxigênio dissolvido, em nossos estudos anteriores utilizou-se a análise de fosfato para indicar o início da fase de produção. Entretanto, o potencial redox de uma cultura é uma das variáveis mais facilmente mensuráveis em um processo biotecnológico, através de eletrodos esterilizáveis, baratos e estáveis (FINKLER, 2002). O potencial redox (Eh) indica a concentração relativa de agentes oxidantes e redutores do meio, logo, ele é o indicador que representa a possibilidade de pares redox agirem como doadores e aceptores de elétrons (LEE et al., 1998). O potencial redox do ambiente que circunda o microorganismo é um importante determinante de sua atividade metabólica (THOMPSON e GERSON, 1985), e seu monitoramento tem sido aplicado para identificar alterações do estado metabólico de microrganismos (KWONG e RAO, 1991; LEE et al., 1998; BAGRAMYAN et al., 2000; FINKLER, 2002).

Dessa forma, o comportamento do potencial redox foi investigado nas culturas anteriores e verificou-se que, no momento da limitação da cultura, o mesmo apresentava seu ponto mínimo. Assim, o objetivo desta etapa foi comparar os resultados obtidos em uma cultura utilizando o potencial redox para indicar o início da fase de produção com uma cultura anterior, onde se utilizou a análise de fosfato. Todas

as demais condições foram semelhantes, mantendo-se um crescimento residual (r_x) de $0,02 \text{ gXr.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ (SQUIO et al., 2003).

Os resultados estão apresentados no artigo a seguir, traduzido para o português, intitulado "Culture redox potential identifies the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production phase by *Ralstonia eutropha*", que foi submetido ao periódico **Biotechnology Progress** em junho de 2003. O artigo está apresentado na forma em que foi submetido para publicação no Anexo IV.

Potencial redox identifica a fase de produção de poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por *Ralstonia eutropha*

Cláudia R. Squio, Leandro Finkler, Regina V. Antonio, Cíntia M. Ferreira, Gláucia M. F.

Aragão*

Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Centro Tecnológico, C.P. 476, 88040-900 – Florianópolis, Brasil

* glaucia@enq.ufsc.br

Resumo: O comportamento do potencial redox durante a produção de poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por *Ralstonia eutropha* foi investigado e, sua utilização para identificar a fase de produção foi proposta. As culturas foram realizadas em fermentador de 6L, utilizando glicose e frutose, ácido propiônico e limitação em fosfato. O potencial redox atingiu o mínimo valor no início da fase de produção. Culturas utilizando análise de fosfato e potencial redox para identificar o início da fase de produção foram comparadas. Os resultados foram bastante similares, obtendo-se cerca de 43% de polímero. Demonstrou-se a utilização do potencial redox para identificar mudanças metabólicas em culturas de *R. eutropha*.

Introdução

O desenvolvimento de materiais biodegradáveis e biocompatíveis está sendo motivado pelo impacto ambiental causado pelo despejo de plásticos convencionais no ambiente. Polihidroxialcanoatos (PHA's) são termoplásticos biodegradáveis acumulados por muitas bactérias como reserva de carbono e energia sob condições de crescimento desbalanceadas (1). Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) [P(3HB-co-3HV)] é um copolímero que possui atrativas propriedades termoplásticas, com grande interesse industrial (2).

Ralstonia eutropha é um microrganismo produtor de PHA que possui potencial para produção industrial, devido ao seu rápido crescimento, alta produtividade e habilidade de crescimento a partir de fontes renováveis de carbono (2,3).

A produção de PHA's por *R. eutropha* é realizada em duas fases - uma fase inicial de crescimento não limitado, seguido da fase de produção, com limitação de algum nutriente (nitrogênio, fosfato, oxigênio, etc.), que favorece o acúmulo de polímero de acordo com a fonte de carbono oferecida (4). Durante a fase de produção, uma pequena alimentação do nutriente limitante pode permitir um certo crescimento residual, levando ao acréscimo da produção de polímero (5,6,7). Além disso, para promover a produção do copolímero é necessária a alimentação de co-substrato (p.e. ácido propiônico) durante a fase de produção. Entretanto, se o ácido propiônico for alimentado antes do início da fase de produção, o microrganismo pode utilizá-lo para crescimento em detrimento da produção do copolímero, levando a um desperdício do co-substrato, com maiores custos de produção. Dessa forma, no processo de produção de P(3HB-co-3HV) por *R. eutropha*, a identificação da fase de produção é muito importante. Estudos prévios demonstraram o uso do potencial redox como uma fonte de informação sobre o estado metabólico das culturas, indicando mudanças nas atividades metabólicas (8,9), entretanto, não há relatos de seu uso na produção de PHA's.

O potencial redox (Eh) indica a concentração relativa de agentes oxidantes e redutores no meio, logo, é o indicador que representa a possibilidade de pares redox agirem como doadores e receptores de elétrons (10). O potencial redox do ambiente que circunda o microrganismo pode ser um importante determinante de sua atividade metabólica. Os organismos podem influenciar o potencial redox do meio, alterando o pH, temperatura, nível de oxigênio ou produzindo compostos que alterem esse potencial redox (11).

Vários estudos sobre a relação entre o potencial redox e o estado fisiológico de sistemas microbianos têm sido relatados. Em alguns deles, o potencial redox foi controlado pela manipulação de variáveis, visando o aumento da produção de produtos (11,12), ou somente monitorado para verificação de mudanças no estado metabólico (8,13).

Neste estudo, o comportamento do potencial redox da cultura, durante a produção de P(3HB-co-3HV) por *R. eutropha*, foi investigado e seu sinal foi utilizado para avaliar as atividades metabólicas, identificando a fase de produção. Os resultados foram comparados com culturas utilizando a análise do nutriente limitante para essa determinação.

Materiais e Métodos

Microrganismo. O microrganismo utilizado foi *R. eutropha*, DSM 545, mutante que utiliza glicose para crescimento.

Meios e condições de cultura. Inicialmente as células foram cultivadas em um meio de enriquecimento, caldo nutriente (NB), contendo 5.g.L⁻¹ de peptona de carne e 3 g.L⁻¹ de extrato de carne, a 30^o C por 24 horas. O inóculo utilizado nas culturas foi preparado por 24 h, a 30^o C, em frascos de 1 L contendo 400 mL de meio mineral (MM) (6). Após autoclavado o meio de cultura acima citado, uma solução estéril de fosfato foi assepticamente adicionada ao meio de cultura para obter uma concentração final de 8,5 g Na₂HPO₄.12H₂O. L⁻¹ e 1,5 g KH₂PO₄.L⁻¹. Da mesma maneira, a fonte de carbono foi adicionada como uma solução estéril

de glicose/frutose (1:1) 500 g.L^{-1} , de forma a obter uma concentração inicial de 30 g.L^{-1} no meio. O inóculo foi transferido para o biorreator de 6 L (Bioflo III - New Brunswick, Edison, USA) contendo 3,6 L de meio de cultura, que foi o mesmo utilizado para o inóculo, exceto que a solução de fosfato foi reduzida para obter uma concentração final de $0,9 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} \cdot \text{L}^{-1}$ e $0,15 \text{ g KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{L}^{-1}$. A cultura foi dividida em duas fases: uma fase de crescimento sem limitação de nutriente, e a fase de produção com limitação de fosfato na qual ácido propiônico e fosfato foram alimentados. Pulsos da solução de glicose/frutose foram realizados durante a cultura para manter a concentração da fonte de carbono entre $10 - 30 \text{ g.L}^{-1}$ no meio. O pH do meio foi mantido a 7,0 pela adição de 5% (v/v) NH_4OH ou 1 M HCl . O potencial redox da cultura foi monitorado através de um eletrodo de platina (Analion, Brasil).

Determinação da fase de produção. O ponto de limitação foi determinado por dois métodos: na cultura A, pela análise de fosfato durante a cultura, quando a concentração de fosfato no meio era menor que $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ e na cultura B, pelo potencial redox da cultura, onde o mínimo valor indicou o início da fase de produção.

Alimentação de fosfato e ácido propiônico. Uma solução contendo $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ and KH_2PO_4 foi continuamente alimentada durante a fase de produção, de forma a manter uma constante velocidade de produção de biomassa (r_x) de $0,02 \text{ gXr.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ (5). Para a produção do copolímero, uma solução de ácido propiônico foi alimentada durante a fase de produção, de modo a obter uma concentração menor que 1 g.L^{-1} no meio.

Métodos analíticos. Amostras para determinação da concentração de peso seco (DCW), PHA, glicose/frutose, proteína e fosfato, foram retiradas a cada 2 h até a oitava hora de cultura e após a cada 1,5 h até o final. Para determinação do DCW, as células foram obtidas por filtração, de um volume entre 3 e 10 ml do meio de cultura, através de membranas de poliamida (poro de $0,2 \mu\text{m}$) pré-secas e pesadas, seguidas de secagem a 100°C por 24 h. Para

análise de proteínas, amostras do meio de cultura (1-2 ml) foram centrifugadas em tubos Eppendorf, o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e congelado para subsequente análise pelo método de Biureto (14) usando albumina bovina (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo., USA) como padrão. As amostras de células usadas para análise de P(3HB-co-3HV) foram obtidas da mesma forma que aquelas para análise de proteína e preparadas de acordo com o método descrito anteriormente (15). P(3HB-co-3HV) (Aldrich, USA) de origem natural com um teor definido de 3HV (12%) foi utilizado como padrão externo. Os metil-ésteres resultantes foram quantificados por injeção de 2 µl em um cromatógrafo a gás (CG-90) equipado com uma coluna semi-capilar (Supercowax-10 – 0.53mm X 30m). A temperatura utilizada na coluna foi 110⁰C, o detector de ionização de chama foi mantido a 230⁰C, e a temperatura de injeção foi 185⁰C. As concentrações de glicose/frutose e fosfato foram determinadas de acordo com os métodos descritos por Marangoni et al. (15).

Resultados e Discussão

Cultura com análise de fosfato indicando o ponto de limitação

O potencial redox de algumas culturas de *R. eutropha*, na produção de P(3HB-co-3HV), foi monitorado e apresentou o mesmo comportamento em todas elas. A Fig. 1 mostra o perfil do potencial redox, do fosfato residual e da biomassa residual, expressa em ln, para uma dessas culturas (cultura A). O perfil do potencial redox pode ser dividido em 4 fases: (a) decréscimo rápido; (b) decréscimo lento; (c) ponto mínimo; (d) acréscimo. Estes diferentes comportamentos do potencial redox podem ser explicados pelas mudanças no estado metabólico das células, fortemente relacionadas ao crescimento celular. Nas duas primeiras horas, ocorreu o maior decréscimo (fase a) o qual foi anteriormente explicado como um fenômeno que ocorre durante a fase lag (9). A partir deste ponto, as células entraram em crescimento exponencial e o potencial redox caiu lentamente (fase b). Até 16,5 h, as células

estiveram em crescimento não limitado, com uma velocidade de crescimento específica de $0,3 \text{ h}^{-1}$. Durante essas fases, o potencial redox decresceu de 183 a 68 mV. A linha pontilhada indica o ponto de limitação assumido durante a cultura e a linha contínua indica o ponto de limitação real - o início da fase de produção, em 16,5 h. Neste ponto, o fosfato estava esgotado e o mínimo valor do potencial redox foi alcançado (68 mV) (fase c). Entretanto, durante a cultura, o ponto de limitação foi assumido em 15,2 h, quando a análise de fosfato indicava $0,03 \text{ g.L}^{-1}$ de fosfato. A partir deste momento, ácido propiônico e fosfato foram alimentados continuamente. A fase de produção foi mantida durante 10,5 h e nesse período, o potencial redox aumentou lentamente (fase d). Apesar do potencial redox poder identificar a exaustão de substrato (9), sob as concentrações de substrato mantidas neste estudo, não foi possível verificar nenhuma alteração do potencial redox da cultura correspondente ao substrato.

De acordo com esses resultados, pode-se assumir que o mínimo valor do potencial redox identifica o início da fase de produção de polímero por *R. eutropha*, da mesma forma que foi anteriormente demonstrado que o mínimo potencial redox da cultura identificava a fase de produção de aminoácidos por *Corynebacterium glutamicum* (8).

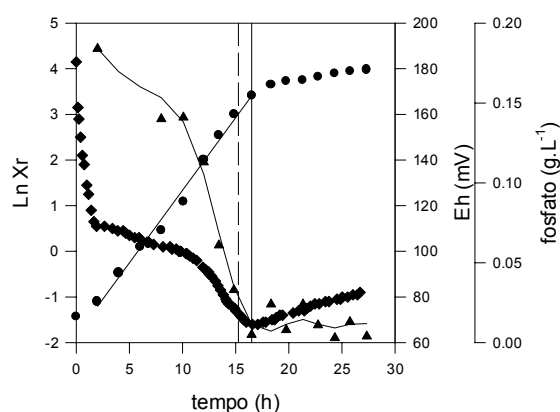


Figura 1. Evolução da biomassa residual, em \ln , ($X_r = X_t - P(3\text{HB-co-3HV})$) (●), fosfato residual (▲) e potencial redox (◆) para a cultura utilizando análise de fosfato para indicar a fase de produção. A linha pontilhada indica o ponto de limitação assumido durante a cultura e a linha contínua indica o ponto de limitação real.

Cultura utilizando potencial redox para indicar o ponto de limitação

Com o objetivo de confirmar a capacidade do potencial redox da cultura identificar a fase de produção, foi realizada uma cultura (cultura B) monitorando o potencial redox, sem análise de fosfato durante a cultura, e os resultados foram comparados com uma cultura prévia (cultura A) onde se utilizou a análise de fosfato para identificar a limitação. A Fig. 2 mostra o perfil do potencial redox, fosfato residual e biomassa residual, expressa em ln, para a cultura utilizando o potencial redox. A linha pontilhada indica o ponto de limitação assumido durante a cultura, que foi exatamente no momento em que o potencial redox atingiu o mínimo valor, em 16,5 h. A partir deste ponto, foram adicionados ácido propiônico e fosfato. Os resultados de formação de biomassa total e residual, proteína, composição e acúmulo de polímero para ambas culturas estão apresentados na Tabela 1. Verifica-se que os resultados obtidos foram muito similares, o que confirma a utilidade do potencial redox da cultura na identificação de mudanças metabólicas em *R. eutropha*.

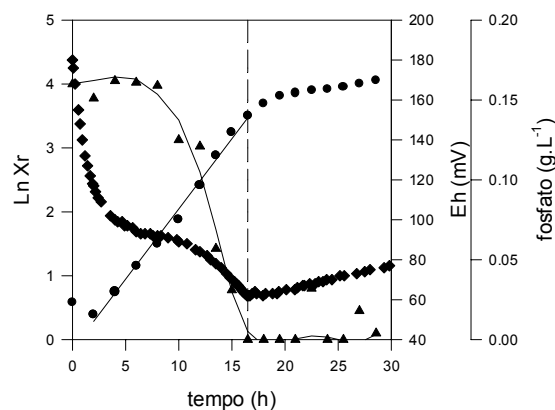


Figura 2. Evolução da biomassa residual, em ln, ($X_r = X_t - P(3HB-co-3HV)$) (●), fosfato residual (▲) e potencial redox (◆) para a cultura utilizando o potencial redox para indicar a fase de produção. A linha pontilhada indica o ponto de limitação assumido durante a cultura.

Tabela 1. Resultados de biomassa total e residual, proteína, acúmulo e composição de polímero, para as culturas utilizando análise de fosfato (cultura A) e potencial redox (cultura B) para identificar a fase de produção.

	Cultura A	Cultura B
tempo (h) ⁽¹⁾	25,8	27,0
Xt (g) ⁽²⁾	93,4	94,4
P(3HB- <i>co</i> -3HV) (g)	41,7	39,9
Xr (g) ⁽³⁾	51,7	54,5
Proteína (g)	28,0	31,4
% P(3HB- <i>co</i> -3HV)	44,8	42,3
% 3HV	5,0	4,2

(1) tempo total de cultura, considerando 10,5 h de fase de produção

(2) biomassa total

(3) biomassa residual ($X_r = X_t - P(3HB-co-3HV)$)

Da mesma forma que estudos prévios mostraram que o potencial redox de culturas é muito útil no monitoramento de mudanças do estado microbiano em diferentes culturas e produtos (8,9,10,13) demonstrou-se que também pode ser usado com sucesso na produção de P(3HB-*co*-3HV) por *R. eutropha*.

Conclusão

Este estudo demonstrou que o potencial redox identifica mudanças metabólicas em *R. eutropha*, durante a produção de P(3HB-*co*-3HV), e que o seu mínimo valor pode ser utilizado para identificar precisamente o início da fase de produção de polímero.

Referências

- (1) Anderson, A.; Dawes, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **1990**, *54*, 450-472.
- (2) Byrom, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Tibtech* **1987**, *5*, 246-250.
- (3) Marangoni, C.; Furigo Jr A.; Aragão, G. M. F. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. *Proc. Biochem.* **2002**, *38*, 137-141.
- (4) Dawes, E. A.; Senior, P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* **1973**, *10*, 135-266.
- (5) Squio, C. R.; Marangoni, C.; De Vecchi, C. S.; Aragão, G. M. F. Phosphate feeding strategy during production phase improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) storage by *Ralstonia eutropha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 257-260.
- (6) Aragão, G. M. F.; Lindley, N. D.; Uribe Larrea, J. L.; Pareilleux, A. Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Lett.* **1996**, *18*, 937-942.
- (7) Bitar, A.; Underhill, S. Effect of ammonium supplementation on production of poly- β -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in batch culture. *Biotechnol. Lett.* **1990**, *12*, 563-568.
- (8) Kwong, S. C. W.; Rao, G. Utility of culture redox potential for identifying metabolic state changes in amino acid fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *38*, 1034-1040.

- (9) Kwong, S. C. W.; Randers, L.; Rao, G. On-Line assessment of metabolic activities based on culture redox potential and dissolved oxygen profiles during aerobic fermentation. *Biotechnol. Prog.* **1992**, *8*, 576-579.
- (10) Lee, T. H.; Chang, Y. K.; Chung, B. H.; Park, Y. H. Correlation of redox potential with state variables in cultures under controlled dissolved oxygen concentration and pH. *Biotechnol. Prog.* **1998**, *14*, 959-962.
- (11) Thompson, B. G.; Gerson, D. F. Electrochemical control of redox potential in batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **1985**, *27*, 1512-1515.
- (12) Janssen, A. J. H.; Meijer, S.; Bontsema, J.; Lettinga, G. Application of the redox potential for controlling a sulfide oxidizing bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *60*, 147-155.
- (13) Bagramyan, K.; Galstyan, A.; Trchounian, A. Redox potential is a determinant in the *Escherichia coli* anaerobic fermentative growth and survival: effects of impermeable oxidant. *Bioelectroch.* **2000**, *51*, 151-156.
- (14) Stickland, L. H. The determination of small quantities of bacteria by means of the Biuret reaction. *J. Gen. Microbiol.* **1951**, *5*, 689-703.
- (15) Marangoni, C.; Furigo Jr. A.; Aragão, G. M. F. Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Rasltonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22*, 1635-1638.

4.2.1 Conclusão

Este estudo demonstrou que o potencial redox identifica mudanças metabólicas em culturas de *R. eutropha* e que seu ponto mínimo pode ser um preciso indicativo do início da fase de produção de P(3HB-co-3HV) para alimentação de ácido propiônico. A alimentação deste co-substrato anterior ao efetivo ponto de limitação leva a que o microrganismo utilize como substrato para o crescimento. Este fato, leva a um aumento do custo de produção do copolímero.

Como os resultados utilizando-se análise de fosfato e potencial redox foram muito semelhantes, e o monitoramento do Eh é um método mais simples e prático durante a cultura, a partir desta etapa este foi o método utilizado para identificar o início da fase de produção.

As estratégias até aqui utilizadas levaram ao aumento do acúmulo de polímero e facilitaram o processo produtivo. A partir desta fase, passou-se a buscar suplementos nutricionais que pudessem aumentar ainda mais a produção de polímero, entre eles ácidos graxos e óleos vegetais, sempre visando a diminuição dos custos de produção.

4.3 ESTRATÉGIA DE UTILIZAÇÃO DE SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS

4.3.1 Utilização dos ácidos graxos linoleico e oleico

Com o objetivo de aumentar a produção de P(3HB-co-3HV) por *R. eutropha* foram utilizados alguns suplementos nutricionais como ácidos graxos. Estudos anteriores demonstraram que o ácido oleico é um bom substrato tanto para crescimento como para produção de polímero por *R. eutropha* (FUKUI e DOI, 1998; MARANGONI, et al. 2000). Por outro lado, estudos prévios realizados em nosso laboratório levavam a crer que o ácido linoleico também pudesse melhorar a produção de polímero. Assim, nesta etapa foram realizadas culturas utilizando ácido oleico e uma mistura de ácido linoleico/oleico (2:1 v/v - Sigma Aldrich) adicionados na forma de pulso, no início da fase de produção, a fim de se obter $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ no meio. Esta concentração já havia sido utilizada anteriormente por MARANGONI et al. (2000), para o ácido oleico. Todas as demais condições foram as mesmas utilizadas anteriormente na cultura em que a alimentação de fosfato foi suficiente para manter um r_x de $0,02 \text{ gXr.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ na fase de produção.

Os resultados estão apresentados a seguir, no artigo intitulado "Utilização de ácidos linoleico e oleico como suplementos nutricionais aumenta a produção de poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxicaprolato) por *Ralstonia eutropha*", aprovado para publicação nos **Anais** do XIV Simpósio Nacional de Fermentações, Florianópolis, 2003.

Utilização de ácidos linoleico e oleico como suplementos nutricionais aumenta a produção de poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por *Ralstonia eutropha*

Cláudia Regina Squio¹, Cíntia Maria Ferreira¹ e Gláucia Maria Falcão de Aragão¹

¹Universidade Federal de Santa Catarina – Depto. de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
Caixa Postal 476 – 88040-900 Florianópolis – SC - e-mail: glaucia@enq.ufsc.br

RESUMO

A estratégia de utilização dos ácidos graxos linoleico e oleico como suplementos nutricionais na produção de poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por R. eutropha foi estudada neste trabalho. Culturas foram realizadas em biorreator de 4 L com glicose e frutose como substratos e alimentação de fosfato e ácido propiônico na fase de produção. Os ácidos graxos foram adicionados no início da fase de produção, na concentração de 0,3 g.L⁻¹. O uso destes suplementos aumentou em 11% a produção de polímero, que foi maior para a cultura onde foi utilizada a mistura de ácido linoleico/oleico (2:1 v/v), obtendo-se um acúmulo de 57,1% de P(3HB-co-3HV).

INTRODUÇÃO

Os plásticos vêm sendo cada vez mais utilizados em nosso cotidiano, de múltiplas formas, inclusive nas aplicações para as quais anteriormente utilizavam-se outros materiais. A rápida descartabilidade de alguns objetos e a dificuldade de degradação dos plásticos convencionais acabam causando um grave problema ambiental e têm despertado o interesse no estudo de alternativas que possam minimizar esse impacto ambiental (Gomez e Bueno Netto, 1997). Dentre essas alternativas está a utilização de biopolímeros, como os polihidroxicanoatos (PHA's), que são plásticos biodegradáveis sintetizados e acumulados no interior de muitas bactérias como reserva de carbono e energia, em condições desbalanceadas do meio, quando há excesso de carbono e limitação de algum nutriente essencial como fósforo, nitrogênio, potássio, oxigênio (Dawes e Senior, 1973). Os PHA's, além de apresentarem a vantagem da biodegradabilidade, também podem ser produzidos a partir de fontes renováveis de carbono como açúcar, soro de leite e óleos vegetais. Por serem biocompatíveis, também podem ser utilizados na área médico-farmacêutica como fios de sutura, enxertos vasculares, entre outros (Williams et al., 1999). Outras possíveis aplicações são em embalagens de cosméticos e alimentos, brinquedos, material escolar, etc.

Polihidroxi-butirato (P(3HB)) é o polímero mais estudado dentre os PHA's. Este polímero possui características próximas às encontradas no polipropileno, porém possui pouca estabilidade térmica e é quebradiço. A incorporação de unidades de 3-hidroxi-valerato (3HV), através de um precursor como o ácido propiônico, leva à síntese do copolímero poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (P(3HB-co-3HV)) por *Ralstonia eutropha*. Este copolímero, por sua vez, apresenta vantagens em relação ao P(3HB), como melhores

propriedades termoplásticas, o que o torna mais interessante para aplicações industriais (Byrom, 1992).

R. eutropha é um dos microrganismos mais estudados para a produção de PHA's, devido à sua facilidade de utilização de fontes renováveis e habilidade de acumular até 80% de seu peso seco em polímero. A produção de polímero por *R. eutropha* é realizada em duas fases, uma fase inicial de crescimento não limitado visando o crescimento celular, seguida de uma fase limitada com acúmulo de polímero (Byrom, 1987). Durante a fase de produção, a alimentação de ácido propiônico conduz à formação do copolímero P(3HB-co-3HV) e a alimentação de pequena quantidade do elemento limitante leva ao aumento do acúmulo de polímero (Squiao et al., 2003; Aragão et al., 1996; Suzuki et al., 1986).

Apesar da grande possibilidade de aplicação do P(3HB-co-3HV), seu uso ainda é limitado devido ao alto custo em relação aos plásticos petroquímicos. Assim, estudos que possam aumentar a produtividade do polímero tornam-se importantes para a redução dos seus custos de produção. Uma opção é a utilização de ácidos graxos como substratos ou suplementos nutricionais na produção de polímero. *R. eutropha* incorpora os ácidos graxos em suas células e metaboliza-os a acetil-CoA pela via da β -oxidação de ácidos graxos. Na sequência, a biossíntese do polímero leva à formação de monômeros 3-HB-CoA, que são polimerizados formando o P(3HB) (Fukui e Doi, 1998). Já foi demonstrado que a suplementação de ácido oleico no processo produtivo de PHA por *R. eutropha* leva a um aumento na produção do polímero (Marangoni et al., 2000). Da mesma forma, estudos anteriores, realizados em nosso laboratório, verificaram que a utilização de óleos vegetais, contendo alta concentração de ácido linoleico, poderia aumentar a produção do polímero, indicando que o ácido linoleico possa ser um bom suplemento nutricional na produção de PHA. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do ácido linoleico como suplemento nutricional na produção de P(3HB-co-3HV) por *R. eutropha*, utilizando-se a alimentação de fosfato na fase de produção, comparando-o com os resultados obtidos com a utilização de ácido oleico e com culturas sem suplementação.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo e meios de cultura

Ralstonia eutropha DSM 545 foi o microrganismo utilizado. O meio de cultura caldo nutriente (NB) foi utilizado para a manutenção e para a primeira pré-cultura com a composição de 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne e 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne. A composição do meio utilizado na segunda pré-cultura foi descrita por Aragão et al. (1996). Após autoclavado o meio de cultura acima citado, uma solução estéril de fosfato foi assepticamente adicionada ao meio para obtenção de uma concentração final de 8,5 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄.12H₂O e 1,5 g.L⁻¹ de KH₂PO₄. Da mesma maneira, a fonte de carbono (glicose e frutose (1:1)) foi adicionada de forma a obter uma concentração inicial de 30 g.L⁻¹. Para a realização da cultura, utilizou-se o mesmo meio acima, porém com concentração final de fosfato de 0,85 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄.12H₂O e 0,15 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, suficiente para obtenção de 10 g.L⁻¹ de biomassa no momento da limitação, baseado em um fator de conversão de fósforo em biomassa ($Y_{P/X}$) de 100 g.g⁻¹ (Aragão, 1996).

Condições de Cultura

O reator utilizado foi o Bioflo III (New Brunswick) com um volume de meio de 4 L. O pH foi mantido em 7,0 através da adição de NH₄OH 5% ou HCl 1M. O antiespumante utilizado foi polipropilenoglicol. O meio de cultura foi inoculado com 10% (v/v) da segunda pré-cultura. O início da fase de produção foi determinado através da exaustão do fosfato no meio. Durante a

fase de produção, houve a alimentação contínua de fosfato a fim de obter um crescimento residual (r_x) de $0,02 \text{ g}_{\text{Xr}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, de acordo com Squio et al. (2003). Para a produção do copolímero, uma solução de ácido propiônico, na concentração de $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, foi continuamente alimentada na vazão de $20 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$. Para as culturas com suplementação de ácidos graxos, um pulso no início da fase de produção foi realizado de maneira a obter uma concentração de $0,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido oleico ou ácido linoleico/oleico (2:1 v/v - Sigma Aldrich) no meio de cultura.

Métodos analíticos

Biomassa: a concentração celular foi determinada por absorvância a 600 nm e por gravimetria conforme descrito por Marangoni et al. (2000).

Açúcar: a dosagem de açúcar foi feita pelo método do ácido 3-5-dinitrosalicílico (DNS), que determina a concentração de açúcares redutores.

Proteínas: amostras do meio de cultura (2mL) foram centrifugadas e os precipitados lavados duas vezes com água destilada e congelados para posterior análise pelo método de Biureto, usando albumina bovina (Sigma) como padrão.

P(3HB-co-3HV): amostras de células para análise de polímero foram obtidas de forma semelhante àquelas para análise de proteínas e foram preparadas conforme descrito por Aragão et al. (1996). Poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxiacrilato) (Sigma) de origem natural com um teor definido de 12% em 3HV foi usado como padrão externo. Os metil-ésteres resultantes da reação de metanólise foram quantificados pela injeção de $0,2 \mu\text{L}$ em cromatógrafo a gás (CG-90) equipado com uma coluna de sílica fundida (Supercowax-10 - $0,53 \text{ mm} \times 30 \text{ m}$). As temperaturas de injeção, detecção e coluna utilizadas foram 185, 230 e 110°C , respectivamente.

Fosfato: utilizou-se um kit de análise de fosfato por sistema colorimétrico (Doles Reagentes - Brasil).

Análise Cinética: As produtividades foram calculadas pela diferença entre a concentração de polímero em um instante t e a concentração inicial de polímero, dividida pelo intervalo de tempo correspondente, ou seja, $\text{produtividade}_{\text{pol}} = (\text{pol}_t - \text{pol}_i) / (t_t - t_i)$. Os dados experimentais foram ajustados pelo software LISSAGE desenvolvido pelo “Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse”, França.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Efeito da suplementação com ácidos graxos:

As evoluções da massa de biomassa total e residual, polímero, proteína e fosfato residual, ao longo das culturas sem suplementação e com suplementação de ácidos oleico e mistura de ácidos linoleico/oléico, estão mostradas nas figuras 1 a, b e c, respectivamente. As culturas foram realizadas por um período de aproximadamente 28 horas. A fase de produção inicia-se quando ocorre a exaustão do fosfato, representada pela linha pontilhada, e teve a duração de 10,5 horas para todas as culturas.

Um resumo dos dados gerais obtidos nas culturas é apresentado na Tabela 1. Os valores são expressos em massa com a finalidade de minimizar possíveis erros de análise devido às diluições do meio no reator provocadas pelas alimentações ao longo da cultura. Observa-se que a produção do polímero foi favorecida quando da suplementação com os ácidos graxos. Obteve-se nesses casos, cerca de 11% a mais de polímero em relação à cultura sem suplementação. O aumento da produção de PHA na cultura suplementada com ácido oleico está de acordo com os resultados obtidos por Fukui e Doi (1998), que obtiveram grande concentração de polímero quando *R. eutropha* cresceu em ácido oleico como fonte de carbono. Choi e Lee (1999) demonstraram que o ácido oleico como suplemento nutricional

em culturas de *Escherichia coli* também aumenta o acúmulo de polímero. Nossos resultados com a suplementação de ácido oleico também são semelhantes aos obtidos por Marangoni et al. (2000), que obtiveram um aumento de 10% na produção do polímero na cultura suplementada. Todavia, os resultados apresentados por estes autores mostram um acúmulo total de polímero de apenas 28% em 15 horas de fase de produção.

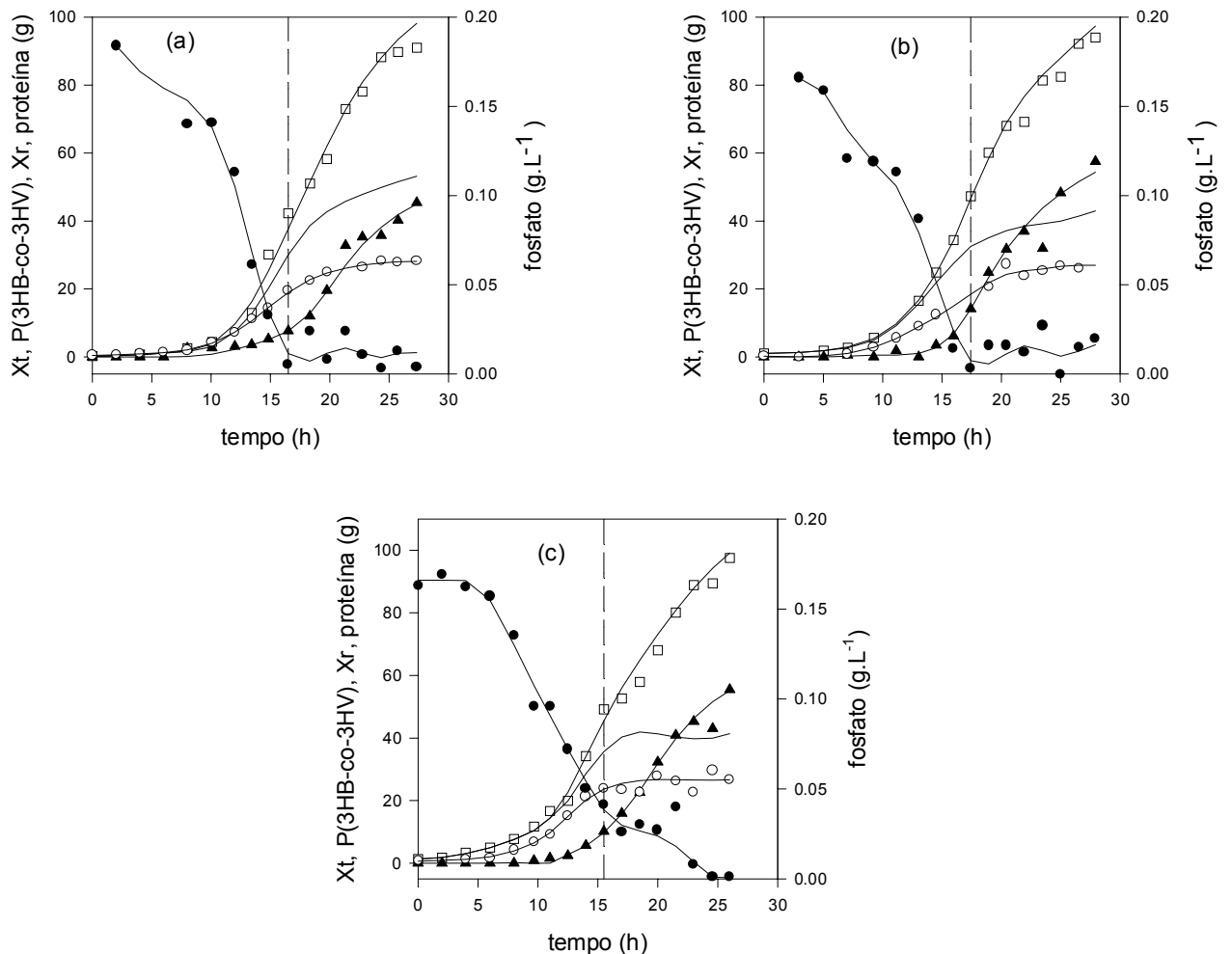


Fig. 1 Evolução da biomassa total (□), P(3HB-co-3HV) (▲), Biomassa residual (—), proteína (O) e fosfato residual (●) em função do tempo para as culturas sem suplementação (a); com suplementação de ácido oleico (b); com suplementação de ácido linoleico/oleico (c). A linha pontilhada indica o início da fase de produção.

Tabela 1: Dados gerais obtidos nas culturas

Cultura ¹	Tempo (h) ²	Xt (g) ³	P(3HB-co-3HV) (g)	Xr (g) ⁴	Proteína (g)	% P(3HB-co-3HV)
A	27,3	98,2	44,5	53,7	28,1	45,4
B	27,9	97,3	54,4	43,0	27,0	55,9
C	26,0	96,5	55,1	41,4	26,7	57,1

¹ A - sem suplementação

B- suplementação de ácido oleico

C- suplementação de ácido linoleico/oleico

² tempo total da cultura

³ biomassa total

⁴ biomassa residual ($X_r = X_t - P(3HB-co-3HV)$)

Efeito dos ácidos graxos na produtividade de P(3HB-co-3HV):

A produtividade média em P(3HB-co-3HV), ao longo de toda a cultura, está ilustrada na Fig. 2. Nesta figura, percebe-se que a cultura suplementada com ácido linoleico/oleico apresenta produtividade em polímero maior durante todo o período, atingindo-se produtividades máximas das culturas sem suplementação, com ácido oleico e com ácido linoleico/oleico de 0,38; 0,48 e 0,53 $\text{g}_{\text{pol.}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente. Os valores obtidos foram superiores aos apresentados por Marangoni et al. (2000), que obtiveram 0,14 e 0,22 $\text{g}_{\text{pol.}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para as culturas sem e com suplementação de ácido oleico, respectivamente.

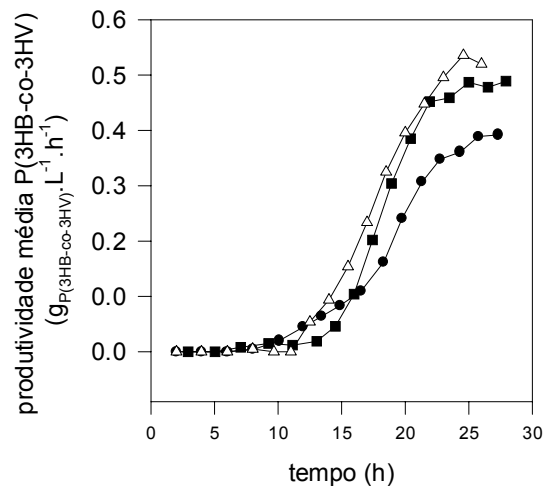


Fig. 2 Produtividade média de P(3HB-co-3HV) ao longo de toda a cultura para as culturas sem suplementação (●), com suplementação de ácido oleico (■) e com suplementação de ácido linoleico/oleico (Δ).

Efeito dos ácidos graxos sobre a composição do polímero:

Embora as culturas suplementadas com os ácidos graxos tenham apresentado valores mais elevados para o acúmulo de polímero, sua composição diferenciou-se da cultura sem suplementação, na quantidade de 3HV formado. Enquanto que na cultura sem suplementação produziu-se um polímero com 6,2 mol% 3HV, na cultura com ácido oleico obteve-se 2,9 mol% 3HV e com ácido linoleico/oleico 3,3 mol% 3HV. Ou seja, a suplementação diminuiu a quantidade de 3HV do polímero. Estudos complementares são necessários a fim de se esclarecer a mudança na composição do polímero e atuar para aumentar o conteúdo de 3HV do polímero acumulado, melhorando suas propriedades físicas.

CONCLUSÕES

O uso dos ácidos graxos oleico e linoleico como suplementos nutricionais nas culturas de *R. etropha* aumentou a produção de P(3HB-co-3HV) em cerca de 11%. A adição da mistura de ácidos linoleico/oleico mostrou-se bom suplemento, tanto quanto o ácido oleico, obtendo-se resultados bastante próximos para as duas culturas. Esses ácidos graxos atuam aumentando a produção de polímero, ocorrendo diminuição da quantidade de 3HV formada. Estudos futuros são necessários para verificar a influência desses ácidos graxos em diferentes concentrações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aragão, G. M. F. (1996), Production de polyhydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures. *Tese de doutorado*, L'Institut National des Sciences appliquées de Toulouse, Toulouse, France.
- Aragão, G. M. F.; Lindley, N. D.; Uribe Larrea, J. L.; Pareilleux, A. (1996), Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology Letters*, v. 18, p. 937-942.
- Byrom, D. (1987), Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Tibtech*, v. 5, p. 246-250.
- Byrom, D. (1992), Production of poly(β -hydroxybutyrate):poly(β -hydroxyvalerate) copolymers. *Microbiol Rev.*, v. 103, p. 247-250.
- Choi, J.; Lee, S. Y. (1999), High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, v. 65, n. 10, p. 4363-4368.
- Dawes, E. A.; Senior, P. J. (1973), The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol*, v. 10, p. 135-266.
- Fukui, T.; Doi, Y. (1998), Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 49, p. 333-336.
- Gomez, J. G. C.; Bueno Netto, C. L. (1997), Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. *Revista Brasileira de Engenharia Química*, v. 17, p. 24-29.
- Marangoni, C.; Furigo Jr. A.; Aragão, G. M. F. (2000), Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 1635-1638.
- Squio, C. R.; Marangoni, C.; De Vecchi, C. S.; Aragão, G. M. F. (2003), Phosphate feeding strategy during production phase improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) storage by *Ralstonia eutropha*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 61, p. 257-260.
- Suzuki, T.; Yamane, T.; Shimizu, S. (1986), Kinetics and effect of nitrogen source feeding on production of poly- β -hydroxybutyric acid by fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 24, p. 366-369.
- Williams, S. F.; Martin, D. P.; Horowitz, D. M.; Peoples, O. P. (1999), PHA applications: addressing the price performance issue I. Tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 25, p. 111-121.

4.3.1.1 Conclusão

O uso da mistura de ácidos linoleico/oleico e oleico aumentou a produção de polímero por *R. eutropha* em até 11%. Os resultados foram bastante próximos para os ácidos graxos indicando que a mistura também é tão bom suplemento nutricional na produção de P(3HB-co-3HV) quanto o ácido oleico.

Os ácidos graxos supra citados fazem parte da composição de muitos óleos vegetais, que são substratos de mais baixo custo que os ácidos graxos puros. Assim, na etapa subsequente foram iniciados estudos verificando a utilização de alguns óleos vegetais como suplementos nutricionais na produção de polímero.

4.3.2 Utilização de óleos vegetais

Continuando na busca de suplementos nutricionais que possam aumentar a produção de polímero e tendo concluído que os ácidos graxos oleico e linoleico podem ser eficientemente utilizados, verificou-se então a utilização de óleos vegetais. Os experimentos foram realizados em frascos agitados com limitação de nitrogênio, uma vez que não há controle de pH e a limitação em fosfato faz com que este baixe mais rapidamente inibindo o crescimento celular. Primeiramente foram estudados os óleos de milho, algodão, oliva, dendê, soja e girassol, adicionados na forma de pulsos no início da fase de produção a fim de se obter o equivalente a 0,3 g ácido oleico.L⁻¹. Dessa forma, a quantidade de óleo adicionada variou de acordo com sua composição em ácido oleico. Neste caso, a fase de produção teve a duração de 5 h e praticamente, nesse tempo, não houve diferença de produção entre as culturas realizadas em duplicata. Assim, decidiu-se optar por alguns dos óleos estudados e realizar as culturas

com um maior tempo de fase de produção para melhor diferenciação do efeito da sua adição. Foram então estudados os óleos de oliva e canola, que possuem alta concentração de ácido oleico e o óleo de girassol que contém alta concentração de ácido linoleico.

O artigo a seguir, intitulado "Produção de poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando óleos vegetais como suplementos nutricionais" apresenta os resultados obtidos, e foi submetido ao VIII Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curitiba, 2003.

PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDROXIVALERATO) POR *RALSTONIA EUTROPHA* UTILIZANDO ÓLEOS VEGETAIS COMO SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS

Cláudia Regina SQUIO, Cíntia Maria Alves FERREIRA, Gláucia Maria Falcão de ARAGÃO^{1*}

RESUMO

A síntese de poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) por *Ralstonia eutropha* DSM 545 utilizando óleos vegetais como suplementos nutricionais foi estudada neste trabalho. Culturas foram realizadas utilizando-se glicose e frutose, propionato de potássio e pulsos de óleos de canola, oliva, girassol e ácido oléico no início da fase de produção. O uso desses óleos aumentou a produção de polímero, sendo que os melhores resultados foram obtidos com os óleos de canola e oliva. Os resultados mostraram que pequenas quantidades de fontes renováveis e de baixo custo como óleos vegetais podem melhorar a produção de polímero, contribuindo para a redução dos custos de produção.

Palavras-chave: biopolímeros; *Ralstonia eutropha*; polihidroxi alcenoatos; óleos vegetais; ácido oleico.

ABSTRACT

The synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* DSM 545 using vegetable oils as nutritional supplement was investigated. Cultures were established using glucose and fructose, potassium propionate and pulse feeding of canola, olive, sunflower oils and oleic acid at the beginning of the production phase. The use of oils improved the polymer production and the best results were obtained with canola and olive oils. The results demonstrated that small quantities of renewable and low cost substrates as vegetable oils could lead to increase polymer production, thus reducing the process cost.

Keywords: biopolymers; *Ralstonia eutropha*; polyhydroxyalkanoates; vegetable oils; oleic acid.

1 INTRODUÇÃO

Polihidroxi alcenoatos (PHA's) são poliésteres biodegradáveis acumulados como reserva de carbono e energia em vários microrganismos sob condições de limitação de algum nutriente essencial (N,P, S, O ou Mg) e na presença de excesso da fonte de carbono [1]. Devido às suas propriedades físicas e mecânicas semelhantes aos plásticos petroquímicos, sua biocompatibilidade e, principalmente, completa biodegradabilidade, estes polímeros têm sido estudados como uma alternativa na minimização do impacto ambiental causado pelos plásticos convencionais [2]. *Ralstonia eutropha* produz um copolímero composto de monômeros 3-hidroxi butirato (3HB) e 3-hidroxi valerato (3HV), que é o poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (P(3-HB-co-3HV)), na presença do co-substrato ácido propiônico. Este copolímero apresenta boas propriedades termoplásticas, o que o torna interessante para aplicações industriais [3]. Apesar da grande possibilidade de utilização dos PHA's, seu uso ainda é limitado devido ao custo elevado em relação aos plásticos petroquímicos. Sendo que aproximadamente 40% dos seus custos de produção estão relacionados ao custo dos substratos [4], torna-se importante o estudo de estratégias envolvendo substratos de baixo custo e aumento de produtividade de polímero, que possam tornar os PHA's mais competitivos. Nesse sentido, pesquisas têm demonstrado que a utilização de ácidos graxos oleico e linoleico como suplementos nutricionais, aumenta a produção de polímero por *R. eutropha* [5,6]. Esse microrganismo incorpora esses ácidos graxos em suas células e metaboliza-os a acetil-CoA pela via da β -oxidação de ácidos graxos. Em seguida, a

^{1*} Programa de pós-graduação em Eng. De Alimentos – UFSC, Caixa Postal 476, CEP 88040-900 Florianópolis – SC, e-mail: glauucia@enq.ufsc.br (autor responsável)

graxos estão presentes, em diferentes concentrações, nos mais diversos óleos vegetais, que são substratos de menor custo. Óleos vegetais utilizados como únicas fontes de carbono na produção de P(3HB) por *R. eutropha*, levaram a um grande acúmulo de polímero [7]. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência da utilização dos óleos vegetais oliva, canola e girassol, como suplementos nutricionais, sobre a produção de P(3-HB-co-3HV) por *Ralstonia eutropha*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMO E MEIOS DE CULTURA

Ralstonia eutropha DSM 545 foi o microrganismo utilizado. O meio de cultura caldo nutriente (NB) foi utilizado para a manutenção e para a primeira pré-cultura com a composição de 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne e 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne. A composição do meio utilizado na segunda pré-cultura, foi descrita por Aragão et al.[8]. Após autoclavado o meio de cultura acima citado, uma solução estéril de fosfato foi assepticamente adicionada ao meio para obtenção de uma concentração final de 8,5 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄.12H₂O e 1,5 g.L⁻¹ de KH₂PO₄. Da mesma maneira, a fonte de carbono (glicose e frutose (1:1)) foi adicionada de forma a obter uma concentração inicial de 30 g.L⁻¹. Para a realização da cultura, utilizou-se o mesmo meio acima, porém com concentração final limitada de nitrogênio de 2,3 g.L⁻¹. Para a produção do copolímero, um pulso de propionato de potássio foi adicionado, no início da fase de produção, a fim de se obter uma concentração de 1 g propionato L⁻¹ no meio.

2.2 CONDIÇÕES DE CULTURA

As culturas foram realizadas em frascos aletados agitados de 1000 mL contendo 300 mL de meio, a 150 rpm e 30°C. O meio de cultura foi inoculado com 10% (v/v) da segunda pré-cultura. O início da fase de produção foi determinado através da concentração de biomassa (analisada pela absorbância) que indicou a limitação de nitrogênio em culturas anteriores.

2.3 ADIÇÃO DOS ÓLEOS

No início da fase de produção, um pulso de cada óleo selecionado foi adicionado a fim de se obter uma concentração equivalente a 0,3 g ácido oleico. L⁻¹ no meio, já utilizada em outros estudos [5,6]. Dessa forma, a quantidade de óleo adicionada variou com o conteúdo de ácido oleico de cada óleo, e está apresentada na Tabela 1.

TABELA 1 – CONCENTRAÇÃO DE ÓLEOS ADICIONADAS

Substrato	% de ácido oleico ¹	Conc. óleo no meio (g/L)
Ácido oleico	100	0,3
Azeite de oliva	71,2	0,41
Óleo de canola	63,2	0,47
Óleo de girassol	42,7	1,21

¹ DE ACORDO COM ANÁLISE REALIZADA NO LABORATÓRIO DE QUÍMICA DA UFSC.

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

Biomassa: a concentração celular foi determinada por absorbância a 600 nm e por gravimetria conforme descrito por Marangoni et al. [5].

Açúcar: a dosagem de açúcar foi feita pelo método do ácido 3-5-dinitrosalicílico (DNS), que determina a concentração de açúcares redutores.

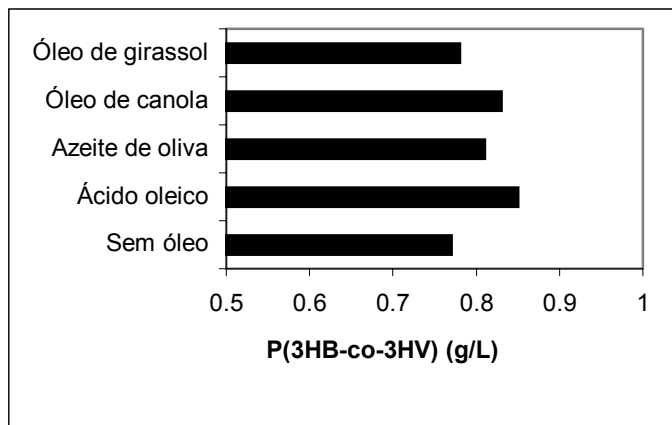
P(3HB-co-3HV): amostras do meio de cultura (2mL) foram centrifugadas e os precipitados lavados duas vezes com água destilada e congelados para posterior análise, para a qual

foram preparados conforme descrito por Aragão et al. [8]. Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (Sigma) de origem natural com um teor definido (12%) de 3HV foi usado como padrão externo. Os metil-ésteres resultantes da reação de metanólise foram quantificados pela injeção de 0,2 μL em cromatógrafo a gás (CG-90) equipado com uma coluna de sílica fundida (Supercowax-10 - 0,53 mm x 30 m). As temperaturas de injeção, detecção e coluna utilizadas foram 185, 230 e 110 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de polímero por *R. eutropha* é realizada em duas fases, sendo uma fase inicial de crescimento não limitado, seguido da fase limitada com o acúmulo de polímero. A fase inicial de crescimento exponencial para as culturas estudadas teve a duração de 10 h. No momento da limitação, ou seja, da exaustão do nitrogênio, tinha-se uma biomassa de cerca de 3,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ igualmente para todas as culturas. Após a limitação, iniciou-se a fase de produção que teve a duração de 22 h. O comportamento cinético das culturas foi semelhante durante o crescimento exponencial, apresentando velocidade específica de crescimento (μ) de 0,2 h^{-1} . Todavia, durante a fase de produção, as culturas suplementadas com óleos apresentaram um aumento maior de absorvância do que a suplementada com ácido oleico e sem suplementação. Os valores de peso seco obtidos também foram superiores, porém sofrendo influência do óleo adicionado. Dessa forma, como as culturas apresentavam igual comportamento no início da fase de produção, fez-se a comparação dos resultados apenas em relação à concentração de polímero produzida em cada cultura. Os resultados de concentração de P(3HB-co-3HV) obtidos estão apresentados na Figura 1.

FIGURA 1 – CONCENTRAÇÃO DE P(3HB-C0-3-HV) OBTIDA NAS DIVERSAS CULTURAS



De acordo com esses resultados, a suplementação com ácido oleico puro foi a que levou à maior concentração de polímero, cerca de 10% a mais do que sem suplementação, conferindo com os resultados obtidos com ácido oleico em outros estudos [5,6]. Da mesma forma, os óleos vegetais também levam a um aumento de produção de polímero, diferentes para cada óleo, porém menores do que o aumento proporcionado pelo ácido oleico. Os óleos de canola e oliva, que contêm maiores concentrações de ácido oleico, apresentaram os maiores acúmulos, representando um aumento de 8 e 6%, respectivamente, em relação à cultura sem suplementação. Por outro lado, o óleo de girassol, que contém maior concentração de ácido linoleico, praticamente não proporcionou aumento de produção, ao contrário do que se esperava, uma vez que o ácido linoleico já se mostrou tão bom suplemento nutricional para produção de polímero quanto o ácido oleico [6]. Assim, outros constituintes do óleo podem estar interferindo na produção de polímero, ou favorecendo apenas o crescimento celular, já que essa foi a cultura onde se obteve maior peso seco. Quanto à incorporação de unidades 3HV, todas as culturas apresentaram conteúdos similares, em torno de 11% do polímero acumulado. Desta forma, os óleos de canola e oliva,

que são substratos de mais baixo custo que o ácido oleico, apresentaram um razoável aumento de produção, sendo que maiores estudos poderão determinar quais as melhores condições e inclusive concentrações de suplementação que levem ao aumento ainda maior da produção.

4 CONCLUSÃO

O uso de óleos vegetais como suplementos nutricionais na produção de PHA's por *R. eutropha* leva a um aumento da produção de polímero. As melhores alternativas de substituição do ácido oleico são os óleos de canola e oliva. Os óleos vegetais, renováveis e de mais baixo custo, representam assim grande potencial de aplicação e sua utilização, mesmo em pequenas quantidades, leva a um aumento de produtividade, contribuindo para a redução dos custos de produção.

REFERÊNCIAS

- [1] DAWES, E. A.; SENIOR, P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Adv. Microbiol. Physiol**, v. 10, p. 135-266, 1973.
- [2] GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 17, p. 24-29, 1997.
- [3] BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Tibtech**, v. 5, p. 246-250, 1987.
- [4] CHOI, J.; LEE, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 51, p. 13-21, 1999.
- [5] MARANGONI, C.; FURIGO JR., A.; ARAGÃO, G. M. F. Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1635-1638, 2000.
- [6] SQUIO, C. R.; FERREIRA, C. M.; ARAGÃO, G. M. F. Utilização de ácidos linoleico e oleico como suplementos nutricionais aumenta a produção de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha*. In.: Simpósio Nacional de Fermentações, XIV, 2003, Florianópolis. Artigo aceito - a ser publicado nos anais do congresso.
- [7] FUKUI, T. e DOI, Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. **Applied Microbiol Biotechnol.**, v. 49, p. 333-336, 1998.
- [8] ARAGÃO, G. M. F.; LINDLEY, N. D.; URIBELARREA, J. L.; PAREILLEUX, A. Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 937-942, 1996.

4.3.2.1 Conclusão

Estes estudos mostraram que os óleos de canola e oliva podem aumentar a produção de polímero por *R. eutropha*. Embora tenham proporcionado um aumento de produção menor do que o obtido com o ácido oleico puro, são interessantes para aplicação em vista de seu menor custo.

A partir deste estudo, faz-se necessária a realização de culturas em biorreator para obtenção de maiores informações e dados cinéticos. Além disso, outros óleos vegetais e outras concentrações também podem ser testados.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO P(3HB-*co*-3HV) PRODUZIDO

4.4.1 CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL(DSC)

Estão apresentados a seguir os resultados referentes à caracterização do polímero P(3HB-*co*-3HV) obtido em uma cultura realizada neste estudo (mantendo-se r_x de $0,04 \text{ gXr.L}^{-1}\text{h}^{-1}$) e extraído ao final do processo, conforme item 3.5.1.

A Figura 4.1 apresenta as curvas obtidas nas análises de calorimetria de varredura diferencial (DSC) para o polímero recuperado e para os padrões adquiridos da SIGMA-ALDRICH de P(3HB) e P(3HB-*co*-3HV) com 12% de 3-hidroxivalerato.

Os resultados mostram que o polímero obtido neste estudo tem características bem próximas ao copolímero industrial. Apresenta temperatura de transição vítrea (T_g) de $-3,7^{\circ}\text{C}$ e temperatura de cristalização (T_c) igual a $53,79^{\circ}\text{C}$. A temperatura de fusão foi mais alta para o copolímero experimental (165°C), do que para o copolímero industrial (161°C). Como o polímero experimental possui 6,5 % de 3HV e o copolímero industrial possui 12 % de 3HV, este resultado está de acordo com Lee (1996a), que considera que a temperatura de fusão diminui com o aumento da quantidade de 3HV incorporada ao polímero.

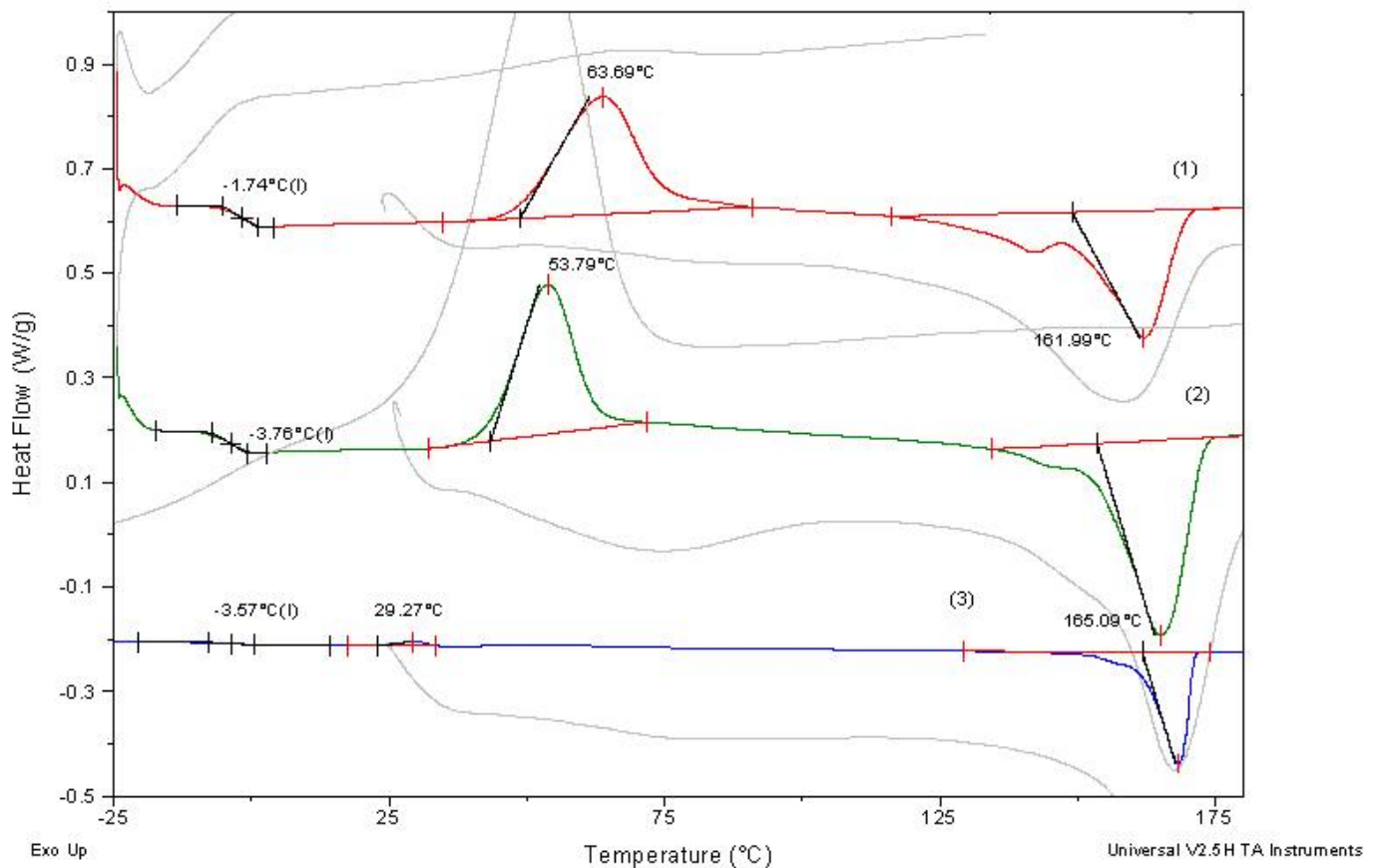


FIGURA 4.1 CURVA OBTIDA PARA ANÁLISE DE DSC PARA AMOSTRA DE P(3HB-CO-3HV) INDUSTRIAL (1), P(3HB-CO-3HV) EXPERIMENTAL (2) E P(3HB) INDUSTRIAL (3).

4.4.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FTIR)

O espectro de FTIR (Figura 4.2) demonstra que o polímero sintetizado apresenta bandas características do P(3-HB), tais como as das deformações axiais da carbonila (C=O) a 1737 cm^{-1} , de O-H a 3438 cm^{-1} e de C-C a 978 cm^{-1} , além da banda de deformação angular simétrica no plano dos grupos CH_3 em 1380 cm^{-1} e a banda típica da conformação helicoidal das cadeias a 1227 cm^{-1} . As bandas a 1134 e 1187 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, aos estiramentos simétrico e assimétrico do grupo C-O-C (XU et al., 2002).

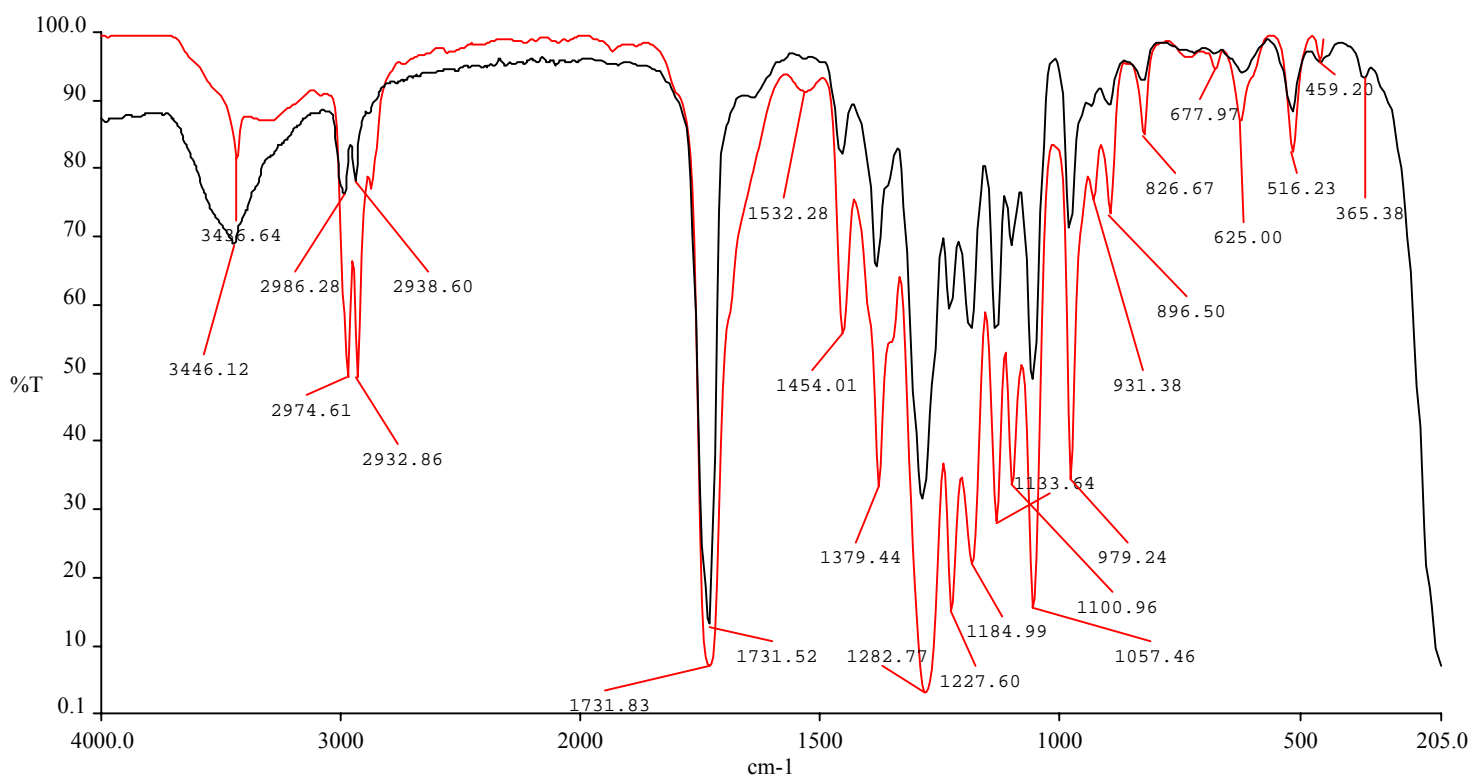


FIGURA 4.2 FTIR DO P(3HB-co-3HV) EXPERIMENTAL (VERMELHO) E DE P(3HB) (PRETO) CUJOS DADOS SÃO PROVENIENTES DA LIBRARY PERKIN ELMER

CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

CAPÍTULO V - CONCLUSÕES E SUGESTÕES

O objetivo deste trabalho foi estudar diferentes estratégias de alimentação na fase de produção de P(3HB-co-3HV) por *R. eutropha*, a fim de se obter aumento de produção de polímero. Estudou-se a alimentação de fosfato na fase de produção, o uso do potencial redox como instrumento de indicação da limitação da cultura e o uso de suplementos nutricionais como o ácido oleico, linoleico e óleos vegetais de oliva, canola e girassol. Por fim, realizou-se a caracterização do polímero obtido.

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- Pequenas razões de alimentação de fosfato em culturas de *R. eutropha* aumentam a produção de polímero e que a melhor velocidade de produção de biomassa residual (r_x) a ser mantida é de $0,02 \text{ gXr.L}^{-1}\text{h}^{-1}$. Razões maiores de alimentação levam a um grande crescimento residual e de proteínas, desfavorecendo o acúmulo de polímero.
- O potencial redox identifica mudanças metabólicas em culturas de *R. eutropha* e seu ponto mínimo é um preciso indicativo do início da fase de produção de P(3HB-co-3HV).
- Considerar que a limitação em fosfato ocorre quando este é menor que $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ no meio, conforme assumido em estudos anteriores em nosso laboratório, não é uma opção correta, uma vez que se demonstrou neste estudo que quando a cultura realmente está em limitação, a concentração de fosfato é muito próxima a 0 g.L^{-1} , ou seja, exaustão completa.
- O uso dos ácidos linoleico e oleico aumenta a produção de polímero por *R.*

eutropha em até 11%, indicando que o ácido linoleico também é um bom suplemento nutricional na produção de P(3HB-co-3HV).

- Os óleos de canola e oliva, que contêm, respectivamente, 63,2 e 71,2 % de ácido oleico, aumentam a produção de polímero por *R. eutropha*.
- As propriedades térmicas do copolímero obtido experimentalmente são bem próximas às do copolímero industrial, com temperatura de fusão um pouco maior, uma vez que possui menor quantidade de 3HV.

Baseado nos resultados apresentados é possível fazer algumas sugestões de estudo:

- Estudar a influência de diferentes concentrações de ácidos graxos e óleos vegetais sobre a produção de polímero;
- Comparar o comportamento do potencial redox com o do oxigênio dissolvido;
- Testar a utilização de óleos vegetais de soja, arroz e dendê, que também possuem quantidades razoáveis de ácido oleico;
- Verificar a produção de monômeros 3HV utilizando alimentação de propionato de potássio e/ou ácido propiônico em forma de pulsos, durante a fase de produção, e comparar com os resultados obtidos com alimentação contínua de ácido propiônico neste estudo.

CAPÍTULO VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO IV - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMPE, F. **Métabolism du benzoate chez *Alcaligenes eutrophus*: quels mécanismes physiologiques régulent la biodégradation des composés aromatiques?** . 1995. 237p. These (Doctorat spécialité: Microbiologie – Biotechnologie) – L'Institut National des Sciences appliquées de Toulouse, Toulouse.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological reviews**, v. 54, n. 4, p. 450-472, 1990.

ANDRADE RODRIGUES, M. F.; VALENTIN, H. E.; BERGER, P. A.; TRAN, M.; ASRAR, J.; GRUYS, K. J.; STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoate accumulation in *Burkholderia* sp.: a molecular approach to elucidate the genes involved in the formation of two homopolymers consisting of short-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 453-460, 2000.

ARAGÃO, G. M. F. **Production de polyhydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures.** 1996. 162p. These (Doctorat spécialité: Biologie et génétique Moléculaires et Cellulaires – Biotechnologie) – L'Institut National des Sciences appliquées de Toulouse, Toulouse.

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

ASENJO, J. A.; SCHMIDT, A. S.; ANDERSON, P. R.; ANDREWS, B. A.; Effect of single nutrient limitation on Poly- β -hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnol. And Bioeng.**, v. 46, p. 497-502, 1995.

BAGRAMYAN, K.; GALSTYAN, A.; TRCHOUNIAN, A. Redox potential is a determinant in the *Escherichia coli* anaerobic fermentative growth and survival: effects of impermeable oxidant. **Bioelectrochemistry**, v. 51, p. 151-156, 2000.

BITAR, A. e UNDERHILL, S. Effect of ammonium supplementation on production of poly- β -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in batch culture. **Biotechnology Letters**, v. 12, p. 563-568, 1990.

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

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1977-1982, 1988.

BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R.M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 6, p. 29-37, 1978.

- BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **TIBTECH**, v. 5, p. 246-250, 1987.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. **Biotechnol Bioengineering**, v. 62, p. 546-553, 1999a.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 51, p. 13-21, 1999b.
- CHOI, J. e LEE, S.Y. High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4363-4368, 1999c.
- DAWES, E.A.; SENIOR, P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Adv. Microbiol Physiol**, v. 10, p. 135-266, 1973.
- DOI, Y.; KAWAGUCHI, Y.; KIM, J. H.; LEBEAULT, J. M. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiol. Reviews**, v. 103, p. 103-108, 1992.
- DOI, Y.; KUNIOKA, M.; NAKAMURA, Y.; SOGA, K. Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from ¹³C-labeled acetate and propionate. **Macromolecules**, v. 20, p. 2988-2991, 1987.
- DOI, Y.; SEGAWA, A.; KAWAGUCHI, Y.; KUNIOKA, M. Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 67, p. 165-170, 1990.
- FAVA, A. L. B. **Clonagem e expressão do regulon-scr em *Alcaligenes eutrophus* visando a produção de poli-hidroxibutirato a partir de sacarose.** 1997. 101p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- FINKLER, L. **Utilização do potencial de óxido-redução para o monitoramento de culturas de *Ralstonia eutropha* visando a produção de polihidroxibutirato.** 2002. 78 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- FUKUI, T. e DOI, Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. **Applied Microbiol Biotechnol.**, v. 49, p. 333-336, 1998.
- GOMEZ, J.G.C. **Produção por *Pseudomonas* sp de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes.** 2000. 155f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 17, p. 24-29, 1997.
- GOMEZ, J. G. C.; FONTOLAN, V.; ALLI, R. C. P.; RODRIGUES, M. F. A.; BUENO NETTO, C. L.; SILVA, L. F.; SIMÕES, D. A. Production of P3HB-co-3HV by soil isolated bacteria able to use sucrose. **Rev Microbiol**, v. 28, p. 43-48, 1997.

- HAHN, S. K.; CHANG, Y. K.; KIM, B. S.; CHANG, H. N. Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 256-261, 1994.
- HÄNGGI, U. J. Requirements on bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumer goods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, p. 213-220, 1995.
- HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A. J.; EWING, D. F.; DAWES, E. A. Accumulation of a polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas* sp. Strain NCIMB 40135. **Applied Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 3354-3359, 1990.
- HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A. J.; CHU, L. et al. Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 52, p. 92-96, 1988a.
- HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A. J.; CHU, L.; DAWES, E. A. The role of NADH- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 52, p. 259-264, 1988b.
- HOLMES, P. A. Applications of PHB – A microbially produced biodegradable thermoplastic. **Phys. Technol.**, v. 16, p. 32-36, 1985.
- HUIJBERTS, G. N. M.; EGGINK, G.; WAARD, P.; HUISMAN, G. W.; WITHOLT, B. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. **Applied Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 536-544, 1992.
- JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H. G. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 46, p. 451-463, 1996.
- KESSLER, B.; WEUSTHUIS, R.; WITHOLT, B.; EGGINK, G. Production of microbial polyesters: Fermentation and Downstream processes. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 71, p. 159-182, 2001.
- KESSLER, B.; WITHOLT, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 97-104, 2001.
- KOYAMA, N.; DOI, Y. Continuous production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 281-284, 1995.
- KWONG, S. C. W.; RAO, G. Utility of culture redox potential for identifying metabolic state changes in amino acid fermentation. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 38, p. 1034-1040, 1991.
- LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 1-14, 1996a.
- LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Tibtech**, v. 14, p. 431-438, 1996b.
- LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Production of poly(hydroxyalkanoic acid). **Advances in Biochemical Engineering**, v. 52, p. 27-57, 1995.
- LEE, S. Y.; CHOI, J. Production of microbial polyester by fermentation of recombinant microorganisms. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 71, p. 183-207, 2001.

LEE, T. H.; CHANG, Y.K.; CHUNG, B. H.; PARK, Y. H. Correlation of redox potential with state variables in cultures under controlled dissolved oxygen concentration and pH. **Biotechnology Progress**, v. 14, p. 959-962, 1998.

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

LEE, S. Y.; KIM, G. J.; CHOI, D. K.; YEON, B. K.; PARK, Y. H. Improvement of hydroxyvalerate fraction in poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, p. 255-258, 1996.

LEE, S. Y.; LEE, K. M.; CHANG, H. N.; STEINBÜCHEL, A. Comparison of recombinant *Escherichia coli* strains for synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) and morphological changes. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 44, p. 1337-1347, 1994.

LUZIER, W. D. Materials derived from biomass biodegradable materials. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 89, p. 839-842, 1992.

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

MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substratos de baixo custo e ácido propiônico**. 2000. 191p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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

MARTINÉZ, P.; GUZMÁN, J.; ESPÍN, G. A mutation impairing alginate production increased accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Azotobacter vinelandii*. **Biotechnol. Letters**, v. 19, p. 909-912, 1997.

MATEOS, S.B. Plástico biodegradável terá produção industrial. **O Estado de SP**, São Paulo, 14 de fevereiro de 2000. Disponível em: <http://www.cepen.com.br/reper_2000-02.htm> Acesso em: 10 de junho de 2001.

MERGAERT, J.; WEBB, A.; ANDERSON, C.; WOUTERS, A.; SWINGS, J. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 3233-3238, 1993.

METABOLIX, Inc. Apresenta informações sobre a companhia, seus produtos e pesquisas. Disponível em: <<http://www.metabolix.com>>. Acesso em: 25 de outubro de 2001.

MILLER, G. L. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOLITORIS, H. P.; MOSS, S. T.; KONING, G. J. M.; JENDROSSEK, D. Scanning electron microscopy of polyhydroxyalkanoate degradation by bacteria. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 40, p. 570-579, 1996.

OEDING, V.; SCHLEGEL, H. G. β -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. **Biochem. J.**, v. 134, p. 239-248, 1973.

PINTO, R. O. **Produção de poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)) por *Ralstonia eutropha* em substrato de baixo custo: estudo de diferentes estratégias de limitação de crescimento.** 1999. 106p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

POIRIER, Y.; DENNIS, D. E.; KLOMPARENS, K.; SOMEVILLE, C. Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. **Science**, v. 256, p. 520-523, 1992.

RAMSAY, B.A. Physiological factor affecting PHA production. Physiology, kinetics, production and use of biopolymers (Proceedings) p. 9-17, Austria, 1994.

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

REPASKE, R. Nutritional requirements for *Hydrogemonas eutropha*. **J. Bacteriol.**, v. 83, p. 418-422, 1962.

ROSSEL, C. E. V. **Pioneirismo brasileiro na produção de plástico biodegradável.** Notícias e Reportagem – Neo Ambiental. Entrevista concedida a Tiago da Rocha Karniol. Disponível em: <http://www.neoambiental.com.br/html/noticias_reportagem/html>. Acesso em 10 de junho de 2001.

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, p. 28-32, 1997.

SANTOS, Y. S. Pesquisa é insumo da indústria. **Notícias FIESP/CIESP**, 01 de abril de 2002. Disponível em: <<http://www.ipt.br/imprensa/midia/?ID=260>>. Acesso em: novembro de 2002.

SARTORI, D. M. **Obtenção de um mutante de *Alcaligenes eutrophus* melhorado geneticamente para a produção do co-polímero polihidroxibutirato-polihidroxivalerato (PHB-PHV).** 1998. 78p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SAVENKOVA, L.; GERBERGA, Z.; BIBERS, I.; KALNIN, M. Effect of 3-hydroxy valerate content on some physical and mechanical properties of polyhydroxyalkanoates produced by *Azotobacter chroococcum*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 445-450, 2000.

SENIOR, P. J.; DAWES, E. A. PHA-biosynthesis and regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Biochem. J.**, v. 134, p. 225-238, 1971a.

SENIOR, P. J.; DAWES, E. A. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Biochem. J.**, v. 125, p. 55-66, 1971b.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; TORRES, B. B. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate (P3HB-*co*-3HV) production by *Burkholderia* sp. **Journal of Biotechnology**, v. 76, p. 165-174, 2000.

SOTERO, A. P. Plásticos biodegradáveis trazem melhoria ambiental. **NewsLetter**, agosto de 2000. Disponível em: <<http://www.uniemp.br/labjor/newsagosto2000.htm>>. Acesso em: 10 de junho de 2001.

SQUIO, C. R.; MARANGONI, C.; DE VECCHI, C. S.; ARAGÃO, G. M. F. Phosphate feeding strategy during production phase improves poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-

hydroxyvalerate) storage by *Ralstonia eutropha*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 61, p. 257-260, 2003.

STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Tibtech**, v. 16, p. 419-427, 1998.

STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H. G. Physiology and molecular genetics of poly (β -hydroxyalkanoic acid). Synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 535-542, 1991.

STICKLAND, L. H. The determination of small quantities of bacteria by means of the Biuret reaction. **J. Gen. Microbiol.**, v. 5, p. 689-703, 1951.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Prog. Polym. Sci.**, v. 25, p. 1503-1555, 2000.

SUZUKI, T.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Kinetics and effect of nitrogen source feeding on production of poly- β -hydroxybutyric acid by fed-batch culture. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 24, p. 366-369, 1986.

TANAKA, K.; ISHIZAKI, A.; KANAMARU, T.; KAWANO, T. Production of poly-(D-3-hydroxybutyrate) from CO₂, H₂ and O₂ by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 45, p. 268-275, 1994.

THOMPSON, B. G.; GERSON, D. F. Electrochemical control of redox potential in batch cultures of *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 27, p. 1512-1515, 1985.

TIM, A.; STEINBÜCHEL, A. Formation of polyester consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent *Pseudomonas*. **Applied and Environ. Microbiol.** v. 56, n. 11, p. 3360-3367, 1990.

VASCONCELOS, Y. Plástico de açúcar. **Revista Pesquisa FAPESP**, São Paulo. Disponível em:
<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/show.php?id=revistas1.fapesp1..20021001.20021080..SEC7_4>. Acesso em: novembro de 2002.

VIVEIROS, M. Bagaço vira plástico biodegradável. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 02 de novembro de 2002. Disponível em:<<http://www.ipt.br/imprensa/midia/?ID=962>>. Acesso em novembro de 2002.

WANG, F.; LEE, S. Y. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3703-3706, 1997.

WILLIAMS, S. F.; MARTIN, D. P.; HOROWITZ, D. M.; PEOPLES, O. P. PHA applications: addressing the price performance issue I. Tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 111-121, 1999.

YAMANE, T. Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: A theoretical study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 165-170, 1993.

XU, J., GUO, B.H., YANG, R., WU, Q., CHEN, G.Q., ZHANG, Z.M., **Polymer**, v.43, p. 6893-6899, 2002.

ANEXOS

ANEXO I - CURVAS PADRÃO

Estão apresentadas a seguir as curvas padrão citadas no capítulo Material e Métodos.

A Figura A1 apresenta a curva padrão entre absorvância e biomassa para *Ralstonia eutropha* em glicose/frutose. A Figura A2 apresenta um exemplo de curva padrão de determinação da concentração de açúcares redutores pelo método do ácido 3-5-dinitrosalicílico (DNS). A Figura A3 ilustra uma curva padrão de determinação da concentração de proteínas pelo método de Biureto e a Figura A4 demonstra uma curva padrão de determinação de P(3HB-co-3HV) por cromatografia gasosa, utilizando-se ácido benzóico como padrão interno.

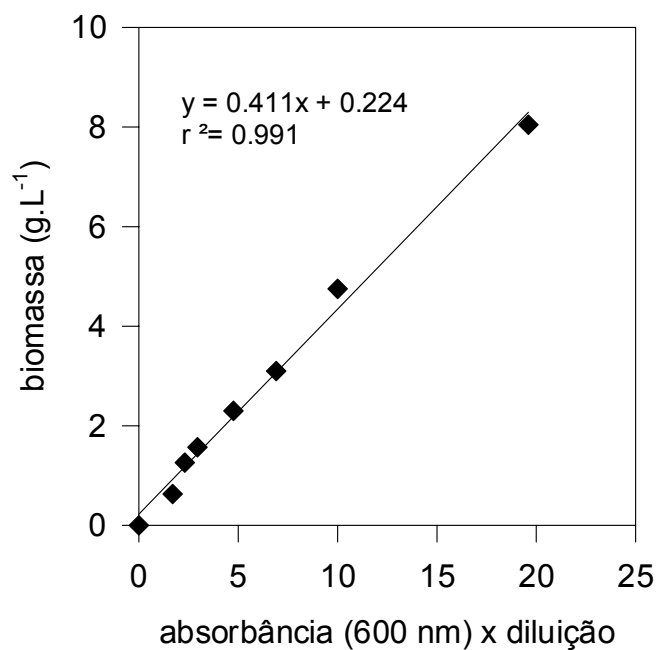


FIGURA A1: CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR A PARTIR DA ABSORBÂNCIA

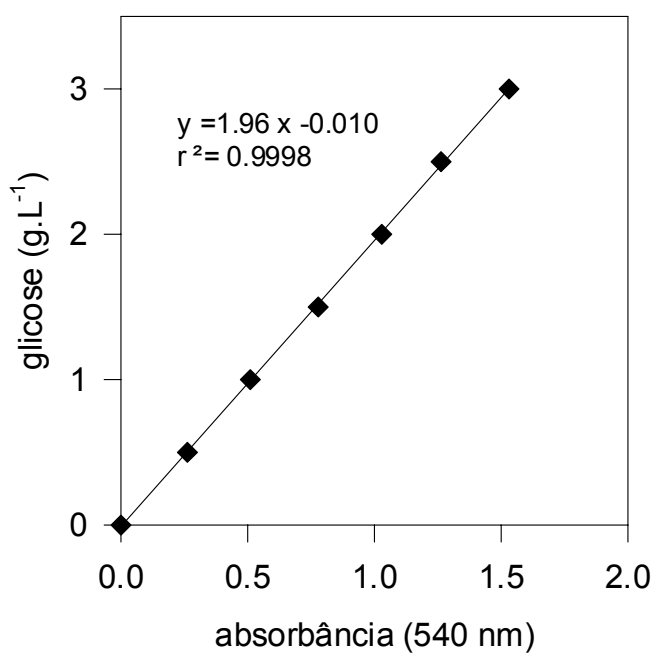


FIGURA A2: CURVA PADRÃO DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES PELO MÉTODO DO ÁCIDO 3-5-DINITROSALICÍLICO (DNS)

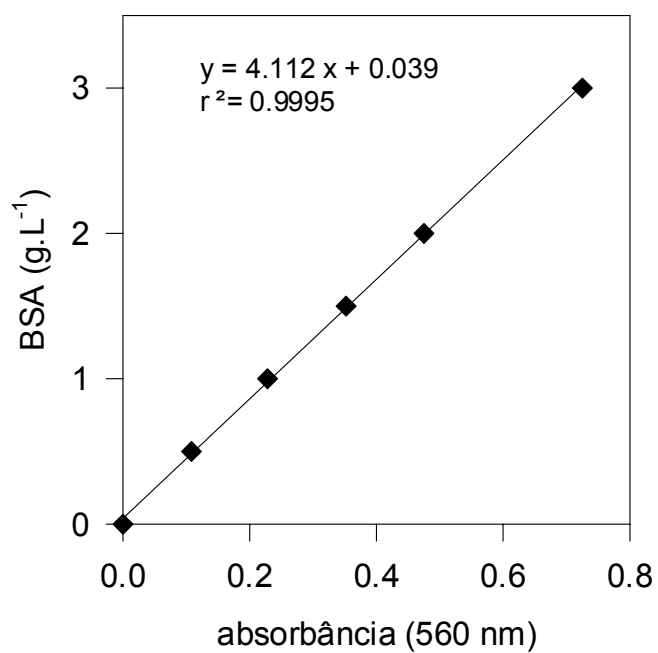


FIGURA A3: CURVA PADRÃO DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BIURETO, UTILIZANDO-SE ALBUMINA BOVINA COMO PADRÃO

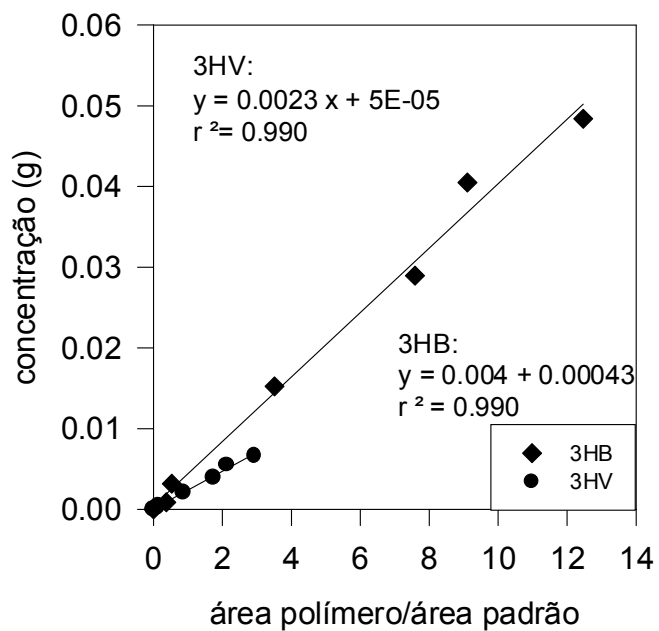


FIGURA A4: CURVA PADRÃO DE DETERMINAÇÃO DE P(3HB-CO-3HV), UTILIZANDO-SE ÁCIDO BENZÓICO COMO PADRÃO INTERNO

ANEXO II - RESULTADOS EXPERIMENTAIS - BIORREATOR

Estão apresentados a seguir os resultados das culturas realizadas em biorreator neste estudo. As Figuras A5 (A à F) apresentam a evolução da biomassa total e residual, polímero, proteína e consumo de substrato ao longo das culturas.

A Figura A5(A, B e C) representam as culturas em carência de fosfato com r_x 0.00 gXr.L⁻¹h⁻¹ e com alimentação de fosfato mantendo r_x de 0,02 e 0,04 gXr.L⁻¹h⁻¹, respectivamente. A Figura A5(D) é referente à cultura cuja limitação foi determinada pelo potencial redox. As Figuras A5(E e F) representam a cultura com suplementação de ácido oleico e com suplementação da mistura de ácidos linoleico/oleico, respectivamente.

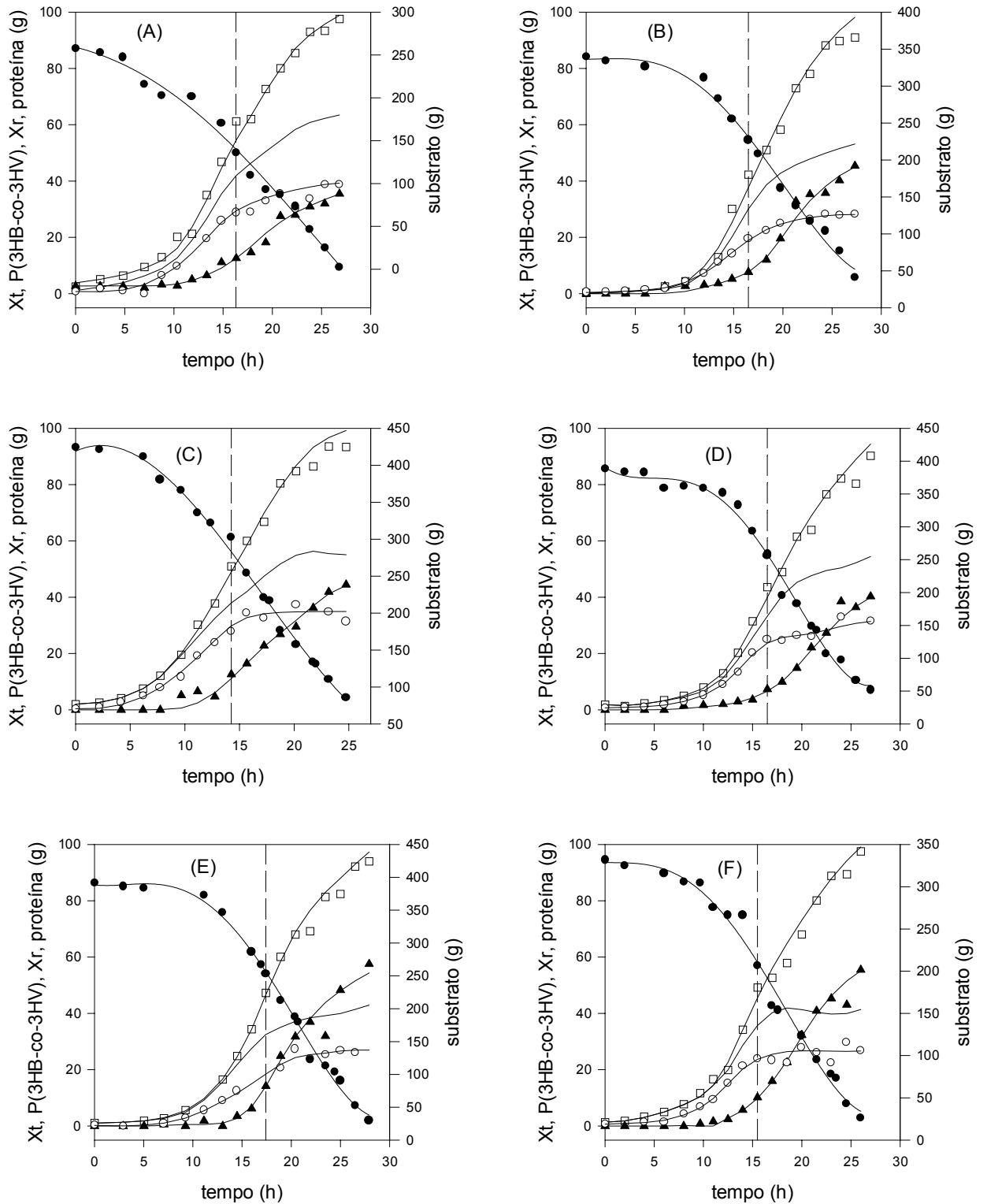


FIGURA A5: EVOLUÇÃO DA BIOMASSA TOTAL (□), P(3HB-CO-3HV) (▲); BIOMASSA RESIDUAL (—); PROTEÍNA (○) E CONSUMO DE SUBSTRATO (●) PARA AS CULTURAS EM BIORREATOR. (A) - r_x 0,00 $\text{gXr.L}^{-1}\text{h}^{-1}$; (B) - r_x 0,02 $\text{gXr.L}^{-1}\text{h}^{-1}$; (C) - r_x 0,04 $\text{gXr.L}^{-1}\text{h}^{-1}$; (D) – limitação determinada pelo potencial redox; (E) - suplementação de ácido oleico; (F) - suplementação de ácidos linoleico/oleico. A linha pontilhada indica o momento da limitação.

As Figuras A6 (A à D) mostram o comportamento da biomassa residual, expressa em \ln , do potencial redox e do fosfato residual.

As Figuras A6 (A e B) representam as culturas com alimentação de fosfato mantendo r_x de 0,02 e 0,04 $\text{gXr.L}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente. A Figura A6(C) é referente à cultura cuja limitação foi determinada pelo potencial redox e a Figura A6(D) representa a cultura com suplementação de ácido oleico.

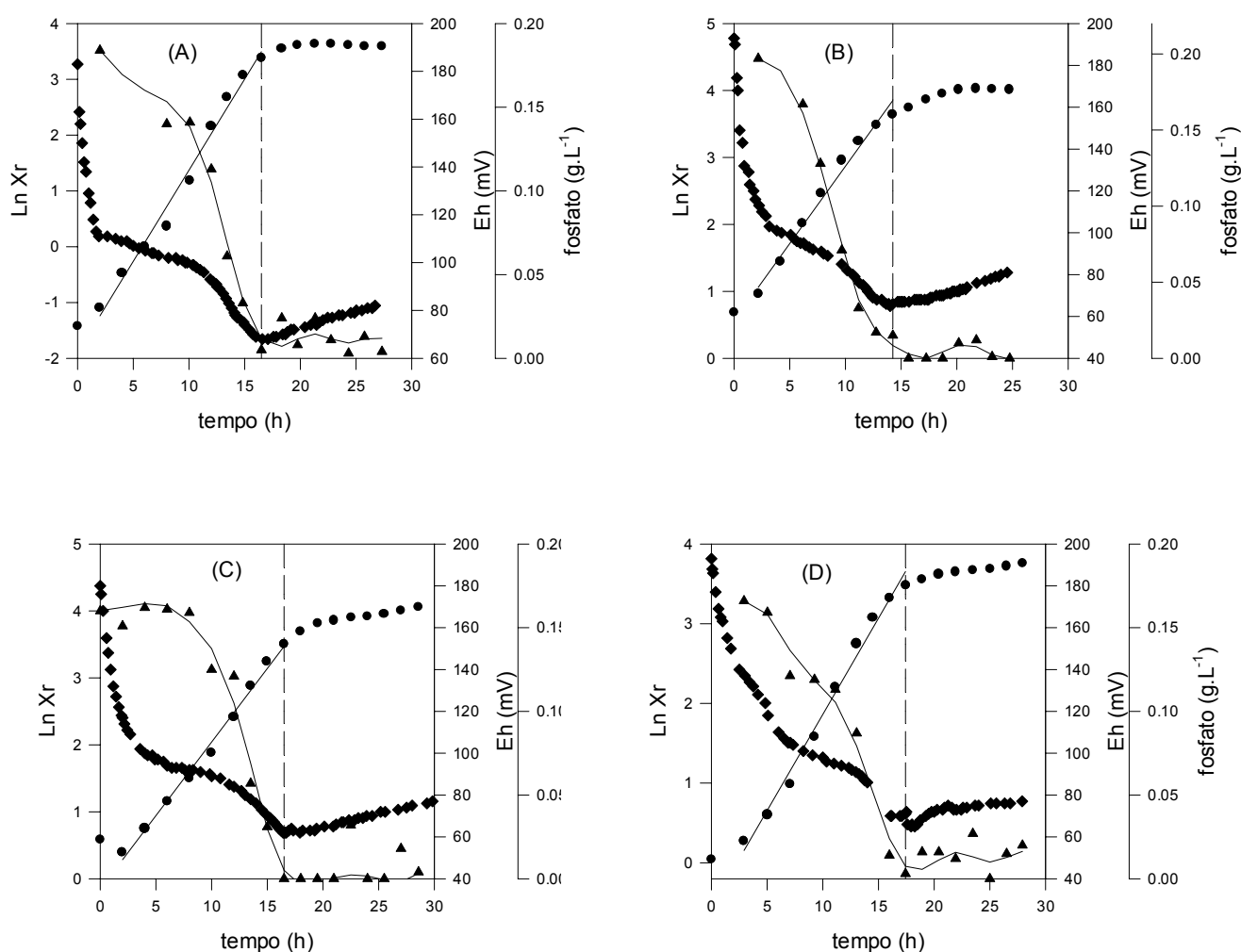


FIGURA A6: EVOLUÇÃO DA BIOMASSA RESIDUAL, EM LN (●), POTENCIAL REDOX (◆) E FOSFATO RESIDUAL (▲) PARA AS CULTURAS EM BIORREATOR.

(A) - r_x 0,02; (B) - r_x 0,04 ; (C) - monitoramento do potencial redox; (D) - suplementação de ácido oleico. A linha pontilhada indica o momento da limitação.

ANEXO III - RESULTADOS EXPERIMENTAIS - FRASCOS AGITADOS

Estão apresentados a seguir os resultados das culturas realizadas em frascos agitados, com suplementação de óleos vegetais, conforme item 4.3.2.

A Figura A7 apresenta o comportamento da absorbância, expressa em \ln , para os experimentos realizados.

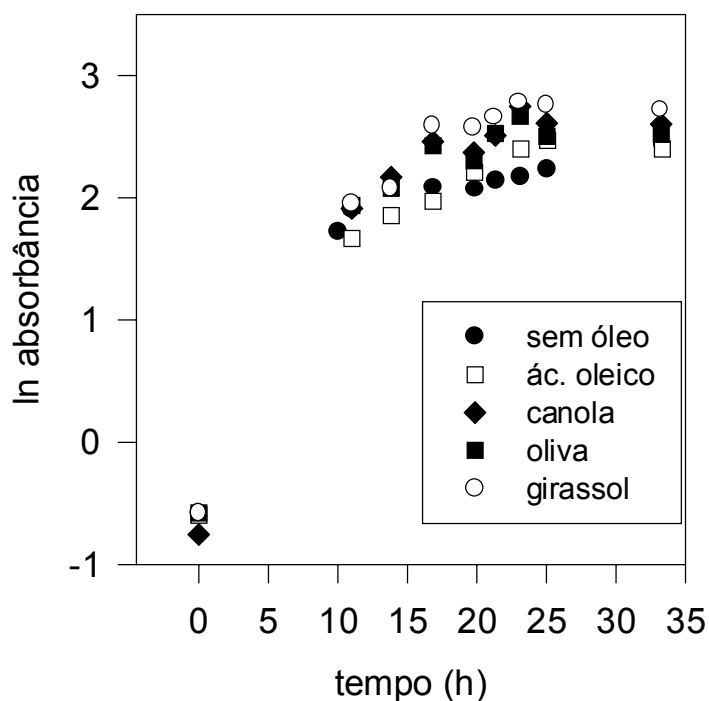


FIGURA A7: EVOLUÇÃO DA ABSORBÂNCIA COM O TEMPO PARA AS CULTURAS EM FRASCOS AGITADOS, COM SUPLEMENTAÇÕES

ANEXO IV - ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS

Durante a realização deste trabalho, alguns artigos foram desenvolvidos e submetidos para publicação em periódicos internacionais e nacionais, sendo que o artigo referente à estratégia de alimentação de fosfato foi publicado no periódico *Applied Microbiology and Biotechnology*, em março de 2003.

Neste anexo apresenta-se o artigo publicado e os demais artigos na forma em que foram submetidos. O artigo sobre o monitoramento do potencial redox foi submetido em junho de 2003 à *Biotechnology Progress* e um artigo de revisão sobre estratégias de produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) foi submetido à *Química Nova* em abril de 2003.

Culture redox potential identifies the poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) production phase by *Ralstonia eutropha*

Cláudia R. Squio, Leandro Finkler, Cíntia M. Ferreira, Gláucia M. F. Aragão*

Federal University of Santa Catarina, Chemical and Food Engineering Department,
Technological Center, C.P. 476, 88040-900 – Florianópolis, Brazil

* glaucia@enq.ufsc.br

Abstract: Redox potential behavior in the poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) (P(3HB-*co*-3HV)) production by *Ralstonia eutropha* was investigated, and its use to identify the production phase was proposed. Cultures were carried out in 6-L fermentor using glucose and fructose, propionic acid and phosphate limitation. The redox potential reached a minimum at the beginning of the production phase. Cultures using phosphate analysis and redox potential to indicate the beginning of the production phase were compared. The results were very similar, obtaining about 43 wt% of polymer content. It was demonstrated the utility of culture redox potential to identify metabolic changes in cultures of *R. eutropha*.

Introduction

The development of biodegradable and biocompatible materials is being motivated by the environmental impact caused by the plastics disposal. Polyhydroxyalkanoates (PHA's) are biodegradable thermoplastics accumulated by many bacteria for the intracellular storage of carbon and energy under unbalanced growth (1). Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P(3HB-co-3HV)) is a copolymer that possesses attractive thermoplastic properties, with large industrial interest (2).

Ralstonia eutropha is one of the PHA-producing bacteria that have the potential for industrial production due to its high yield, rapid production rate and ability to grow from renewable sources (2,3).

PHA production in *R. eutropha* is carried out in two phases – a phase of unlimited growth and a production phase, with nutrient (nitrogen, phosphate, oxygen, etc.) limitation, which favors polymer accumulation according to the source of carbon offered (4). During the production phase, the small feeding of the limiting nutrient can support a residual cell growth, leading to an increase in polymer production (5,6,7). Also, in order to promote copolymer production it is necessary to supply the co-substrate (e.g. propionic acid) during the production phase. However, if the propionic acid supply had occurred earlier than the production phase, a microorganism can use it for growth instead of copolymer production, leading to a co-substrate waste with higher production costs. Thus, in the P(3HB-co-3HV) production process by *R. eutropha*, the identification of production phase is very important. Previous studies had demonstrated the use of culture redox potential as a source of information about the metabolic state of fermentation, indicating changes in metabolic activities (8,9), however, its use in PHA production does not have been reported.

Electrochemically, the redox potential (E_h) indicates the relative concentration of reductants to oxidants in an environment. Therefore, it is the indicator that represents the abilities of redox couples as electron donors and acceptors (10). The redox potential of the environment surrounding a microorganism can be an important determinant of its metabolic activities. Organisms can influence the redox potential by altering pH, temperature, oxygen levels, or by producing compounds that alter the redox potential (11).

There have been several reports on the relationship between redox potential and the physiological state of a microbial system. In a number of early studies, redox potential was controlled by manipulating variables, aiming to improve products production (11,12), or just monitored to verify metabolic state changes (8,13).

In the present study, the behavior of the culture redox potential during P(3HB-co-3HV) production by *R. eutropha* was investigated, its signal was used to assess the metabolic activities identifying the production phase and the results were compared with culture carried out using limiting nutrient analysis for this propose.

Materials and Methods

Bacterial strain. The bacterial strain used was a glucose-utilizing mutant of *R. eutropha*, DSM 545.

Culture medium and conditions. Cells were grown in an enrichment medium, nutrient broth (NB), containing 5 g L⁻¹ of meat peptone and 3 g L⁻¹ of meat extract, at 30⁰C for 24 h. The seed cultures for fermentation were prepared for 24 h, at 30⁰C, in 1 L flasks each containing 400 mL of mineral medium (MM) (6). After autoclaving the above medium, a sterile phosphate solution was aseptically added to the medium to obtain a final concentration of 8.5 g L⁻¹ of Na₂HPO₄.12H₂O and 1.5 g L⁻¹ of KH₂PO₄. In

the same way, carbon substrate was added as a sterile glucose/fructose (1:1) solution of 500 g L^{-1} to obtain an initial concentration of 30 g L^{-1} . Seed culture was transferred to the 6 l fermentor (Bioflo III – New Brunswick, Edison, USA) containing 3.6 L of culture medium, that was the same as seed medium, except that the phosphate solution concentration was reduced to obtain a final concentration of 0.9 g L^{-1} of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ and 0.15 g L^{-1} of KH_2PO_4 . The whole culture was divided into two phases: a growth phase where no nutrient limitation is applied and a production phase with phosphate limitation where a continuous propionic acid and phosphate feeding are employed. Glucose/fructose solution pulses were given to maintain the carbon source between $10 - 30 \text{ g L}^{-1}$ in the culture medium. The culture pH was maintained at 7.0 by the addition of 5% (v/v) NH_4OH or 1M HCl solutions. The culture redox potential was measured with a platinum electrode (Analion, Brazil).

Determination of production phase. The limitation point was determined by two methods: in Culture A, by phosphate analysis during the culture when phosphate concentration in the medium was less than 0.1 g L^{-1} , and in Culture B, by redox potential where the minimum value indicated the beginning of production phase.

Phosphate and propionic acid feedings. Phosphate solution containing $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ and KH_2PO_4 was continually supplied during production phase, in order to maintain the constant rate of biomass production (r_x) of $0.02 \text{ gXr.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ (5). For copolymer production, propionic acid solution was fed during the production phase in order to obtain a concentration of less than 1 g L^{-1} in the medium.

Analytical procedures. Samples for the measurement of dry cell weight (DCW), PHA, glucose/fructose, protein and phosphate concentrations were taken every 2 h until 8 h of culture and every 1.5 h from this point to end of culture. To measure the DCW, cells were harvested by filtering a given volume of culture broth comprised between 3

and 10 mL through pre-weighed polyamide membrane filters (0.2 μm pore size) before drying at 100⁰C for 24 h. For protein analysis, samples of culture broth (2 mL) were centrifuged in Eppendorf tubes, the pellets were washed twice with distilled water and then frozen for subsequent analysis by the Biuret reaction (14) using bovine serum albumin (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo., USA) as a standard. Cell samples used for P(3HB-co-3HV) analysis was obtained as for protein analysis and these were prepared according to the method described previously (15). P(3HB-co-3HV) (Aldrich Chem. Co., USA) of natural origin with a defined 3HV content (12%) was used as the external standard. The resulting methyl esters were quantified by injection of 2 μL in a gas chromatograph (CG-90) equipped with a semi-capillary column (Supercowax-10 – 0.53mm X 30m). The column temperature was 110⁰C, the flame ionisation detector was kept at 230⁰C, and the injection temperature was 185⁰C. Glucose/fructose and phosphate concentrations were measured according Marangoni et al. (15).

Results and Discussion

Culture with phosphate analysis to indicate the limitation point

The culture redox potential was monitored in many cultures of *R. eutropha* on the P(3HB-co-3HV) production and presented the same behavior for all of them. Fig. 1 shows the profiles of redox potential, residual phosphate and residual biomass, expressed in ln, for one of these cultures (culture A). The redox potential's profile can be divided into 4 phases: (a) rapid decrease; (b) slow decrease; (c) minimum point; (d) increase. These different behaviours of redox potential may be explained by metabolic state changes of the cells, strongly related to cell growth. On 2 first hours, the major decrease occurred (phase a), and was explained previously as a phenomenon during the lag phase (9). From this point, the cells were in exponential growth and the redox

potential decrease slowly (phase b). Until 16.5 h, the cells were in unlimited growth, with a specific growth rate of 0.3 h^{-1} . During these phases, the redox potential decrease from 183 to 68 mV. The dashed line indicates the limitation point assumed during the culture. The continuous line indicates the real limitation point - the beginning of the production phase, at 16.5 h. In this point, phosphate was depleted and the minimum value of redox potential was attained (68 mV) (phase c). However, during the culture, the limitation point was assumed at 15.2 h, when the phosphate analysis indicated 0.03 g.L^{-1} of phosphate. From this moment, the propionic acid and phosphate were feeding continuously. The production phase was carried out for 10.5 h and during this period, the redox potential increased slowly (phase d). Although culture redox potential could identified the substrate exhaustion (9), under the substrate concentration maintained in the present study was not possible to verify any culture redox potential alterations corresponded to the substrate.

According to these results, it can be assumed that the minimum redox potential value identifies the beginning of the polymer production phase by *R. eutropha*, in the same way was demonstrated the minimum culture redox potential identifying the production phase in amino acid fermentation by *Corynebacterium glutamicum* (8).

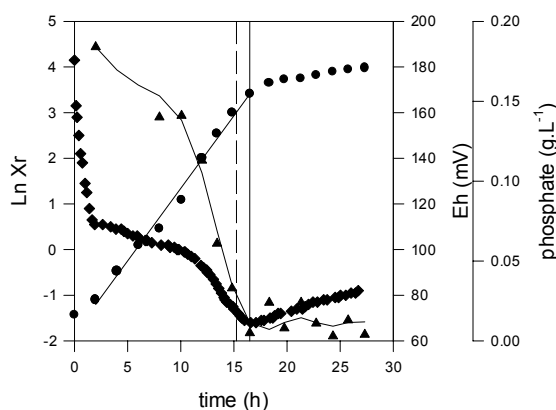


Figure 1. Time course of residual biomass, in \ln , ($X_r = X_t - P(3\text{HB-co-3HV})$) (●), residual phosphate (▲) and redox potential (◆) for culture using phosphate analysis indicating the production phase. The dashed line indicates the assumed limitation point and the continuous line indicates the real limitation point during the culture.

Culture using redox potential to indicate the limitation point

In order to confirm the capability of culture redox potential to identify the production phase it was realized a culture (culture B) monitoring redox potential, without phosphate analysis during the culture and the results were compared with a previous culture (culture A) using phosphate analysis to identify the limitation point. Fig. 2 shows the profiles of redox potential, residual phosphate and residual biomass, expressed in ln, to the culture using redox potential to indicate the limitation point. The dashed line indicates the assumed limitation point during the culture, which was exactly when the redox potential reached a minimum, at 16.5 h. From this point propionic acid and phosphate were supplied. The results for formation of total and residual biomass, protein, polymer composition and accumulation to both cultures are presented in Table 1. It is notable that the results obtained are very similar, which confirm the utility of culture redox potential to identify metabolic changes in *R. eutropha*.

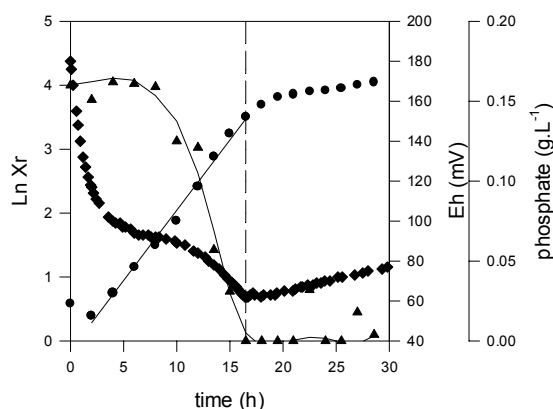


Figure 2. Time course of residual biomass, in ln, ($X_r = X_t - P(3HB-co-3HV)$) (●), residual phosphate (▲) and redox potential (◆) for culture using redox potential indicating the production phase. The dashed line indicates the assumed limitation point.

Table 1. Results of total and residual biomass, polymer accumulation, protein and polymer composition to cultures using redox potential (Culture A) and phosphate analysis (Culture B) to identify the production phase.

	Culture A	Culture B
time (h) ⁽¹⁾	25.8	27.0
Xt (g) ⁽²⁾	93.4	94.4
P(3HB-co-3HV) (g)	41.7	39.9
Xr (g) ⁽³⁾	51.7	54.5
Protein (g)	28.0	31.4
% P(3HB-co-3HV)	44.8	42.3
% 3HV	5.0	4.2

(1) total time of culture, take into account 10.5 h of production phase

(2) total biomass

(3) residual biomass ($X_r = X_t - P(3HB-co-3HV)$)

At the same way that previous studies demonstrated that culture redox potential is very useful in monitoring microbial state changes in different cultures and products (8,9,10,13) we showed that it can also be used successfully in P(3HB-co-3HV) production by *R. eutropha*.

Conclusion

This study demonstrated that culture redox potential identifies the metabolic state changes in *R. eutropha*, during the P(3HB-co-3HV) production, and that the minimum redox potential measurement can be used to identify precisely the beginning of the polymer production phase.

References

- (16) Anderson, A.; Dawes, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **1990**, *54*, 450-472.
- (17) Byrom, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Tibtech* **1987**, *5*, 246-250.
- (18) Marangoni, C.; Furigo Jr A.; Aragão, G. M. F. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. *Proc. Biochem.* **2002**, *38*, 137-141.
- (19) Dawes, E. A.; Senior, P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* **1973**, *10*, 135-266.
- (20) Squio, C. R.; Marangoni, C.; De Vecchi, C. S.; Aragão, G. M. F. Phosphate feeding strategy during production phase improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) storage by *Ralstonia eutropha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 257-260.
- (21) Aragão, G. M. F.; Lindley, N. D.; Uribe Larrea, J. L.; Pareilleux, A. Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Lett.* **1996**, *18*, 937-942.
- (22) Bitar, A.; Underhill, S. Effect of ammonium supplementation on production of poly- β -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in batch culture. *Biotechnol. Lett.* **1990**, *12*, 563-568.

- (23) Kwong, S. C. W.; Rao, G. Utility of culture redox potential for identifying metabolic state changes in amino acid fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *38*, 1034-1040.
- (24) Kwong, S. C. W.; Randers, L.; Rao, G. On-Line assessment of metabolic activities based on culture redox potential and dissolved oxygen profiles during aerobic fermentation. *Biotechnol. Prog.* **1992**, *8*, 576-579.
- (25) Lee, T. H.; Chang, Y. K.; Chung, B. H.; Park, Y. H. Correlation of redox potential with state variables in cultures under controlled dissolved oxygen concentration and pH. *Biotechnol. Prog.* **1998**, *14*, 959-962.
- (26) Thompson, B. G.; Gerson, D. F. Electrochemical control of redox potential in batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **1985**, *27*, 1512-1515.
- (27) Janssen, A. J. H.; Meijer, S.; Bontsema, J.; Lettinga, G. Application of the redox potential for controlling a sulfide oxidizing bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *60*, 147-155.
- (28) Bagramyan, K.; Galstyan, A.; Trchounian, A. Redox potential is a determinant in the *Escherichia coli* anaerobic fermentative growth and survival: effects of impermeable oxidant. *Bioelectroch.* **2000**, *51*, 151-156.
- (29) Stickland, L. H. The determination of small quantities of bacteria by means of the Biuret reaction. *J. Gen. Microbiol.* **1951**, *5*, 689-703.
- (30) Marangoni, C.; Furigo Jr. A.; Aragão, G. M. F. Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Rasltonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22*, 1635-1638.

**ESTRATÉGIAS DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DOS PLÁSTICOS
BIODEGRADÁVEIS POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) E POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-CO-3-
HIDROXIVALERATO): UMA REVISÃO**

Cláudia Regina Squio e Gláucia Maria Falcão de Aragão*

Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Engenharia Química e
Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 80040-970
Florianópolis - SC

* e-mail: glaucia@enq.ufsc.br

**CULTURE STRATEGIES TO PRODUCTION OF BIODEGRADABLE PLASTICS
POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) AND POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-
HYDROXYVALERATE): AN OVERVIEW**

ABSTRACT: Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are carbon and energy storage materials that accumulate as intracellular granules in a variety of microorganisms during unbalanced growth. PHAs have been drawing much attention because of their similar properties to conventional plastics and complete biodegradability. They can be used in the most diverse applications as food packings and cosmetics, medical, agricultural and school areas, however, its high production cost front to conventional plastics makes with that still they are little applied. An overview on production strategies of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) aiming the reduction of its production costs is presented.

Keywords: polyhydroxyalkanoates, biopolymer, *Ralstonia eutropha*

1 – INTRODUÇÃO

Os plásticos têm papel fundamental na sociedade moderna, onde são utilizados de inúmeras formas, inclusive em algumas aplicações para as quais anteriormente eram utilizados outros materiais como metais, vidro, madeira e papel. Possuem dessa forma, um grande mercado e também representam um mercado em crescimento. Entretanto, estes materiais têm despertado grande preocupação devido à sua rápida descartabilidade, como por exemplo, na aplicação em embalagens, e à sua grande dificuldade de degradação no meio ambiente¹.

Para contornar esse problema, estão sendo estudadas alternativas como a reciclagem de produtos constituídos de plásticos e a substituição por plásticos biodegradáveis, mais compatíveis com a filosofia de preservação ambiental².

Os plásticos biodegradáveis são polímeros que se degradam completamente ao ataque microbiano em um curto espaço de tempo, sob condições apropriadas do meio ambiente. Dentre os biopolímeros em desenvolvimento estão os polihidroxialcanoatos (PHA's). Além da vantagem em serem biodegradáveis, os PHA's ainda apresentam outras importantes características como serem biocompatíveis, serem produzidos a partir de recursos renováveis como açúcares e ácidos graxos e por terem propriedades termoplásticas e características físicas e mecânicas semelhantes às do polipropileno, polímero derivado do petróleo³.

Polihidroxialcanoatos (PHA's) são poliésteres estruturalmente simples sintetizados por muitos microrganismos como substâncias naturais de reserva de carbono e de energia. São acumulados pela célula microbiana em forma de grânulos, podendo chegar até ao nível de 90% de seu peso seco⁴. O PHA é formado em condições

de crescimento não balanceadas proporcionadas pela limitação de um nutriente, entre outros, como fonte de nitrogênio e fósforo e excesso da fonte de carbono^{5,6}.

Mais de 100 monômeros diferentes já foram identificados como constituintes de PHA's sintetizados por organismos naturais ou recombinantes, o que demonstra a grande diversidade de PHA's que podem ser produzidos¹. Entre os PHA's mais estudados e produzidos industrialmente, estão o poli(3-hidroxi-butirato) (P(3HB)) e o poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (P(3HB-co-3HV)), sendo que o segundo possui propriedades mecânicas superiores ao primeiro, sendo mais flexível, o que o torna mais atrativo para fins industriais⁷.

Muitos são os microrganismos produtores de PHA's, sendo que a espécie *Ralstonia eutropha* é uma das que apresenta condições mais favoráveis à produção industrial, destacando-se por obter alto rendimento e alta taxa de produção de polímero⁸.

. Outro microrganismo com grande potencial para a produção industrial é *Burkholderia sacchari*, descoberta em solo de canavial brasileiro⁹.

Os PHA's podem ser utilizados como matéria-prima em um amplo campo de aplicações como embalagens para produtos de limpeza, higiene, cosméticos e alimentos. Também servem para produzir sacos descartáveis, vasos para mudas, brinquedos e material escolar. Além disso, por serem biocompatíveis podem ser empregados na área médico-farmacêutica em fabricação de fios de sutura, próteses ósseas, suportes de culturas de tecidos para implantes e encapsulação de fármacos para liberação controlada¹⁰.

Apesar desta grande possibilidade de aplicações, os plásticos biodegradáveis ainda têm participação mínima no mercado internacional, em virtude de seu alto custo em relação aos plásticos petroquímicos. A redução dos custos de produção depende da obtenção de linhagens altamente eficientes na conversão dos substratos no produto

desejado, de utilização de substratos de baixo custo, do desenvolvimento de processos que permitam explorar ao máximo o potencial dessas linhagens e do desenvolvimento de processos de extração-purificação de forma a tornar os custos de recuperação do produto os menores possíveis¹. Algumas das estratégias em estudo para a melhoria dos processos de produção de PHA's, tornando-os mais competitivos, estão apresentados a seguir.

2- ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) E POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-CO-3-HIDROXIVALERATO)

A produção industrial de PHA's tem utilizado *R. eutropha* como microrganismo produtor por sua capacidade de produzir grande quantidade de polímero com alto peso molecular^{8,11}. Dentre os principais PHA's produzidos industrialmente estão o P(3HB) e o copolímero P(3HB-co-3HV). Por apresentar vantagens como ser mais flexível e forte, o P(3HB-co-3HV) apresenta maior aplicação industrial.

Byrom⁷ descreve o processo de produção industrial de P(3HB) da ICI, hoje adquirido pela Metabolix, Inc., que utiliza cultura em batelada alimentada realizada em duas etapas. Durante a primeira fase, não limitada, *R. eutropha* cresce em um meio mineral contendo glicose como única fonte de carbono e fosfato suficiente para o crescimento celular até se atingir uma determinada biomassa desejada. Quando ocorre a limitação por fosfato, inicia-se a segunda fase, onde os microrganismos começam a produzir e estocar P(3HB). O processo prossegue com adições de glicose até que se obtenha a quantidade desejada de polímero. O tempo total de cultura é de aproximadamente 110 a 120 horas com o acúmulo de mais de 75 % do peso seco celular total em polímero.

O copolímero P(3HB-*co*-3HV) é produzido de forma semelhante, em duas fases, sendo que, a partir do início da fase de acúmulo, são adicionados glicose e ácido propiônico. P(3HB-*co*-3HV) com 0 – 30 mol% de unidades HV é produzido e essa fração pode ser controlada pela razão glicose/ácido propiônico adicionada. Como o ácido propiônico, em níveis acima de 0,1 % no meio, é tóxico ao microrganismo e inibe a síntese de polímero, sua taxa de alimentação precisa ser bem controlada⁷.

2.1 UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO NA PRODUÇÃO DE PHA'S

O maior obstáculo na comercialização de PHA's é seu alto custo. Segundo Choi e Lee¹², aproximadamente 40 % do total do custo de produção de PHA's é devido aos custos dos substratos. Assim, para se conseguir reduzir os custos de produção é necessário a utilização de fontes de carbono mais baratas.

2.1.1 USO DE SACAROSE, MELAÇO E AÇÚCAR INVERTIDO

Em países como o Brasil, onde a cana-de-açúcar é abundante, a sacarose, melaço e açúcar invertido são substratos de baixo custo e sua utilização como fonte de carbono na produção de PHA's poderia diminuir os custos de produção regionais.

A produção de P(3HB) e copolímeros, integrada à produção de açúcar e álcool em usinas de processamento de cana-de-açúcar, pode representar uma grande oportunidade de produzir polímero a baixo custo e de expandir a indústria de cana. Neste caso, a energia necessária aos processos de produção provém da queima do bagaço de cana, os efluentes do processo e a biomassa resultante após extração do polímero podem ser utilizadas como fertilizantes na plantação da cana e os solventes utilizados na purificação do polímero são derivados da fermentação alcoólica, naturais e biodegradáveis, portanto, sem representar impacto ambiental¹³.

A única produção industrial de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) a partir de cana-de-açúcar, utilizando essa produção integrada em usina sucroalcooleira, está sendo realizada pela indústria brasileira PHB industrial SA. A resina, comercialmente conhecida como Bio Cycle, está sendo produzida em escala-piloto e destinada a universidades, empresas e centros de pesquisa e desenvolvimento. Até 2005, a empresa pretende produzir cerca de 10 mil toneladas por ano. Os custos de produção da PHB industrial são os menores do mundo. Enquanto na Europa o polímero é produzido a US\$ 15-20 / Kg, no Brasil esses custos estão entre US\$ 2,5 – 5 / Kg, porém ainda cerca de 4 a 5 vezes o custo dos polímeros convencionais^{14,15}.

Como *R. eutropha*, o microrganismo utilizado industrialmente, não é capaz de assimilar sacarose, é necessária a inversão prévia deste substrato, o que aumenta os custos de produção. Com o objetivo de desenvolver uma cepa derivada da *R. eutropha* DSM 545 com a capacidade de crescer em meio com sacarose como única fonte de carbono, Fava¹⁶ construiu a cepa *R. eutropha* 290/sac. Os resultados demonstraram a habilidade desta nova cepa em consumir sacarose, embora sua eficiência de crescimento e produção de P(3HB) fosse relativamente inferior em relação ao que é produzido utilizando-se glicose e frutose como substratos. Em glicose e frutose obteve-se velocidade específica máxima de crescimento de 0,29 h⁻¹ e P(3HB) equivalente a 79 % do peso seco celular, enquanto em sacarose obteve-se velocidade específica máxima de crescimento de 0,24 h⁻¹ e P(3HB) com apenas 58 % do peso seco. O autor sugere que novos melhoramentos possam aumentar o desempenho da cepa construída.

Gomez et al.¹⁷ avaliaram a eficiência de produção de PHA's por diversas bactérias gram-negativas isoladas do solo de plantações de cana-de-açúcar. As culturas foram realizadas sob limitação de nitrogênio e utilizando como carboidratos sacarose, glicose e frutose. Quando foi utilizada sacarose, alguns microrganismos mostraram

valores de rendimento global de carboidrato em produto, $Y_{P/C}^0$, maiores que em glicose e/ou frutose. Os autores explicam o fato dizendo que a mesma massa de sacarose gera 5 % mais acetil-CoA, e por consequência PHA, do que glicose e frutose. Entre os microrganismos isolados, a *Burkholderia* sp. IPT 101 foi capaz de acumular 75 % do seu peso seco em P(3HB) a partir de glicose mais frutose e 69 % a partir de sacarose, com uma eficiência maior que 80 % do máximo rendimento teórico, que é de 0,48 g/g quando se utiliza glicose e/ou frutose, de acordo com Yamane¹⁸, e 5 % maior, de 0,5 g/g quando se utiliza sacarose. A bactéria ainda foi capaz de crescer com velocidade específica de crescimento ($0,4 - 0,45 \text{ h}^{-1}$), maior que *R. eutropha* ($0,3 \text{ h}^{-1}$).

A produção de P(3HB) a partir de hidrolisado de bagaço de cana, resíduo da indústria sucroalcooleira, utilizando *B. sacchari*, também está sendo estudada como forma de reduzir os custos de produção do polímero¹⁰.

Alcaligenes latus é um microrganismo que produz P(3HB) associado ao seu crescimento, mesmo em condições de não limitação de nitrogênio, porém, normalmente produz baixo conteúdo de P(3HB), em torno de 50 %¹⁹. No entanto, melhorias no processo produtivo foram propostas por Grothe et al.²⁰, que estudaram a otimização da produção de P(3HB) por *Alcaligenes latus* DSM 1123 a partir de sacarose como única fonte de carbono. Os autores investigaram os efeitos da temperatura, pH inicial, concentração de elementos traços, tipo da fonte de nitrogênio e da razão carbono/nitrogênio (C/N). Nas melhores condições verificadas, obtiveram a produção de 63 % de P(3HB) com um coeficiente de conversão de sacarose em biomassa igual a 0,4 kg/kg.

Wang e Lee¹⁹ estudaram o efeito da aplicação de limitação de nitrogênio sobre a produção de P(3HB) por *A. latus* DSM 1123, a partir de sacarose. A limitação de nitrogênio ocorreu quando a concentração de biomassa era de 76 g/L e ao final da fase

de acúmulo obtiveram 111,7 g/L de biomassa seca, 98,7 g/L de P(3HB), correspondente a 88 % e produtividade de 4,94 g/L h. Segundo os autores, esta alta produtividade foi principalmente obtida porque durante a fase de acúmulo, sob limitação de nitrogênio, não houve crescimento celular, apenas produção de P(3HB).

O melaço é um subproduto industrial que tem sido largamente utilizado como fonte de carbono em fermentações com leveduras para produção de álcool²¹. Além de ser mais barato que a glicose, o melaço contém elementos traços e vitaminas que podem ser usados como potencializadores do crescimento²².

Melaço de cana foi utilizado como fator de crescimento na produção de P(3HB) por *R. eutropha* DSM 545 crescendo em glicose²². Os autores concluíram que a suplementação com melaço de cana em concentrações de 0,3 % maximizou a produção de P(3HB) pois aumentou a formação de biomassa na fase de crescimento não-limitados, resultando em maior quantidade de células para acumular polímero. A produtividade e o rendimento também foram maiores com o uso do melaço.

Liu et al.²¹ estudaram a produção de P(3HB) por *E. coli* recombinante HMS174/pTZ18u-PHB, utilizando melaço de beterraba hidrolisado como única fonte de carbono. A cultura foi realizada em batelada alimentada e resultou em 39,5 g/L de peso seco celular, 80 % de P(3HB) com produtividade de 1 g/L.h. Relataram que a concentração de melaço teve efeito significativo na síntese de P(3HB) e no crescimento das células. Altas concentrações de melaço resultaram em altos conteúdos de P(3HB).

Pinto²³ comparou o crescimento de *R. eutropha* DSM 545 em glicose e em açúcar invertido. Concluiu que as velocidades específicas de crescimento celular obtidas para os dois substratos foram bastante similares, indicando que *R. eutropha* é capaz de se desenvolver tão bem em açúcar invertido quanto em glicose, podendo dessa forma ser um substituto de baixo custo. Confirmando este estudo, Marangoni et al.²⁴

encontraram que em açúcar invertido a velocidade específica máxima de crescimento de *R. eutropha* DSM 545 foi ligeiramente superior à obtida em glicose.

2.1.2 USO DE SORO DE LEITE

Soro de leite é um grande efluente da indústria de laticínios, resultante da fabricação de queijo ou caseína, representando cerca de 80-90 % do volume de leite transformado²⁵. Uma vez que o soro de leite é rico em nutrientes, sendo a lactose seu maior constituinte, apresenta-se como outra alternativa de substrato de baixo custo na produção de PHA's.

Wong e Lee²⁵ estudaram a produção de P(3HB) em culturas de alta densidade de células de *Escherichia coli* recombinante GCSC 6576, em batelada alimentada, utilizando soro de leite concentrado como fonte de carbono. Obtiveram 87 g/L de células e 69 g/L de P(3HB) perfazendo um total de 80 % de polímero com produtividade de 1,4 g/L.h. Apesar de terem obtido valores de concentração e produtividade de polímero menores do que com fontes puras de carbono, relatam que sua produção pode ser econômica principalmente se incorporada a uma indústria de laticínios, agregando valor ao efluente. Embora tenham conseguido boas concentrações de P(3HB), o meio de cultura precisava ser constantemente removido devido à limitação volumétrica do fermentador causada pela baixa solubilidade da lactose na solução de alimentação (210 g/L), se comparada à da glicose (700 – 800 g/L)²⁵.

Para tentar resolver esse problema de remoção do meio de cultura, Kim²⁶ estudou a produção de P(3HB) por *E. coli* recombinante GCSC 6576 em soro de leite não concentrado, tentando controlar a biossíntese do polímero fazendo com que as células começassem a produzir mais cedo durante a cultura e acumulassem mais P(3HB) sem precisar remover o meio de cultura. Assim, realizou fermentações com e

sem limitação de oxigênio. Na cultura com limitação obteve 80 % de P(3HB) com produtividade de 0,48 g/Lh, enquanto na cultura sem limitação obteve 57 % de P(3HB) com produtividade de 0,9 g/L.h. Embora *E. coli* não necessite de limitação de nutriente para produzir o polímero, na condição de oxigênio insuficiente houve aumento da produção de P(3HB) por diminuição da velocidade de crescimento celular.

No mesmo intuito de desenvolver estratégias para produção de P(3HB) a partir de soro de leite sem remoção do meio de cultura, Ahn et al.²⁷ conseguiram resultados ainda melhores. Desenvolveram uma nova estratégia para produção de P(3HB) utilizando *E.coli* recombinante GCSC 4401 crescendo em solução de soro de leite altamente concentrado (280 g/L de lactose), com controle apropriado da concentração de oxigênio dissolvido. Durante a fase inicial ativa de crescimento de *E. coli*, onde o fornecimento suficiente de oxigênio é importante para conseguir concentrações finais elevadas de células e polímero, mantiveram a concentração de oxigênio dissolvido em 40 %. Na fase seguinte, de maior acúmulo de polímero, a concentração de oxigênio dissolvido foi diminuída primeiramente de 40 para 30 % e depois para 15 %. Dessa forma, obtiveram 119,5 g/L de células, 96,2 g/L de P(3HB) num total de 80 % do peso seco, com alta produtividade de 2,57 g/L.h, sem remoção do meio de cultura. Os resultados mostraram que altas concentrações de células e polímero podem ser obtidas pela otimização do tempo e forma de redução do oxigênio dissolvido em cultura de *E. coli*, além de demonstrar que P(3HB) pode ser eficientemente produzido a partir de um efluente altamente poluente como o soro de leite.

O crescimento de *R. eutropha* DSM 545 em lactose hidrolisada²⁴ e em soro de leite²⁸ foi investigado. A bactéria mostrou-se capaz de se desenvolver muito bem em ambos substratos, sendo que, em lactose hidrolisada, observaram duas fases distintas de crescimento, a primeira correspondente ao consumo de glicose e a segunda

correspondente ao consumo da galactose, com velocidades específicas máximas de crescimento de 0,2 e 0,11 h⁻¹, respectivamente. Quando o soro de leite foi utilizado como única fonte inicial de carbono, com adições de açúcar invertido e ácido propiônico, na forma de pulsos, observou-se uma fase de crescimento exponencial, com velocidade específica máxima de 0,23 h⁻¹, bastante similar aos resultados com *R. eutropha* crescendo em outros substratos como glicose e açúcar invertido. Apesar de ter produzido pouco conteúdo de polímero, a fração de unidades 3HV foi de 37%, com rendimento de conversão de propionato em unidades 3HV de 0,22 mol mol⁻¹. Dessa forma, mostra que o soro de leite é uma alternativa atrativa para a produção de PHA's, com composição atrativa comercialmente, também utilizando *R. eutropha*.

2.1.3 USO DE ÓLEOS E GORDURAS

Outro estudo visando a redução de custos de produção de PHA's é o uso de óleos vegetais que são produtos agrícolas renováveis e de baixo custo.

Fukui e Doi²⁹ estudaram a capacidade de *R. eutropha* H16 crescer e produzir PHA's a partir de óleos vegetais como óleo de oliva, de milho, de palma e ácido oleico como únicas fontes de carbono. Os resultados mostraram que a bactéria cresce muito bem nesses substratos, acumulando alto teor de P(3HB), entre 79-82 % de seu peso seco.

2.2 UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES NUTRIENTES LIMITANTES NA PRODUÇÃO DE PHA'S

O acúmulo de polímero pelos microrganismos é favorecido pela limitação de um nutriente como oxigênio, magnésio, potássio, enxofre, nitrogênio ou fósforo⁵. O nitrogênio e o fósforo têm sido os elementos mais estudados como nutrientes limitantes na produção de PHA's, sendo analisadas tanto estratégias em carência como com

alimentação do nutriente na fase de acúmulo, visando a máxima produção de polímero^{8,23,30-34}.

Ramsay et al.⁸ utilizaram limitação de nitrogênio em cultura de *R. eutropha* DSM 545. Para tanto, usaram glicose como única fonte de carbono, em concentração inicial de 30 g/L e sulfato de amônia como fonte de nitrogênio em concentração inicial de 9 g/L. Assim que esses substratos foram totalmente consumidos, houve sua reposição ao nível inicial. Após a segunda exaustão, apenas glicose foi adicionada continuamente ao reator para manter sua concentração entre 5 e 16 g/L. Assim, obtiveram produtividade máxima de P(3HB) de 2 g/L.h.

O efeito da alimentação de amônia na fase de produção de P(3HB) por *A. eutrophus* H16, em batelada alimentada foi investigado³⁰. Quando uma baixa concentração de amônia foi adicionada a uma taxa de 0,00065 g/h, a produtividade de P(3HB) aumentou de 0,1 g/L.h para 0,99 g/L.h, durante as dez horas em que a amônia foi adicionada. Estes valores são duas vezes maiores que os obtidos sob carência de amônia. Após 29 horas de fermentação, cessou-se a adição de amônia, sendo que neste instante, o teor de P(3HB) era de 62 % do peso seco para a cultura com alimentação e de 42,5 % para a cultura em carência. Esses resultados mostraram que a alimentação de amônia durante a fase de produção de P(3HB) pode aumentar o acúmulo de polímero. Este trabalho confirma os resultados anteriormente obtidos por Suzuki et al.³¹, onde a alimentação com pequena quantidade de amônia durante a fase de acúmulo, em culturas de *Protomonas extorquens*, resultou em mais rápido aumento do conteúdo de P(3HB) do que em culturas com deficiência de amônia. Por outro lado, uma alimentação excessiva de amônia causou não só degradação do P(3HB) acumulado mas também reduziu a atividade microbiana de síntese do polímero pelo microorganismo.

Estratégias de carência e alimentação de nitrogênio e carência de fósforo durante a fase de produção de P(3HB) por *R. eutropha* DSM 545 foram estudadas por Aragão³². Com relação ao teor de P(3HB) obteve 51, 73,5 e 60 % nas culturas em carência de nitrogênio, alimentação de nitrogênio e carência de fósforo, respectivamente. Por outro lado, os valores de conversão de glicose em polímero e produtividade foram maiores para a cultura em carência de fósforo, obtendo 0,42 g_{P(3HB)}/g_{glicose} e 2,21 g/L.h contra 0,33 e 0,31 g_{P(3HB)}/g_{glicose} e 0,45 e 1,16 g/Lh para as culturas em carência e alimentação de nitrogênio, respectivamente. O autor considera que a maior produtividade obtida sob carência em fósforo, em relação à carência e alimentação de nitrogênio, se deve ao fato de que o fósforo não participa diretamente da composição de proteínas das células, e dessa forma, sua limitação permite um crescimento celular residual por algum tempo, uma vez que esse elemento faz parte dos intermediários energéticos recicláveis (ATP/ADP), levando à um acréscimo da produção de polímero.

Resultados obtidos por Pinto²³, utilizando *R. eutropha* DSM 545 com açúcar invertido como única fonte de carbono, também demonstraram valores de produtividade de P(3HB) maiores nas culturas sob carência/limitação de fósforo do que de nitrogênio. No caso da limitação em nitrogênio, assim como Bitar e Underhill³⁰, o autor relata que sua alimentação controlada durante a fase de produção permitiu obter maior produtividade de P(3HB) do que sob carência. Entretanto, as culturas sob carência/limitação de fósforo obtiveram produtividades ainda maiores.

O efeito de várias estratégias de alimentação em nitrogênio na produção de P(3HB-co-3HV) em culturas de *R. eutropha* DSM 545 foi estudado por Aragão et al.³³. Para a cultura sob carência em nitrogênio obtiveram resultados comparáveis aos de Ramsay et al.⁸, ou seja, 5 mol% de 3HV por mol de PHA, enquanto as culturas com alimentação de nitrogênio durante a fase de acúmulo, mostraram-se mais favoráveis à

produção do copolímero, com produtividade de 0,72 g/L.h, fração de 3HV final de 13 mol% e fator de conversão de ácido propiônico em 3HV de 0,15 mol_{3HV}/mol_{ác. prop.}. O fator de conversão de propionato em 3HV teve valor máximo de 0,4 mol_{3HV}/mol_{ác. prop.} no início da fase de produção, diminuindo continuamente até o final da cultura. A análise do fator de conversão de glicose em polímero, mostrou que uma fração do ácido propiônico poderia, via acetil-CoA, ser convertido em unidades 3HB pelo mesmo metabolismo da fonte principal de carbono. Dessa forma, várias características da produção do copolímero foram favorecidas pelo uso da estratégia de alimentação de nitrogênio onde o crescimento celular foi mantido, mesmo durante a fase de acúmulo de polímero. Não só as taxas de produção foram melhoradas, como também a composição molar do polímero que obteve maior fração de unidades 3HV.

A utilização de alimentação de fosfato durante a fase de acúmulo de P(3HB-co-3HV), mantendo uma pequena taxa de crescimento residual (r_x) em *Ralstonia eutropha* DSM 545, de 0,02 g L⁻¹h⁻¹, aumentou o conteúdo de polímero acumulado em relação à carência do nutriente³⁴.

A limitação de oxigênio, durante a fase de acúmulo de P(3HB) por *E. coli* recombinante XL1-Blue (pSYL107), contendo genes de biossíntese de PHA de *A. eutrophus*, foi relatada por Wang e Lee³⁵. A cultura em batelada alimentada foi realizada utilizando glicose como fonte de carbono. A concentração de oxigênio dissolvido foi mantida entre 1 – 3 % de saturação de ar durante a fase de acúmulo de P(3HB). Sob essas condições obtiveram 204,3 g/L de concentração de biomassa, 157,1 g/L de P(3HB) correspondente a 77 % e produtividade de 3,2 g/L.h.

2.3 UTILIZAÇÃO DE CULTURAS COM ALTA DENSIDADE DE CÉLULAS NA PRODUÇÃO DE PHA'S

Culturas com alta densidade de células apresentam vantagens como alta concentração de produto, maior produtividade e redução dos custos de recuperação do polímero.

Kim et al.³⁶, no intuito de melhorar a produtividade de P(3HB), estudaram a produção de polímero por *R. eutropha* NCIMB 11599, em batelada alimentada com alta densidade de células, utilizando dois métodos para manter a concentração de glicose em um valor ótimo: um método utilizando a medida da taxa de evolução de CO₂ (CER), em mol/h, por espectrometria de massa para estimar a concentração de glicose e outro método utilizando um analisador de glicose “on-line” que controlava diretamente a concentração de glicose no meio de cultura. Segundo os autores, controlando a concentração de glicose entre 10 – 20 g/L, o crescimento do microrganismo seria otimizado resultando em produção mais eficiente de P(3HB). Também estudaram o efeito da limitação de nitrogênio em diferentes concentrações de biomassa (30, 55 e 70 g/L) sobre a produção de P(3HB). Encontraram os melhores resultados de concentração de células, de P(3HB) e produtividade com o analisador de glicose “on-line” e limitação de nitrogênio quando a biomassa era de 70 g/L. Nessas condições, obtiveram 164 g/L de concentração celular, 121 g/L de P(3HB) correspondente a 76 % do peso seco celular, com produtividade de 2,42 g/L, em 50 h. Testaram ainda a limitação de nitrogênio quando a biomassa era de 90 g/L, já que obtiveram os melhores resultados quando a limitação ocorreu na maior concentração de biomassa, porém a cultura mostrou-se instável, com baixa concentração de polímero. Uma cultura sem o controle da concentração de glicose também foi realizada para comparação dos resultados. Neste caso, a concentração de glicose esteve entre 0 – 20 g/L e cada vez que

o pH subia rapidamente como sinal da exaustão da glicose, ela era adicionada para voltar a 20 g/L. Dessa forma obtiveram em 44 h, apenas 58 g/l de concentração celular com 10 g/L de P(3HB), sendo que a limitação de nitrogênio ocorreu quando a biomassa era de aproximadamente 45 g/L. Assim, pode-se obter alta concentração e produtividade de P(3HB) em culturas de *A. eutrophus* controlando a concentração de glicose e o momento da limitação do nutriente.

Culturas de *A. eutrophus* NCIMB 11599 em fermentador de 60 L, regime de batelada alimentada com alta densidade de células, foram estudadas por Ryu et al.³⁷. Eles utilizaram limitação em fosfato em vez de nitrogênio e controlaram a concentração de glicose, que ficou entre 0 – 20 g/L, pela concentração de oxigênio dissolvido. Investigaram também o efeito da concentração inicial de fosfato na produção do polímero. Em todos os casos, o teor final de P(3HB) obtido foi de 80 % do peso seco celular. Entretanto, a cultura com maior concentração de fosfato inicial, 5,5 g/L, foi a que obteve maior concentração de biomassa e de P(3HB), resultando em 281 g/L de biomassa e 232 g/L de P(3HB) com produtividade de 3,14 g/L.h em 75 horas. Dessa forma, mostram que a quantidade de células e P(3HB) produzida pode ser maior com o aumento da concentração inicial de fosfato.

Para comparação de resultados, também realizaram uma cultura nas mesmas condições, porém com limitação em nitrogênio. Entretanto, não conseguiram alta densidade de células devido à significativa lise das mesmas causada pela toxicidade da solução de NaOH excessivamente adicionada para controle de pH. No caso de limitação em fosfato, a solução utilizada para controle de pH foi amônia e as células mantiveram boas condições durante toda a fermentação, sem lise, o que pode ter contribuído para a produção de P(3HB) com alta produtividade³⁷.

Choi et al.³⁸ estudaram a produção de P(3HB) por *E. coli* recombinante XL1-Blue(pJC4) contendo genes de biossíntese de PHA de *A. latus*. A cultura foi realizada em batelada alimentada com glicose como fonte de carbono. Ao final, obtiveram 194,1 g/L de concentração de biomassa, 141,6 g/L de P(3HB), correspondendo a 73 % de polímero, com alta produtividade de 4,63 g/L.h. Assim, os autores relatam que *E. coli* recombinante pode ser usada para a produção de P(3HB) com alto nível de competitividade econômica.

2.4 PRODUÇÃO DO COPOLÍMERO P(3HB-co-3HV)

Uma vez que o P(3HB) é um material rígido e quebradiço, a incorporação de unidades 3HV é responsável pela melhoria das características do copolímero P(3HB-co-3HV). Como resultado da incorporação de unidades 3HV, ocorrem alterações de parâmetros como níveis de cristalinidade e ponto de fusão, acarretando na diminuição da rigidez do polímero e no aumento da resistência ao impacto. Teores de 3HV entre 17 e 20 mol% permitem a obtenção de um produto com propriedades termoplásticas que levam à maior aplicação do polímero³⁹. A partir de fontes de carbono como glicose e frutose, *Ralstonia eutropha* produz apenas o homopolímero 3HB. Para a produção do copolímero, são necessários precursores como ácido propiônico ou valérico, que podem ser metabolizados a unidades 3HV.

2.4.1 UTILIZAÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO COMO PRECURSOR DE UNIDADES 3HV

A produção industrial do copolímero P(3HB-co-3HV) é feita adicionando-se ácido propiônico à cultura para a incorporação de unidades 3HV. O teor de 3HV incorporado ao polímero é controlado pela variação da razão de glicose e ácido propiônico da alimentação. É necessário um controle apropriado da concentração de

propionato adicionado pois, se presente no meio em concentrações maiores que 0,1 %, pode ser tóxico e inibir a síntese do polímero por *R. eutropha*⁷.

Entretanto, a fração de 3HV incorporada ao polímero geralmente é baixa, uma vez que, além de servir como cosubstrato para unidades 3HV, o ácido propiônico também pode ser assimilado para o crescimento celular⁴⁰. O ácido propiônico é rápido e eficientemente degradado por células bacterianas, e seu uso, durante a fase de multiplicação celular, implica em maior desperdício desse substrato, impedindo que ele cumpra seu principal papel nesse processo, ou seja, a síntese de unidades 3HV¹.

O baixo teor de P(3HB-*co*-3HV) e produtividade são atribuídos ao efeito tóxico e às impróprias estratégias de alimentação do ácido propiônico⁴¹. Vários estudos têm sido realizados no intuito de melhorar a produção de P(3HB-*co*-3HV). Ramsay et al.⁸ estudaram a produção do copolímero por *R. eutropha* DSM 545 a partir de glicose e ácido propiônico, utilizando uma razão de alimentação ácido propiônico/glicose (P/G) constante e igual a 0,33 mol/mol. Obtiveram 17 g/L de P(3HB-*co*-3HV) contendo 5 mol% de unidades 3HV com produtividade máxima de 0,74 g/L.h. Relataram que 0,1 g de monômero de 3HV foram produzidos para cada grama de ácido propiônico metabolizado, correspondendo a uma conversão molar de 0,074 mol_{3HV}/mol_{ác.prop.}.

Kim et al.⁴² verificaram o efeito do ácido propiônico na produção de P(3HB-*co*-3HV) por *A. eutrophus* ATCC 17699 a partir de frutose e ácido propiônico, sob limitação de nitrogênio. Relataram que o crescimento microbiano foi completamente inibido em concentrações de ácido propiônico maiores de 1,5 g/L e que a maior taxa de produção de unidades 3HV (0,06 g/g h) foi obtida quando a concentração de ácido foi de 0,5 g/L. Realizaram culturas em batelada mantendo essa concentração ótima de ácido propiônico durante a fase de acúmulo e obtiveram mais de 70 % de polímero com fração de unidades 3HV de 50 %.

Kim et al.⁴³ também analisaram a produção de copolímero em batelada alimentada com controle “on-line” da concentração de glicose. No momento da limitação em nitrogênio, quando a biomassa era de 60-70 g/L, a solução de alimentação foi alterada de glicose para uma mistura de glicose e ácido propiônico com razões P/G constantes variando de 0,17 a 0,52 (mol/mol). As concentrações de biomassa e P(3HB-co-3HV) finais diminuíram conforme aumentou a razão P/G. O teor de P(3HB-co-3HV) e a produtividade também caíram, de 74 para 56,5 % e de 2,55 para 1,64 g/Lh, respectivamente, com o aumento de P/G. A fração 3HV do copolímero aumentou continuamente até 14,3 mol% com o acréscimo de P/G, entretanto, a conversão de ácido propiônico em 3HV caiu de 0,344 para 0,293 g_{3HV}/g_{ác.prop.}. Relataram que o baixo conteúdo de PHA obtido com o aumento de P/G sugere que a maior quantidade de ácido propiônico inibe a síntese do polímero.

A produção de P(3HB-co-3HV), com *R. eutropha* DSM 545 a partir de glicose e propionato de sódio em batelada alimentada com limitação de nitrogênio e baixa concentração de oxigênio dissolvido, foi estudada por Lefebvre et al.⁴⁴. A adição de glicose e propionato de sódio foi feita de maneira descontínua, através de pulsos. Quando o teor de oxigênio dissolvido foi mantido entre 1 e 4 % de saturação de ar durante a fase de acúmulo, a fração molar de 3HV obtida no polímero foi de 27-31 mol% e a conversão de propionato em 3HV foi de 0,48 a 0,73 mol_{3HV}/mol_{prop.}, enquanto no experimento controle com 50 – 70 % de saturação de ar obteve-se valores menores, com 21 mol% de 3HV e conversão de propionato em 3HV de 0,25 mol_{3HV}/mol_{prop.}. Ambos experimentos resultaram em teor de PHA de 75 – 80 % do peso seco celular, entretanto, a produtividade foi um pouco menor com a utilização de baixas concentrações de oxigênio dissolvido. Segundo os autores, durante a fase de acúmulo do copolímero, *R. eutropha* incorpora o íon propionato, via propionil-CoA a unidades 3HV

após sua condensação com acetil-CoA, enquanto as unidades 3HB são formadas pela condensação de duas moléculas de acetil-CoA. No entanto, propionil-CoA pode perder um grupo carbonil gerando acetil-CoA, liberando CO₂ e assim resultando em unidades 3HB. Sendo que essa conversão de propionil-CoA a acetil-CoA requer 1,5 mol de oxigênio por mol de propionil-CoA, sugerem que a baixa concentração de oxigênio dissolvido utilizado limitou a descarbonilação do propionil-CoA, fazendo com que melhorasse sua conversão a unidades 3HV. Do ponto de vista econômico, esta estratégia levaria à redução de custos de produção, uma vez que necessitaria de menos aeração durante toda a fase de acúmulo, além de melhorar a conversão de propionato em 3HV, cujo custo é elevado para ser utilizado para produção de biomassa ou de unidades 3HB.

Marangoni⁴⁵ estudou diferentes estratégias de alimentação de ácido propiônico em diferentes substratos na produção de P(3HB-co-3HV) com *R. eutropha* DSM 545. Quando utilizou soro de leite, a estratégia de alimentação do ácido propiônico por pulsos obteve baixa produtividade porém com composição significativa de unidades 3HV, cerca de 38 %, com conversão de propionato em 3HV de 0,22 mol_{3HV}/mol_{ác. prop.}, sugerindo a possibilidade da existência de precursores de 3HV no soro. Com açúcar invertido, utilizou alimentação de ácido propiônico como regulação de pH, em pulsos de 1 g/L e de forma contínua, sendo que as frações molares de 3HV obtidas foram 17, 5 e 26 mol% 3HV, respectivamente. Quanto aos fatores de conversão foi obtido 0,03 mol_{3HV}/mol_{ác. prop.} para as estratégias de regulação de pH e pulsos e de 0,13 mol_{3HV}/mol_{ác. prop.} para a alimentação contínua mantendo a concentração de ácido propiônico em 0,4 g/L no meio.

Os efeitos de diferentes estratégias de alimentação de ácido propiônico na produção de P(3HB-co-3HV), com *R. eutropha* a partir de glicose e limitação em nitrogênio, foram estudados por Du et al.⁴¹. Experimentos em frascos agitados

revelaram que o momento e a concentração de ácido propiônico adicionado têm efeitos significantes no crescimento celular, na síntese de copolímero e na fração 3HV. Segundo os autores, quando o ácido propiônico foi adicionado muito cedo, na fase de crescimento, inibiu o crescimento celular e o acúmulo de polímero, especialmente em altas concentrações devido ao seu efeito tóxico, resultando em baixas concentrações de biomassa residual e concentração de polímero. Por outro lado, quando a adição foi muito tardia, grande quantidade de P(3HB) já havia sido sintetizada pelas células e a incorporação de 3HV foi relativamente baixa, pois a diminuição da síntese de polímero levou à fraca utilização do ácido propiônico. O momento ótimo de adição do ácido foi então, no início da limitação de nitrogênio e acúmulo de polímero. Neste caso, houve alta concentração de polímero com alta fração 3HV ao mesmo tempo. Em geral, com o aumento da concentração de ácido adicionado, houve aumento da fração 3HV porém a biomassa residual, a concentração de copolímero produzido e a conversão em unidades 3HV decresceram.

Nos experimentos em batelada alimentada, Du et al.⁴¹ utilizaram a alimentação contínua de ácido propiônico e glicose (P/G) na fase de acúmulo, pois a adição em pulsos poderia causar uma elevada concentração pontual no meio, levando à inibição do crescimento celular e da formação de polímero. A fonte de nitrogênio foi adicionada de forma a manter no meio uma razão carbono/nitrogênio igual a 50. Dessa forma, utilizaram diferentes razões de alimentação P/G. Uma baixa razão P/G=0,1 levou a altas concentrações de biomassa, teor de P(3HB-co-3HV) e produtividade, porém baixa fração de unidades 3HV. Uma maior razão P/G= 0,2, por outro lado, resultou em alta incorporação de unidades 3HV porém baixo teor de copolímero e produtividade. A taxa específica de produção de P(3HB-co-3HV) decresceu linearmente com o tempo, sendo que a maior taxa foi obtida com menor P/G, e a queda de produção mais acentuada

ocorreu em maior P/G, onde o acúmulo de ácido no meio pode ter inibido a síntese do polímero. A taxa específica de formação de 3HV foi maior inicialmente em maior razão P/G, onde havia mais ácido propiônico inicial para a formação das unidades. Porém, o acúmulo de ácido no meio inibiu a atividade metabólica resultando em rápido declínio desta taxa de formação. Os autores relatam que a capacidade das células utilizarem o ácido propiônico decresceu com o tempo, sendo que a alimentação em razões P/G constantes pode resultar em acúmulo de ácido, fato que não só desperdiça substrato caro como também inibe a síntese do polímero. Assim, a partir destes resultados, desenvolveram uma estratégia otimizada para a produção de copolímero. Nas primeiras dez horas de acúmulo, utilizaram a maior razão de alimentação P/G, ou seja, 0,2, nas quinze horas seguintes utilizaram $P/G = 0,15$ e nas últimas dez horas utilizaram $P/G = 0,1$. Assim obtiveram 52,1 g/l de biomassa, 40,8 g/l de P(3HB-co-3HV) perfazendo um total de 78,3 % do peso seco celular e fração molar de 3HV de 16,2 mol% com conversão de $0,38 \text{ mol}_{3\text{HV}}/\text{mol}_{\text{ác. prop.}}$. Dessa forma, a estratégia otimizada levou à minimização do acúmulo de ácido propiônico, aumento do teor de copolímero, da produtividade, com fração de 3HV em teores desejáveis técnica e comercialmente, sendo uma maneira simples e efetiva de produzir o copolímero sem desperdício de ácido propiônico e sendo assim, com redução de custos.

2.4.2 UTILIZAÇÃO DE SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS

Alguns pesquisadores têm estudado o uso de suplementos nutricionais, como ácido oleico no processo de produção do copolímero.

Choi e Lee⁴⁶ desenvolveram estratégias de cultura para produção de altas concentrações de P(3HB-co-3HV) com diferentes frações de 3HV por *E. coli* recombinante contendo genes de biossíntese de PHA de *A. latus*. Utilizando apenas

glicose e ácido propiônico (20mM), obtiveram baixo teor de PHA (42,5 %) com 10 mol% 3HV, conversão de ácido propiônico em 3HV de $0,23 \text{ g}_{3\text{HV}}/\text{g}_{\text{ac. prop.}}$ e grande acúmulo de ácido propiônico no meio, o que pode ter sido a razão para o relativo baixo teor de PHA obtido. Para estimular a assimilação do ácido propiônico, foram feitos experimentos utilizando indução com ácido acético e/ou suplementação com ácido oleico. Quando utilizaram indução com ácido acético, o mesmo foi a única fonte de carbono até determinado crescimento microbiano quando então foi adicionada glicose e ácido propiônico. Obtiveram 62,1 % de PHA com 15,3 mol% 3HV. No caso da suplementação com ácido oleico, relatam a produção de menos polímero (41,8 %), porém com maior fração de unidades 3HV (19,3 mol%). Em ambos os casos, mesmo em menor proporção, houve acúmulo de ácido propiônico no meio. Quando utilizaram ácido propiônico na concentração de 10 mM, ácido acético e ácido oleico, obtiveram 71,4 % de polímero com 14,8 mol% de 3HV, entretanto, os melhores resultados foram obtidos quando utilizaram concentrações ainda menores de ácido propiônico (5 mM) para reduzir o acúmulo, além da indução com ácido acético e suplementação com ácido oleico. Neste caso, obtiveram em 55 h, 203,1 g/L de concentração celular, 158,8 g/L de P(3HB-co-3HV) correspondente a 78,2 % do peso seco com 10,6 mol% de 3HV. O fator de conversão de ácido propiônico em unidades 3HV obtido foi de $0,47 \text{ g}_{3\text{HV}}/\text{g}_{\text{ac. prop.}}$, com produtividade de 2,88 g/L.h. Assim, puderam obter alta concentração e teor de polímero usando solução de alimentação com baixa concentração de ácido propiônico, porém com menor fração de 3HV. A indução com ácido acético aumentou a concentração de células, de polímero e a produtividade, enquanto a suplementação com ácido oleico levou principalmente ao aumento da fração 3HV no polímero. A conversão do ácido propiônico em unidades 3HV aumentou bastante com as estratégias utilizadas.

A influência da utilização do ácido oleico como suplemento nutricional na produção de P(3HB-co-3HV) em culturas de *R. eutropha* DSM 545, a partir de açúcar invertido, foi estudada por Marangoni et al.⁴⁷. Obtiveram aumento da produtividade do polímero de 0,14 para 0,28 g/L.h e também aumento de polímero acumulado, de 18,3 para 28,3 %, com a suplementação de ácido oleico. Entretanto, ao contrário de Choi e Lee⁴⁶, obtiveram menor fração de unidades 3HV, com igual conversão de ácido propiônico. Assim, relatam que o ácido oleico atuou como indutor de unidades 3HB, já que gera principalmente acetil-CoA, e como indutor da produção do polímero, sem alterar a conversão do ácido propiônico.

2.4.3 UTILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS RECOMBINANTES INCAPAZES DE CRESCER EM ÁCIDO PROPIÔNICO

O ácido propiônico é adicionado como cosubstrato precursor de unidades 3HV na produção do copolímero, porém, somente uma pequena fração dele é incorporada dessa forma ao biopolímero, sendo que o restante é desviado para outras rotas metabólicas como crescimento celular e formação de unidades 3HB.

Como o ácido propiônico ou o propionato de sódio são bem mais caros que as outras fontes de carbono que podem ser consumidas pelos microrganismos durante a fermentação, a otimização do seu aproveitamento na forma de unidades 3HV no copolímero é de grande importância na redução dos custos de produção⁴⁸.

Lee et al.⁴⁰ desenvolveram, a partir de *A. eutrophus* NCIMB 11599, uma cepa mutante *A. eutrophus* BK-23, que é incapaz de assimilar o ácido propiônico para o crescimento celular. As duas cepas foram comparadas quanto à habilidade de acumular P(3HB-co-3HV) e quanto à composição do polímero produzido. Os experimentos foram realizados em batelada alimentada utilizando a razão de alimentação P/G de 0,21 e

limitação em nitrogênio. Níveis finais similares de conteúdo de células e de copolímero foram obtidos para as culturas, entretanto, obtiveram, para a cepa mutante, uma fração de unidades 3HV duas vezes maior, sendo 22 mol% enquanto para a cepa original foi menor que 10 mol%. A taxa de conversão de ácido propiônico em unidades 3HV durante a fase de acúmulo foi de 0,4 g_{3HV}/g_{ac. prop.} para a mutante, contra 0,1 g_{3HV}/g_{ac. prop.} para a cepa original. Assim, relatam que com esse cepa torna-se possível produzir P(3HB-co-3HV) com maior fração de unidades 3HV, usando menos ácido propiônico.

Em estudo semelhante, Sartori³ obteve uma cepa mutante *A. eutrophus* UV1, derivada da *R. eutropha* DSM 545, que por não crescer em propionato está otimizada no seu aproveitamento para a biossíntese das unidades 3HV do copolímero. A cepa mutante UV1 acumulou 37 mol% de 3HV enquanto a cepa original acumulou apenas 8,6 mol% e mostrou-se capaz de converter 60,7 % de todo o propionato fornecido a unidades 3HV, sendo que, nas mesmas condições, a cepa original só converteu 18,5 %. Além disso, a cepa mutante ainda mantém, ou até supera, a capacidade de produção de polímero total da cepa original. Dessa forma, apresenta esse novo mutante como tendo um ótimo potencial de aproveitamento industrial.

Outro microrganismo que está sendo estudado para a produção de PHA's é *Burkholderia* sp⁴⁹. *Burkholderia* sp. IPT 101 é apresentada como boa produtora de polímero, entretanto, a conversão de ácido propiônico em unidades 3HV é restrita a menos de 10 % do rendimento máximo teórico, que é de 1,35 g g⁻¹ de acordo com Gomez et al.¹⁷. No intuito de aumentar essa eficiência de conversão e utilização do ácido propiônico, Silva et al.⁴⁸ desenvolveram mutantes da *Burkholderia* sp IPT 101 incapazes de crescer em ácido propiônico mas ainda capazes de acumular unidades 3HV do ácido. A mutante *Burkholderia* sp. IPT 189 e a cepa original foram comparadas crescendo em biorreator com razão de alimentação de ácido propiônico e sacarose (P/S)

de 0,44 para a cepa original e de 0,09 para a mutante, já que era esperado que a mutante tivesse melhor utilização do ácido propiônico. Com a mutante IPT 189 obtiveram uma alta taxa de conversão de ácido propiônico em unidades 3HV, de $1,2 \text{ g}_{3\text{HV}}/\text{g}_{\text{ac. prop.}}$, enquanto para a cepa original obtiveram apenas $0,05 \text{ g}_{3\text{HV}}/\text{g}_{\text{ac. prop.}}$. Entretanto, acumularam pouco polímero sendo cerca de 50 % para a IPT 189 e 65 % para a IPT 101. Relatam que a elucidação dos mecanismos de decréscimo do acúmulo de PHA na cepa mutante pode levar a novos rumos para garantir a redução de custos na produção de P(3HB-co-3HV) usando esta mutante e aplicando estratégias de cultivo adequadas.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As estratégias de produção de P(3HB) e de P(3HB-co-3HV) aqui abordadas, além de levar à redução dos custos de produção dos polímeros, também podem contribuir como base para novas pesquisas e desenvolvimentos na área.

Sendo a matéria-prima responsável por grande parte do custo dos PHA's, a utilização de substratos de baixo custo é uma importante estratégia para reduzir os seus custos de produção. Nesta área, o Brasil apresenta grande potencial de competitividade com o uso dos derivados da cana-de-açúcar. O uso desses substratos e a utilização de outras estratégias complementares, leva à significativa redução dos custos de produção de PHA's.

O momento da aplicação da limitação de nutriente exerce grande influência sobre a produção de polímero e a alimentação do elemento limitante, durante a fase de acúmulo, permite obter maior conteúdo de polímero e produtividade. Quanto aos elementos limitantes, a limitação em fósforo apresenta melhores resultados com *R. eutropha* e a limitação com oxigênio melhora a produção por *E. coli* recombinante.

Na produção do copolímero, o aumento da razão P/G leva à obtenção de maior fração de unidades 3HV, porém às custas da diminuição do conteúdo total de polímero e da produtividade. É necessário utilizar uma razão próxima a 0,2, que resulte ao mesmo tempo em um copolímero com fração de 3HV desejada tecnicamente e com maior conteúdo de polímero e produtividade, para que seja economicamente viável.

O ácido propiônico sendo um cosubstrato de alto custo precisa ser eficientemente convertido a unidades 3HV para não ser desperdiçado. Algumas estratégias desenvolvidas nessa área indicam que baixas concentrações de oxigênio dissolvido durante a fase de acúmulo por *R. eutropha* resultam em melhor aproveitamento do ácido propiônico em unidades 3HV, ou seja, maiores fatores de conversão. Ainda a utilização de suplementos nutricionais como ácido oleico aumenta a fração 3HV e a conversão do ácido propiônico em *E. coli* recombinante. A utilização de microrganismos recombinantes incapazes de crescer em ácido propiônico aumentou bastante a conversão do ácido em unidades 3HV e parece ser um caminho bem promissor na busca da redução de custos na produção do copolímero.

Dessa forma, o desenvolvimento de melhores estratégias de produção de PHA's está conseguindo, aos poucos, diminuir os seus custos, tornando-os mais competitivos. Este fato, aliado à necessidade de preservação ambiental, à maior conscientização da população e às importantes e diferenciais características dos PHA's, permitirá que, em futuro próximo, seu uso seja ampliado e os plásticos biodegradáveis possam estar presentes nas mais diversas aplicações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1- Gomez, J. G. C.; Bueno Netto, C. L.; *Rev. Bras. Eng. Quím.* **1997**, *17*, 24.

- 2- <http://www.uniemp.br/labjor/newsagosto2000.htm>, acessada em Junho de 2001.
- 3- Sartori, D. M.; *Dissertação de mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1998.
- 4- Madison, L. L.; Huisman, G. W.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 21.
- 5- Dawes, E.A.; Senior, P. J.; *Adv. Microbiol. Physiol.* **1973**, *10*, 135.
- 6- Lee, S. Y.; *Tibtech* **1996**, *14*, 431.
- 7- Byrom, D.; *Tibtech* **1987**, *5*, 246.
- 8- Ramsay, B. A.; Lomaliza, K.; Chavarie, C.; Dubé, B.; Bataille, P.; Ramsay, J.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 2093.
- 9- Brämer, C. O.; Vandamme, P.; Silva, L. F., Gomez, J. G. C.; Steinbüchel, A.; *Int. J. Syst. Bacteriol. Evol. Microbiol.* **2001**, *51*, 1709.
- 10- http://www.revistapesquisa.fapesp.br/show.php?id=revistas1.fapesp1..20021001.20021080..SEC7_4, acessada em Novembro de 2002.
- 11- Lee, S. Y.; *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49*, 1.
- 12- Choi, J.; Lee, S. Y.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 13.
- 13- Nonato, R. V.; Mantelatto, P. E.; Rossell, C. E.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *57*, 1.
- 14- <http://www.ipt.br/imprensa/midia/?ID=260>, acessada em Novembro de 2002.
- 15- <http://www.ipt.br/imprensa/midia/?ID=962>, acessada em Novembro de 2002.
- 16- Fava, A. L. B.; *Dissertação de mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1997.
- 17- Gomez, J. G. C.; Rodrigues, M. F. A.; Alli, R. C. P.; Torres, B. B.; Bueno Netto, C. L.; Oliveira, M. S.; Silva, L. F.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *45*, 785.
- 18- Yamane, T.; *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *41*, 165.
- 19- Wang, F.; Lee, S. Y.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 3703.
- 20- Grothe, E.; Moo-Young, M.; Chisti, Y.; *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 132.
- 21- Liu, F.; Li, W.; Ridgway, D.; Gu, T.; *Biotechnol. Lett.* **1998**, *20*, 345.

- 22- Beaulieu, M.; Beaulieu, Y.; Mélinard, J.; Pandian, S.; Goulet, J.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 165.
- 23- Pinto, R. O.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 1999.
- 24- Marangoni, C.; Furigo Jr., A.; Aragão, G. M. F.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2001**, *18*, 175.
- 25- Wong, H. H.; Lee, S. Y.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *50*, 30.
- 26- Kim, B. S.; *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 774.
- 27- Ahn, W.S.; Park, S.J.; Lee, S.Y.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3624.
- 28- Marangoni, C., Furigo Jr., A., Aragão, G. M. F., *Process Biochem.* **2002**, *38*, 137.
- 29- Fukui, T. E; Doi, Y.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *49*, 333.
- 30- Bitar, A. E; Underhill, S.; *Biotechnol. Lett.* **1990**, *12*, 563.
- 31- Suzuki, T.; Yamane, T.; Shimizu, S.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1986**, *24*, 366.
- 32- Aragão, G. M. F.; *These Doctorat*, L'institut National des Sciences appliquees de Toulouse, France, 1996.
- 33- Aragão, G. M. F.; Lindley, N. D.; Uribe Larrea, J. L.; Pareilleux, A.; *Biotechnol. Lett.* **1996**, *18*, 937.
- 34- Squio, C. R.; Marangoni, C.; De Vecchi, C.; Aragão, G. M. F.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 257.
- 35- Wang, F.; Lee, S. Y.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 4765.
- 36- Kim, B.S.; Lee, S.C.; Lee, S.Y.; Chang, H. N.; Chang, Y.K.; Woo, S.I.; *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 892.
- 37- Ryu, H.W.; Hahn, S.K.; Chang, Y.K.; Chang, H.N.; *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *55*, 28.
- 38- Choi, J.; Lee, S. Y.; Han, K.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 4897.
- 39- Holmes, P. A.; *Phys. Technol.* **1985**, *16*, 32.

- 40- Lee, S. Y.; Kim, G. J.; Choi, D. K.; Yeon, B. K.; Park, Y. H.; *J. Ferment. Bioeng.* **1996**, *81*, 255.
- 41- Du, G. C.; Chen, J.; Yu, J.; Lun, S.; *Biochem. Eng. J.* **2001**, *8*, 103.
- 42- Kim, J. H.; Kim, B. G.; Choi, C. Y.; *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14*, 903.
- 43- Kim, B. S.; Lee, S. C.; Lee, S. Y.; Chang, H. N.; Chang, Y. K.; Woo, S. I.; *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, *16*, 556.
- 44- Lefebvre, G.; Rocher, M.; Braunegg, G.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 827.
- 45- Marangoni, C.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2000.
- 46- Choi, J. E Lee, S.Y.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 4363.
- 47- Marangoni, C.; Furigo Jr., A.; Aragão, G. M. F.; *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22*, 1635.
- 48- Silva, L. F.; Gomez, J. G. C.; Oliveira, M. S.; Torres, B. B.; *J. Biotechnol.* **2000**, *76*, 165.
- 49- Gomez, J. G. C.; Fontolan, V.; Alli, R. C. P.; Rodrigues, M. F. A.; Bueno Netto, C. L.; Silva, L. F.; Simões, D. A.; *Rev. Microbiol.* **1997**, *28*, 43.