

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

Mélodi Schmidt

**PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) POR
Cupriavidus necator DSM 545 EM MEIO SUPLEMENTADO
COM ÓLEO DE SOJA MINIEMULSIONADO**

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

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

Co-orientador: Prof. Dr. Willibaldo Schmidell

Florianópolis/SC
Abril de 2011

Mélodi Schmidt

**PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) POR
Cupriavidus necator DSM 545 EM MEIO SUPLEMENTADO
COM ÓLEO DE SOJA MINIEMULSIONADO**

Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Florianópolis, 29 de abril de 2011.

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

Prof. Dr. Willibaldo Schmidell
Co-Orientador

Banca Examinadora:

Prof.^a, Dr.^a Andrea Lima dos Santos Schneider

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Dr.^a Manuela Manuela Camino Feltes

Dedico este trabalho ao Grupo PHB:
Gláucia, Willibaldo, Jaciane, Kelin, Kellen, Andrea,
Jorge, Camila, Murilo, Lauren e Willian, obrigada por
toda a ajuda e apoio durante a realização deste trabalho, a
participação de vocês foi fundamental para que cada
etapa fosse concluída com êxito. Divido com vocês agora
a vitória da finalização deste trabalho.

Mãe e Pai,
A finalização deste trabalho só foi possível por vocês
sempre acreditarem em mim e me incentivarem a
continuar lutando, mesmo que a luta seja difícil e nem
sempre vejamos a recompensa que mais tarde ela nos
trará. Obrigada por vocês entenderem a distância, muitas
vezes imposta, e pelo carinho incondicional que sempre
me foi dado.
Amo vocês!

*"Vem por aqui" - dizem-me alguns com os
olhos doces
Estendendo-me os braços, e seguros
De que seria bom que eu os ouvisse
Quando me dizem: "vem por aqui!"
Eu olho-os com olhos lassos,
(Há, nos olhos meus, ironias e cansaços)
E cruzo os braços,
E nunca vou por ali...*

*Não, não vou por aí! Só vou por onde
Me levam meus próprios passos...*

*Se ao que busco saber nenhum de vós
responde
Por que me repetis: "vem por aqui!"?
Prefiro escorregar nos becos lamacentos,
Redemoinhar aos ventos,
Como farrapos, arrastar os pés
sangrentos,
A ir por aí...*

*Se vim ao mundo, foi
Só para desflorar florestas virgens,
E desenhar meus próprios pés na areia
inexplorada!
O mais que faço não vale nada.*

*Ah, que ninguém me dê piedosas
intenções!
Ninguém me peça definições!
Ninguém me diga: "vem por aqui!"
A minha vida é um vendaval que se soltou.
É uma onda que se alevantou.
É um átomo a mais que se animou...
Não sei por onde vou,
Não sei para onde vou
Sei que não vou por aí!*

Trecho de "Cântico Negro",
do poeta português
José Régio (1901-1969)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que são meus pilares de sustentação, foram e serão sempre meus exemplos para tudo na vida, me dando força todas as vezes que fraquejei e pensei em desistir.

À professora Gláucia que aceitou me orientar, e acreditou em mim mesmo quando nem eu mesma sabia se era isso que eu realmente queria. Obrigada pela amizade, paciência, compreensão, disponibilidade e presença durante todo este período.

Ao professor Willibaldo que sempre contribuiu no desenvolvimento deste trabalho, dando idéias, sugestões e ajudando a elucidar as dúvidas que foram surgindo no caminho.

A todas as pessoas que passaram pelo grupo PHB, obrigada pela ajuda e pelos momentos que passamos juntos, rindo, chorando, contando histórias e claro, trabalhando.

Jaci, obrigada por todo o conhecimento que você me repassou ao longo destes dois anos de trabalho, sem a tua paciência e vontade de ensinar, eu não teria chegado até aqui.

Kelin e Kellen, muito obrigada por tudo, não só pelas horas e horas de ajuda dentro do laboratório, mas também por toda a amizade e carinho que vocês me ofereceram nos momentos mais difíceis.

Naira, Ieda e Henry, obrigada simplesmente por vocês existirem na minha vida. Vocês fizeram com que a minha vida fosse muito mais feliz nestes sete anos de amizade!

Jhenifer, não sei se agradeço a você ou a Deus por ter colocado você na minha vida, apesar de todo o teu mau humor e de você nunca me deixar te dar um abraço, você sempre me deu força e me apoiou em tudo que eu tive vontade de fazer.

Aos meus amigos maravilhosos, que sempre entenderam minha ausência. A gente pode não morar mais na mesma cidade, mas as brincadeiras de criança, as confissões de adolescentes e as dúvidas do início da vida adulta vão ficar sempre em nossas lembranças, em nossos corações e nas reuniões de final de ano.

A todos os colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica – ENGEBIO, que não mediram esforços para me auxiliar quando surgiram as dúvidas. Também pela amizade, pelas conversas, experiências compartilhadas, almoços, jantas, enfim, por todos os bons momentos que passamos juntos.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos pela oportunidade de desenvolver meu mestrado nesta instituição.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro ao longo do mestrado.

Por fim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram e me deram apoio no decorrer da Pós-graduação, tornando possível a conclusão desta dissertação de mestrado.

RESUMO

Poli(3-hidroxiobutirato) P(3HB) é um produto intracelular produzido por inúmeros micro-organismos, como reserva energética. *Cupriavidus necator* é a bactéria mais estudada para a produção deste polímero devido à sua capacidade de acumular até 80 % de sua massa seca em P(3HB). Devido aos altos custos de produção, melhorias no processo produtivo são necessárias para que este polímero seja comercialmente competitivo. Estudos já mostraram que a utilização de suplementos ou indutores da produção de P(3HB), como os óleos vegetais, é uma alternativa interessante para aumento de produtividade em polímero. Diversos óleos vegetais *in natura* já foram testados e apresentaram bons resultados, porém uma alternativa que pode potencializar estes resultados é a suplementação do meio com óleos miniemulsionados, que apresentam maior área de contato entre o óleo e a água. Neste contexto, o presente trabalho objetivou comparar o efeito da suplementação do meio de cultivo com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, com lecitina de soja, na produção de P(3HB) por *C. necator*. Os resultados mostraram que a concentração equivalente a $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido oléico promoveu maior aumento de produtividade de polímero do que a concentração equivalente a $0,6 \text{ g.L}^{-1}$. O momento para a suplementação do meio de cultivo foi determinado a partir da análise de atividade enzimática, que mostrou que a adição do suplemento deve ser realizada quando a concentração de nitrogênio no meio é igual a $0,4 \text{ g.L}^{-1}$, pois adicionando o suplemento neste momento, a atividade enzimática alcança valores máximos. Nos cultivos em biorreator, houve aumento de produtividade em ambos os cultivos suplementados, sendo que para a suplementação com o óleo *in natura* o aumento foi de $0,23 \text{ g.h}^{-1}$, e para a miniemulsão foi de $0,29 \text{ g.h}^{-1}$, ou seja, a miniemulsão não proporcionou melhores resultados. Este comportamento ocorreu provavelmente pelo fato de que a estabilidade das partículas de óleo na miniemulsão dificultaram o consumo deste substrato pelo micro-organismo. Os dados de transferência de oxigênio mostraram um comportamento análogo, para os cultivos controle e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, entre a velocidade de respiração microbiana (QO_2X) e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La). Primeiramente houve um crescimento em ambas as curvas até o início da fase estacionária de crescimento microbiano e posteriormente as curvas decresceram, pois o oxigênio é utilizado em sua maioria, para a manutenção celular, uma vez que o

crescimento microbiano é mínimo nesta etapa. O modelo de Zabriskie e Humphrey (1978) pode ser utilizado como uma ferramenta na predição da biomassa celular ao longo do cultivo. O modelo se ajustou bem aos dados experimentais quando o fator de conversão ($Y_{X/O}$) e a velocidade específica de consumo de oxigênio dissolvido para manutenção celular (m_o) foram calculados em duas fases distintas, uma de crescimento e outra de produção. No caso do cultivo considerado inteiro os valores de MSE, para os ajustes do modelo aos dados experimentais, dos cultivos controle e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado foram respectivamente de 1,41, 6,54 e 5,95, enquanto os valores para o cultivo considerado em duas fases distintas foram de 2,14, 0,58 e 1,12, respectivamente, para os cultivos controle e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado. Esta separação promoveu melhores resultados na predição da biomassa, pois a respiração microbiana é diferente nas duas fases. Os resultados deste trabalho mostraram que as suplementações do meio de cultivo com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, com lecitina de soja, nas condições estudadas, promoveram resultados semelhantes em termos de aumento de produtividade em polímero. Assim, a suplementação com óleo de soja *in natura* é preferível, pois o óleo não precisa passar por uma etapa de preparação antes da suplementação, o que acarreta custos ao processo.

Palavras-chave: Poli(3-hidroxi-butarato), suplementos nutricionais, óleo de soja, miniemulsão.

ABSTRACT

Poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB)) is an intracellular product produced by several microorganisms as energy source. *Cupriavidus necator* is the most studied bacterium for the production of this polymer due to its ability to accumulate up to 80 % of its dry weight in P(3HB). Due to high production costs, improving the production process is necessary to allow this polymer to be commercially competitive. Studies have shown that the use of supplements or inductors the production of P(3HB), like soybean oil, is an interesting alternative to increase the productivity on polymer. Several vegetable oils *in natura* have been tested and showed good results, but an alternative that can influence these results is the supplementation of the culture medium with miniemulsion oils, which have a larger contact area between oil and water. In this context, this study compares the effect of culture medium supplementation with *in natura* and miniemulsified soybean oil, with soy lecithin, on P(3HB) production by *C. necator*. The results showed that the equivalent concentration of 0.3 g.L⁻¹ in oleic acid promoted higher polymer productivity than the equivalent concentration of 0.6 g.L⁻¹. The best moment for culture supplementation medium was determined from the analysis of enzymatic activity, which showed that the addition of the supplement should be made when the concentration of nitrogen in the culture medium was 0.4 g.L⁻¹, since adding the supplement at this time, the enzyme activity achieves maximum values. Experiments in bioreactor increased the productivity in both cultures supplemented, for the *in natura* and miniemulsion soybean oil supplementation the increase of productivity was 0.23 g.h⁻¹ and 0.29 g.h⁻¹, respectively, in other words, the miniemulsion did not provide better results. This behavior occurred probably because the stability of oil particles in miniemulsion, making difficult the consumption of substrate by the microorganism. The data of oxygen transfer showed a behavior similar, for the cultures without supplementation and supplemented with soybean oil *in natura* and miniemulsified, to the oxygen uptake rate (QO₂X) and the volumetric oxygen transfer coefficient (K_La). First there was an increase in both curves until the early stationary phase of bacterial growth and subsequently decreased, because oxygen is used mostly for cellular maintenance, since bacterial growth is minimal at this step. The model proposed by Zabriskie and Humphrey (1978) could be used as a tool for predicting the cellular biomass during the cultivation. The model fits well the experimental data when the yield (Y_{X/O}) and the maintenance

coefficient for oxygen (m_o) were calculated in two distinct phases, one of growth and other of production. When the cultivations were not separate, the MSE values for model fitting to experimental data, for control, *in natura* and miniemulsified soybean oil supplementation cultivations were respectively 1.41, 6.54 and 5.95, while the MSE values for cultivations separated in two distinct phases were 2.14, 0.58 and 1.12, respectively, for control, *in natura* and miniemulsified soybean oil supplementation cultivations. This separation promoted better results in the prediction of cellular biomass because the bacterial respiration is different in these two phases. The results of this study showed that supplementation of culture medium with soybean oil *in natura* and miniemulsion soybean oil, with soy lecithin, under the studied conditions, promoted similar productivity increase in polymer. Therefore, supplementation with soybean oil *in natura* is preferable, because the oil does not need any preparation before supplementation.

Keywords: Poli(3-hydroxybutyrate), nutritional supplements, soybean oil, miniemulsion.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1** Estrutura geral dos PHAs, onde “n” representa o número de monômeros presentes na estrutura do polímero, e “R” representa a posição onde um radical é introduzido na estrutura (LEE, 1996b)..... 34
- Figura 2.2** Vias metabólicas para síntese de PHA. Abreviações: PhaA – 3-cetotiolase; PhaB – (R)-3-cetoacil-CoA redutase (para biossíntese de P(3HB) esta enzima é acetoacil-CoA redutase); PhaC – PHA sintase ou polimerase; PhaG – (R)-3-hidroxiacil-CoA:ACP transacilase; PhaJ – enoil-CoA hidratase (R) específica. As linhas tracejadas representam passos metabólicos não incluídos. PhaC é específica para monômeros na configuração (R). (Figura adaptada de ALDOR e KEASLING, 2003). 42
- Figura 2.3** Estrutura química da lecitina de soja (FELTES, 2011)..... 48
- Figura 3.1** Fluxograma de processo para a obtenção das miniemulsões. 54
- Figura 3.2** Ilustração para explicar o método dinâmico utilizado para determinar K_{La} e QO_2 (adaptado por SCHMIDELL, 2001)..... 64
- Figura 4.1** Concentração de células totais (X_t) ao longo dos cultivos sem suplementação e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado nas concentrações de 0,3 e 0,6 g.L⁻¹ de ácido oléico. As linhas representam o ajuste pelo *software* Lissage..... 72
- Figura 4.2** Concentração de biopolímero (P(3HB)) ao longo dos cultivos sem suplementação e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado nas concentrações de 0,3 e 0,6 g.L⁻¹ de ácido oléico. As linhas representam o ajuste pelo *software* Lissage. ... 73
- Figura 4.3** Produtividade global para o cultivo controle e para os cultivos suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado nas concentrações de 0,3 e 0,6 g.L⁻¹ de ácido oléico.75
- Figura 4.4** Velocidade específica de produção de P(3HB) pra cultivo controle e para os cultivos suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado nas concentrações de 0,3 e 0,6 g.L⁻¹ de ácido oléico.76
- Figura 4.5** Dados obtidos ao longo do cultivo controle, onde (▲) representa a biomassa total (X_t), (■) representa a produção de

P(3HB) e (—) representa a biomassa residual (Xr). A linha contínua representa os ajustes feitos pelo *software* Lissage.....78

Figura 4.6 Dados obtidos ao longo do cultivo suplementado com óleo de soja miniemulsionado, no momento da exaustão da fonte de nitrogênio, onde (▲) representa a biomassa total (Xt), (■) representa a produção de P(3HB) e (—) representa a biomassa residual (Xr). A linha contínua representa os ajustes feitos pelo *software* Lissage e a linha pontilhada representa o momento da adição do suplemento.79

Figura 4.7 Atividade enzimática dos cultivos controle e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, quando a concentração de nitrogênio era aproximadamente 0,5 g.L⁻¹, 0,4 g.L⁻¹ e 0,2 g.L⁻¹82

Figura 4.8 Atividade enzimática dos cultivos controle e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, considerando o tempo “0” como sendo o momento da adição do suplemento.83

Figura 4.9 Dados obtidos ao longo do cultivo suplementado com óleo de soja *in natura* (A) e miniemulsionado (B), no momento da limitação da fonte de nitrogênio, onde (▲) representa a biomassa total (Xt), (■) representa a produção de P(3HB) e (—) representa a biomassa residual (Xr). A linha contínua representa os ajustes feitos pelo *software* Lissage e a linha pontilhada representa o momento da adição do suplemento.85

Figura 4.10 Evolução da biomassa total (A) e da produção de P(3HB) (B), para os cultivos controle (◆), suplementado com óleo de soja *in natura* (■), e suplementado com óleo de soja miniemulsionado(▲). A linha contínua representa os ajustes feitos pelo *software* Lissage, a linha pontilhada representa o momento da suplementação com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado.86

Figura 4.11 Velocidade específica de produção de P(3HB) ao longo do tempo para os cultivos controle (—), suplementado com óleo de soja *in natura* (-----), e suplementado com óleo de soja miniemulsionado (- - - - -). A linha pontilhada representa o momento da suplementação com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado.87

Figura 4.12 Produtividade global de P(3HB) ao longo do tempo para os cultivos controle (————), suplementado com óleo de soja *in natura* (-----), e suplementado com óleo de soja miniemulsionado (- - - - -). A linha pontilhada representa o momento da suplementação com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado. 88

Figura 4.13 Atividade enzimática ao longo do tempo para os cultivos controle (●), e suplementados com óleo de soja *in natura* (■), e miniemulsionado (▲). A linha pontilhada representa o momento da suplementação do óleo de soja. 91

Figura 4.14 Variação da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo, após aplicação do método dinâmico para determinação dos parâmetros respiratórios no cultivo suplementado com óleo de soja *in natura*. 94

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 3.1 Proporções da mistura de óleo vegetal, lecitina de soja e água destilada para obtenção da miniemulsão a ser suplementada em cultivos para a produção de poli(3-hidroxitbutirato). | 54 |
| Tabela 3.2 Volumes de amostra e reagente utilizados na quantificação de nitrogênio..... | 57 |
| Tabela 3.3 Volumes de amostra e reagente utilizados na determinação da atividade enzimática. | 58 |
| Tabela 4.1 Variação do tamanho médio das partículas de miniemulsão em relação a diferentes tempos de ultrassonificação e diferentes concentrações de lecitina de soja. | 69 |
| Tabela 4.2 Variação do tamanho médio das partículas de miniemulsão em relação ao tempo, para diferentes concentrações de lecitina de soja, com dois minutos de sonificação e 70 % de amplitude. | 70 |
| Tabela 4.3 Composição química do óleo de soja da marca LEVE e valores de referência recomendados pela ANVISA para óleos de soja em geral. | 71 |
| Tabela 4.4 Dados finais de % P(3HB) (m/v), produtividade global e produtividade da fase de produção para os cultivos controle e suplementados com óleo de soja <i>in natura</i> e miniemulsionado. | 74 |
| Tabela 4.5 Dados finais de biomassa total (X_t), produção de P(3HB) e porcentagem de P(3HB), para os cultivos controle e suplementados com óleo de soja <i>in natura</i> e miniemulsionado, em diferentes concentrações de nitrogênio. | 81 |
| Tabela 4.6 Fatores de conversão de glicose/frutose em célula ($Y_{Xr/S}$) para as fases de crescimento e de produção, glicose/frutose em P(3HB) ($Y_{P(3HB)/S}$) e nitrogênio em célula ($Y_{Xr/N}$), para os cultivos controle e suplementados com óleo de soja <i>in natura</i> e minimeulsionado. | 89 |
| Tabela 4.7 Fator de conversão de oxigênio em célula ($Y_{X/O}$) e velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção celular (m_o) para os cultivos controle, suplementado com óleo de soja <i>in natura</i> e miniemulsionado. | 101 |

Tabela 4.8 Índices estatísticos calculados para os ajustes do modelo proposto por Zabriskie e Humphey (1978) aos dados experimentais de X_r para os cultivos controle, suplementado com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado..... 101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------|--|
| 3HV | 3-hidroxicvalerato |
| Abs | Absorbância |
| ADP | Adenosina difosfato |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ART | Açúcares redutores totais |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| CN | Caldo nutriente |
| CoASH | Coenzima A |
| DLS | <i>Dynamic light scattering</i> (espalhamento dinâmico de luz) |
| DNS | Dinitrosalicílico |
| FE | Fator de exatidão |
| MSE | <i>Mean squared error</i> (erro médio quadrático) |
| MM | Meio mineral |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato |
| OD | Oxigênio dissolvido |
| P(3HB) | Poli(3-hidroxiacetato) |
| P(3HB-co-3HV) | Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxicvalerato) |
| P(3HB-co-4HB) | Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato) |
| PHAs | Poli-hidroxiácido |
| PHA _{LCL} | Poli-hidroxiácido de cadeia longa |
| PHA _{MCL} | Poli-hidroxiácido de cadeia média |
| PHA _{SCL} | Poli-hidroxiácido de cadeia curta |
| R ² | Coefficiente de correlação |
| rpm | Rotações por minuto |
| vvm | Volume de ar por volume de meio por minuto |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----------------------|---|
| C | Concentração de oxigênio no seio do líquido ($\text{gO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) |
| $C_{\text{crít}}$ | Concentração crítica de O_2 dissolvido no líquido ($\text{gO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) |
| C_s | Concentração de saturação de O_2 dissolvido no líquido ($\text{gO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) |
| $K_{L,a}$ | Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1}) |
| (m/m) | Relação massa/massa |
| (m/v) | Relação massa/volume |
| m_o | Velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção celular ($\text{gO}_2\cdot\text{g}_{\text{cel}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) |
| Pr | Produtividade global de P(3HB) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) |
| $Pr_{\text{P(3HB)}}$ | Produtividade na fase de produção de P(3HB) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) |
| QO_2 | Velocidade específica de respiração ($\text{mgO}_2\cdot\text{g}_{\text{cel}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) |
| QO_2X | Velocidade de respiração celular ($\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) |
| X_r | Biomassa residual ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e/ou g) |
| X_t | Biomassa total ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e/ou g) |
| $Y_{\text{P(3BH)/S}}$ | Fator de conversão da fonte de carbono em P(3HB) ($\text{g}_{\text{P(3HB)}}\cdot\text{g}_S^{-1}$) |
| $Y_{X_r/O}$ | Fator de conversão de oxigênio para células ($\text{g}_{X_r}\cdot\text{gO}_2^{-1}$) |
| $Y_{X_r/S}$ | Fator de conversão da fonte de carbono em célula ($\text{g}_{X_r}\cdot\text{g}_S^{-1}$) |
| $Y_{X_r/N}$ | Fator de conversão da fonte de nitrogênio em célula ($\text{g}_{X_r}\cdot\text{g}_N^{-1}$) |
| $\mu_{\text{máx}}$ | Velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1}) |
| μ_{PHB} | Velocidade específica de produção de P(3HB) (h^{-1}) |
| μ_{X_r} | Velocidade específica de crescimento celular (h^{-1}) |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 29 |
| 1.1 Objetivos..... | 30 |
| 1.1.1 Objetivo Geral | 30 |
| 1.1.2 Objetivos Específicos | 30 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 33 |
| 2.1 O impacto dos polímeros no meio ambiente | 33 |
| 2.2 Poli-hidroxicarboxilatos | 33 |
| 2.2.1 Características e propriedades dos Poli-hidroxicarboxilatos..... | 33 |
| 2.2.2 Micro-organismos capazes de produzir Poli-hidroxicarboxilatos (PHAs)..... | 35 |
| 2.2.3 <i>Cupriavidus necator</i> | 36 |
| 2.2.4 Substratos de baixo custo para produção de Poli-hidroxicarboxilatos..... | 36 |
| 2.2.5 Utilização de suplementos nutricionais para a produção de PHAs..... | 38 |
| 2.3 Transferência de oxigênio..... | 40 |
| 2.3.1 Previsão da biomassa através dos parâmetros respiratórios..... | 40 |
| 2.4 Vias metabólicas para produção de Poli-hidroxicarboxilatos | 41 |
| 2.4.1 β -cetotiolase (phaA) | 42 |
| 2.4.2 Acetoacetil-CoA redutase (phaB)..... | 43 |
| 2.4.3 PHA sintase (phaC) | 44 |
| 2.4.4 Biossíntese de PHA de cadeia curta (PHASCL)..... | 45 |
| 2.4.5 Biossíntese de PHA de cadeia média (PHAMCL) | 45 |
| 2.5 Emulsões..... | 46 |
| 2.5.1 Miniemulsões..... | 46 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 51 |
| 3.1 Micro-organismo e meio de cultivo..... | 51 |
| 3.2 Condições de cultivo | 51 |
| 3.2.1 Cultivos em frascos agitados | 51 |
| 3.2.2 Cultivos em biorreator | 52 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3 Suplementações do meio de cultivo | 52 |
| 2.3.1 Suplementação com óleo de soja..... | 52 |
| 3.3.2 Suplementação com miniemulsão | 52 |
| 3.3.3 Análise de composição química do óleo de soja | 53 |
| 3.3.4 Preparo da miniemulsão | 53 |
| 3.4 Técnicas analíticas..... | 55 |
| 3.4.1 Amostragem | 55 |
| 3.4.2 Determinação da concentração de biomassa | 55 |
| 3.4.3 Determinação de açúcares redutores totais..... | 56 |
| 3.4.4 Determinação de nitrogênio | 56 |
| 3.4.5 Determinação da atividade enzimática..... | 57 |
| 3.4.6 Determinação da concentração de P(3HB)..... | 59 |
| 3.5 Tratamento dos dados..... | 59 |
| 3.5.1 Produtividade global de P(3HB) | 60 |
| 3.5.2 Produtividade da fase de produção de P(3HB)..... | 60 |
| 3.5.3 Velocidades específicas de crescimento celular e produção de P(3HB) | 61 |
| 3.5.4 Fatores de conversão | 61 |
| 3.5.5 Determinação do oxigênio dissolvido | 62 |
| 3.5.6 Transferência e consumo de oxigênio durante o cultivo: determinação do KLa e QO2..... | 62 |
| 3.5.7 Velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção celular e fator de conversão de oxigênio em células..... | 64 |
| 3.5.8 Determinação da biomassa residual a partir dos parâmetros respiratórios..... | 65 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 69 |
| 4.1 Preparo da miniemulsão | 69 |
| 4.1.1 Tempo de ultrassonificação..... | 69 |
| 4.1.2 Estabilidade da miniemulsão | 70 |
| 4.2 Composição Química do óleo de soja LEVE | 71 |
| 4.3 Ensaios preliminares em frascos agitados | 72 |
| 4.4 Ensaios preliminares em biorreator | 77 |
| 4.4.1 Cultivo controle..... | 78 |

| | |
|--|------------|
| 4.4.2 Cultivo suplementado com óleo de soja miniemulsionado no momento da exaustão de nitrogênio | 78 |
| 4.5 Avaliação da atividade enzimática em função da suplementação do meio | 80 |
| 4.6 Cultivos suplementados com óleo de soja in natura e miniemulsionado | 83 |
| 4.6.1 Transferência de oxigênio para os cultivos controle e suplementados com óleo de soja in natura e miniemulsionado | 92 |
| 4.7 Previsão da biomassa a partir do QO2X | 98 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 105 |
| 6 SUGESTÕES | 107 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 109 |
| APÊNDICE | 121 |

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos de origem petroquímica vêm surgindo como substitutos de diversos materiais, como vidro, metal, entre outros. Este uso cada vez mais intenso e a forma incorreta de descarte deste material estão causando muitos problemas ambientais. Frente a isto, algumas alternativas vêm sendo estudadas, entre elas a produção de plásticos biodegradáveis (SILVA et al., 2007)

Os poli-hidroxicanoatos (PHAs) são polímeros totalmente biodegradáveis, biocompatíveis, atóxicos e que se destacam como substitutos dos polímeros derivados do petróleo. Dentre os PHAs, o poli(3-hidroxi-butarato) (P(3HB)) é um dos biopolímeros mais estudados devido às suas características termoplásticas e mecânicas similares às do polipropileno. Este biopolímero é sintetizado por via microbiana, na forma de grânulos intracelulares, como reserva de carbono e energia, sendo que muitos são os micro-organismos capazes de produzi-lo (REDDY et al., 2003).

Dentre os micro-organismos, *Cupriavidus necator* é uma das bactérias que apresenta as condições mais favoráveis à produção industrial de P(3HB), pois, além da capacidade de acumular grandes quantidades de sua massa seca em polímero, também assimila diferentes tipos de substratos, como glicose, frutose e ácidos orgânicos. O processo produtivo utilizando esta bactéria é conduzido em duas etapas, uma etapa de crescimento onde o meio de cultivo está balanceado, e outra etapa de produção, onde um dos nutrientes essenciais à célula, que não seja a fonte de carbono, é exaurido do meio, ou mantido em níveis mínimos, o que favorece o acúmulo intracelular do biopolímero (RAMSAY, 1994).

Apesar das inúmeras vantagens dos polímeros biodegradáveis, os custos com substrato, processos produtivo e *downstream* fazem com que os PHAs não sejam comercialmente competitivos em relação aos polímeros derivados do petróleo. Sendo assim, o aumento da produtividade e a redução dos custos de produção são necessários (LEE, 1996a; RAMSAY, 1994).

A suplementação dos meios de cultivo pode interferir na via metabólica dos micro-organismos produtores de PHAs, proporcionando maior produção de células e agindo diretamente na síntese do polímero. Em trabalhos reportados na literatura, constatou-se que cultivos suplementados com os ácidos oléico e linoléico, presentes em óleos vegetais, são efetivos no aumento de produtividade de P(3HB) (SQUIO,

2003; SCHNEIDER, 2006; DALCANTON et al., 2010;). Além do aumento de produtividade, Scheneider et al. (2010) afirmam que a suplementação do meio de cultivo com óleos vegetais influencia na composição final do polímero, reduzindo sua cristalinidade e, assim, proporcionando uma cinética de biodegradação mais rápida.

Quando óleos vegetais ou ácidos graxos puros são adicionados ao meio de cultivo, ocorre a indução da produção e excreção da enzima lipase pela bactéria *C. necator*. Assim, os ácidos graxos podem ser hidrolisados e assimilados pelo micro-organismo para produção de células ou de polímero, interferindo diretamente na produtividade do processo (KAHAR et al., 2004).

Uma possível forma de aperfeiçoar este processo é a obtenção de uma miniemulsão do óleo vegetal. Na miniemulsão, as partículas de óleo tornam-se menores, com tamanho variando entre 50 e 500 nm, e o agente emulsificante utilizado evita a coalescência das micelas (LANDFESTER et al., 1999). Desta forma, a área superficial disponível para o consumo deste substrato pelo micro-organismo é aumentada e, possivelmente, a conversão em biopolímero ocorre de forma acelerada.

A previsão da biomassa residual ao longo do cultivo deve ser precisa, pois assim, é possível controlar de forma mais adequada a concentração dos substratos no meio e garantir que o processo se comporte como o esperado no estudo em questão. Zabriskie e Humphrey (1978) desenvolveram um modelo capaz de prever a biomassa residual através dos dados de respiração microbiana. Este modelo já mostrou bons resultados quando aplicado em culturas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (SILVEIRA e MOLINA, 2005).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Frente ao exposto, o objetivo geral deste trabalho foi estudar a influência da adição de óleo de soja miniemulsionado sobre o processo de produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator*, a partir de meio sintético de glicose/frutose.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Obter uma miniemulsão estável a partir de óleo de soja, água destilada e lecitina de soja;

- Analisar a composição química do óleo de soja para determinar o volume de óleo a ser adicionado nos cultivos suplementados;
- Comparar a produtividade de cultivos realizados em frascos agitados, com suplementação de óleo de soja *in natura* (sem tratamento) e miniemulsionado, em diferentes concentrações equivalentes em ácido oléico;
- Estudar a atividade enzimática ao realizar a suplementação do óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, na melhor concentração definida, em diferentes momentos ao longo dos cultivos (realizados em frascos agitados), a fim de determinar o melhor momento para a suplementação;
- Realizar cultivos em biorreator, nas melhores condições definidas, para obter resultados mais confiáveis, devido às melhores condições de controle do processo;
- Comparar os dados cinéticos e o comportamento dos parâmetros respiratórios ao longo dos cultivos controle e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, realizados em biorreator;
- Estimar a concentração celular através de dados da velocidade específica de respiração de *Cupriavidus necator* nos cultivos sem suplementação, e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O impacto dos polímeros no meio ambiente

Os materiais plásticos, derivados do petróleo, vêm sendo utilizados cada vez mais na vida cotidiana, devido às suas propriedades mecânicas e resistência química. No ano de 2008, foram produzidas 245 milhões de toneladas de plástico no mundo, sendo que aproximadamente 50 % deste material foi utilizado em embalagens (ABIPLAST, 2010). O maior problema associado a estes polímeros é sua disposição de forma inadequada no meio ambiente, o que dificulta a circulação de gases e líquidos nos aterros sanitários, influenciando diretamente na decomposição da matéria orgânica. Por este motivo, o desenvolvimento de novos materiais plásticos, que apresentem menor impacto ambiental, tem motivado o estudo dos polímeros biodegradáveis (LEE et al., 2008).

Dentre os biopolímeros destacam-se os poli-hidroxicanoatos (PHAs), por possuírem propriedades semelhantes aos materiais termoplásticos, por serem biodegradáveis e passíveis de serem produzidos a partir de matérias-primas renováveis, oferecendo a possibilidade de um ciclo fechado e, conseqüentemente, minimizando o impacto ambiental (KAHAR et al., 2004)

2.2 Poli-hidroxicanoatos

Os poli-hidroxicanoatos são polímeros biodegradáveis que podem ser produzidos por inúmeros micro-organismos como forma de reserva energética. Os PHAs apresentam massa molar elevada, por isso, apresentam características similares às dos polímeros derivados do petróleo. Além disso, são completamente degradados a água e dióxido de carbono sob condições aeróbias, e a metano e água sob condições anaeróbias (REDDY et al., 2003). Esta degradação ocorre, pois inúmeros micro-organismos são capazes de excretar, no meio em que se encontram, enzimas despolimerases que hidrolisam o PHA em oligômeros solúveis em água e em monômeros que podem ser utilizados como nutrientes pela célula (ABE e DOI, 1999).

2.2.1 Características e propriedades dos Poli-hidroxicanoatos

Os PHAs são uma família de poliésteres, sintetizados de forma intracelular por um grande número de micro-organismos. São

armazenados na forma de grânulos, podendo representar 80 % da massa seca da célula. Sua composição depende tanto do micro-organismo utilizado, quanto da natureza da fonte de carbono (BASSAS et al., 2006; REDDY et al., 2003).

Mais de 100 diferentes unidades monoméricas têm sido identificadas como constituintes dos PHAs, fazendo com que diferentes tipos de polímeros sejam criados e aumentando a gama de utilizações deste material. Na Figura 2.1 é possível verificar a estrutura geral dos PHAs, em que o alcano substituído na posição “R” determina as propriedades do polímero formado. Quando um metil é substituído da posição “R”, tem-se o poli(3-hidroxi butirato) (P(3HB)). Este é o PHA mais estudado devido às suas características termoplásticas e mecânicas muito similares às do polipropileno (REDDY et al., 2003; BRAUNEGG, LEFEBVRE, GENSER, 1998).

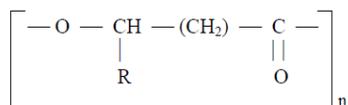


Figura 2.1 Estrutura geral dos PHAs, onde “n” representa o número de monômeros presentes na estrutura do polímero, e “R” representa a posição onde um radical é introduzido na estrutura (LEE, 1996b).

De forma geral, o P(3HB) apresenta propriedade de biocompatibilidade, biodegradabilidade, alto grau de polimerização, é atóxico, opticamente ativo e piezoelétrico (as moléculas do polímero são organizadas em hélices sem centros simétricos). Estas propriedades o tornam capaz de ser aplicado na medicina, agricultura, sistemas marinhos, embalagens, entre outros (CHEN et al., 2001). Apesar de apresentar características próximas às do polipropileno, o P(3HB) é mais rígido e quebradiço, devido à sua elevada cristalinidade. O copolímero poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (P(3HB-co-3HV)) é formado pela incorporação tanto de unidades metil quanto etil na posição “R”. Este copolímero apresenta ponto de fusão e cristalinidade inferiores às do P(3HB), o que o torna mais moldável e assim, sua gama de aplicações é maior. A variação no conteúdo de unidades 3-hidroxi valerato (3HV) confere diferentes propriedades termomecânicas ao polímero (LUZIER, 1992; BRAUNEGG, LEFEBVRE, GENSER, 1998).

O valor de “n” na estrutura geral dos PHAs pode variar de 100 a 30.000. Este valor influencia diretamente o peso molecular do polímero e suas propriedades físicas (LEE, 1996a; SUDESH, ABE e DOI, 2000).

De acordo com o comprimento das cadeias carbônicas de suas unidades monoméricas, os PHAs foram classificados em três grupos: PHAs constituídos por unidades de ácidos hidroxialcanóicos de cadeia curta (PHASCL), ou seja, aqueles que possuem cadeia carbônica constituída de 3 a 5 átomos de carbono, os PHAs constituídos por unidades de cadeia média (PHAMCL), apresentando de 6 a 14 átomos de carbono na cadeia e os de cadeia longa com mais de 15 átomos de carbono (PHALCL) (LEE, 1996a; STEINBÜCHEL et al., 1992).

2.2.2 Micro-organismos capazes de produzir Poli-hidroxialcanoatos (PHAs)

São conhecidos mais de 300 micro-organismos capazes de produzir PHAs, porém apenas alguns são considerados potenciais para produção industrial. Os micro-organismos mais estudados são: *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, além de linhagens recombinantes como *Escherichia coli* e *Klebsiella aerogenes*. Estas bactérias foram selecionadas principalmente pela capacidade de acumular alta concentração de PHAs, em um período relativamente curto de tempo (LEE, 1996a; BRAUNEGG, LEFEBVRE, GENSER, 1998).

Os micro-organismos produtores de PHAs podem ser divididos em dois grupos, sendo o primeiro composto por linhagens que necessitam da limitação de um nutriente essencial e excesso da fonte de carbono, como *C. necator* e *P. oleovorans* e, um segundo grupo capaz de acumular o polímero associado ao seu crescimento, como *E. coli* recombinante e *A. latus* (LEE, 1996b).

Atualmente, além dos micro-organismos, já existem estudos de produção de PHAs em plantas transgênicas. Esta é uma técnica barata uma vez que as plantas utilizam o CO₂ e o sol como fontes de carbono e energia respectivamente. Muitas espécies de plantas têm sido transformadas utilizando-se o gene de biossíntese de P(3HB) da linhagem *C. necator*, obtendo-se até 40 % da matéria seca das folhas em polímero, quando o gene é aplicado em cloroplastos (PETRASOVITS et al., 2007; BOHMERT et al., 2000). Algumas dificuldades encontradas nestes estudos são a baixa produtividade e o fato de que a produção deve ocorrer em apenas um órgão específico da planta, para facilitar sua recuperação e posterior purificação (GOMES e BUENO NETO, 1997).

2.2.3 *Cupriavidus necator*

C. necator é um dos micro-organismos que apresenta condições mais favoráveis à produção industrial de PHAs. É capaz de acumular cerca de 80 % (m/m) de sua massa seca em polímero e utilizar diferentes tipos de substratos, como frutose e glicose (mutante espontâneo) (RAMSAY, 1994). Antes de ser classificada com este nome, ela foi descrita como *Hydrogenomonas eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* e *Wautersia eutropha* (VANDAMME e COENYE, 2004).

A síntese do polímero ocorre em duas etapas. Na primeira, procura-se favorecer ao máximo o crescimento celular e assegurar, ao mesmo tempo, que a síntese de polímero seja a menor possível; já na segunda, o crescimento celular é interrompido ou mantido em níveis mínimos e o acúmulo de polímero nas células é estimulado (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997).

Quando somente açúcares são fornecidos a este micro-organismo, o polímero formado é o P(3HB). Porém ao fornecer ácido valérico ou propiônico, o monômero 3-hidroxivalerato (3HV) pode ser formado (DENNIS, et al, 1998).

Uma vez que os PHAs são armazenados como possível fonte de energia, a partir do momento que este micro-organismo começa a produzi-lo, um sistema de despolimerização é formado simultaneamente, para que quando a fonte de carbono se torne indisponível, ou as demais condições do meio voltem a ser favoráveis, o polímero formado seja degradado, a fim de manter a viabilidade celular por um período maior de tempo. Estudos mostraram que a degradação dos PHAs é um processo lento, com velocidade cerca de 10 vezes menor do que a velocidade de síntese, sendo controlada pela inibição da 3-hidroxibutirato desidrogenase, pelo acetoacetato e o NADPH (BYRON, 1987; BRAUNEGG, LEFEBVRE e GENSER, 1998; SUDESH, ABE e DOI, 2000).

2.2.4 Substratos de baixo custo para produção de Poli-hidroxicanoatos

A fonte de carbono influencia diretamente as características dos polímeros formados e o custo de produção dos mesmos. Cerca de 40 % do custo total na produção de P(3HB) provém da fonte de carbono, assim, o uso de substratos de baixo custo é interessante para o processo. Alguns substratos têm se destacado na produção de biopolímeros como,

por exemplo, os ácidos graxos de cadeias curtas e médias, glicose, frutose, sacarose, resíduos agro-industriais entre outros (BASSAS et al., 2006; KIM, 2000; CHOI e LEE, 1999).

Diversos autores têm utilizado águas residuárias provenientes de indústrias de alimentos como fontes de substrato em potencial para a produção de PHAs. Dalcanton et al. (2010) estudaram a utilização de amido de arroz hidrolisado como substrato, em cultivos de *C. necator* em frascos agitados, com limitação da fonte de nitrogênio, obtendo produtividade de $0,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e 43 % (m/v) de P(3HB). Kim e Chang (1998) utilizaram o mesmo substrato em um processo de batelada alimentada em um reator com volume de trabalho de 1 litro, com *Azotobacter chroococcum* e limitação em oxigênio, obtendo $0,36 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de produtividade, com 46 % (m/v) de P(3HB) intracelular.

O soro de leite é um subproduto da manufatura de queijos, no qual mais de 50 % dos ingredientes do leite estão presentes. Devido à alta concentração de matéria orgânica ainda presente neste resíduo, sua utilização como substrato é interessante do ponto de vista econômico (LUND, NORDDAHL e AHRUNG, 1992). Wong e Lee (1998) pesquisaram o uso de soro de leite em cultivos de *E. coli* recombinante para produção de P(3HB), em regime batelada alimentada, atingindo um teor de polímero de 80 % (m/v) e $1,4 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de produtividade. Ahn, Park e Lee (2001), utilizando um sistema de reciclo de células, chegaram a uma produtividade de $4,6 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e acúmulo de 87 % (m/v) de P(3HB), em cultivo de *E. coli* CGSC 4401 recombinante, utilizando lactose como substrato. Polovo et al. (2010), produziram uma cepa mutante de *C. necator* capaz de utilizar lactose como fonte de carbono. Neste experimento, os autores realizaram cultivos em frascos agitados e obtiveram 30 % (m/v) de P(3HB) em 48 horas, sendo a baixa produção atribuída às condições não otimizadas do experimento.

Uma vez que óleos e gorduras são co-produtos da agricultura que apresentam baixo custo, este substrato pode ser uma alternativa para a produção de PHAs (FUKUI e DOI, 1998). Kahar et al. (2004) utilizaram óleo de soja como substrato em cultivos de *C. necator* H16 em regime batelada, e obtiveram bons resultados como acúmulo de 76 % (m/v) de P(3HB) e produtividade de $1,31 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Delgado (2006) utilizou óleo de soja em cultivo *C. necator* IPT-26 e obteve acúmulo de 84 % (m/v) de P(3HB) e produtividade igual a $2,36 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, em sistema de batelada alimentada. Óleo de palma foi empregado em cultivos de frascos agitados, com *C. necator*, resultando em 81 % (m/v) de produção de P(3HB-co-4HB) (RAO, SRIDHAR e SEHGAL, 2010).

Atualmente, um dos resíduos que vem chamando a atenção é o glicerol, gerado na transesterificação de gorduras vegetais e animais durante a produção de biodiesel. Anualmente 50 mil toneladas de glicerol são geradas, sendo que para este resíduo ser aplicado em produtos alimentícios, farmacêuticos, entre outros, é necessária a remoção das impurezas remanescentes no mesmo, o que gera um alto custo de processo (YAZDANI e GONZALES, 2007). A utilização do glicerol purificado e impuro para a produção de P(3HB) foi investigada por Cavalheiro e colaboradores (2009), utilizando a cepa *C. necator* DSM-545 em cultivos do tipo batelada alimentada. Os autores obtiveram 63 e 38 % (m/v) de acúmulo e produtividade na fase de produção de 1,52 e 0,84 g.L⁻¹.h⁻¹ para os cultivos de glicerol purificado e impuro respectivamente. Eles concluíram que altos níveis de sódio, no caso do glicerol impuro, podem ter influenciado de forma negativa o acúmulo do polímero, mas que este resíduo pode ser considerado um bom substrato de baixo custo para produção de P(3HB).

Um dos principais problemas enfrentados pelas indústrias processadoras de suco de laranja é o grande volume de resíduos sólidos e líquidos, produzidos diariamente. Dentre os despejos líquidos, o “melaço cítrico”, formado por óleos essenciais, pectinas, açúcares, ácidos orgânicos e sais, é aquele que mais preocupa, pelos seus altos índices de matéria orgânica, o que o torna um agente de alto potencial poluidor (FARIAS, 2009; TAVARES et al., 1998).

As características apresentadas pelo melaço cítrico tornam este resíduo potencial para a produção de PHAs, o que, além de minimizar a geração de resíduos orgânicos industriais, agrega valor ao mesmo. Farias (2009) utilizou melaço cítrico para a produção do co-polímero P(3HB-co-3HV) em um sistema batelada com limitação em nitrogênio, utilizando a bactéria *C. necator* DSM-545, e obteve como resultados, acúmulo de copolímero igual a 73,4 % (m/v) e produtividade de 0,74 g.L⁻¹.h⁻¹.

Liu et al. (1998) utilizaram melaço de beterraba açucareira hidrolisado em cultivo de *E. coli* recombinante para produção de P(3HB), onde a produtividade e porcentagem de polímero intracelular foi de 1 g.L⁻¹.h⁻¹ e 80 % (m/v), respectivamente.

2.2.5 Utilização de suplementos nutricionais para a produção de PHAs

Estratégias para a produção de PHAs com alta produtividade são necessárias para reduzir o custo total de produção destes biopolímeros.

Uma alternativa interessante é a utilização de suplementos ou indutores da produção de PHAs. Estes agentes podem interferir na via metabólica proporcionando maior produção de células e resultando em maior produtividade, mas também podem agir diretamente na síntese de PHAs (MARANGONI, FURIGO e ARAGÃO 2000).

A influência da utilização do ácido oléico como suplemento nutricional na produção de P(3HB-co-3HV) em cultivos de *C. necator* DSM-545, a partir de açúcar invertido, foi estudada por Marangoni, Furigo e Aragão (2000). Os autores obtiveram um aumento de produtividade do polímero de 0,14 para 0,28 g.L⁻¹.h⁻¹, sendo o aumento de polímero acumulado igual a 10 % (m/v) em cultivos realizados em frascos agitados com limitação de fósforo.

Squio (2003) avaliou a influência da suplementação de ácido oléico/linoléico ao meio de cultivo realizado em biorreator, com limitação em fósforo, utilizando a cepa *C. necator* DSM 545. Três cultivos foram realizados, um sem suplementação (A), com suplementação de ácido oléico (B) e com suplementação de ácido oléico/linoléico (C). As suplementações foram feitas de modo que a concentração de ácido oléico no meio fosse igual a 0,3 g.L⁻¹. Como resultado, este autor obteve um aumento de 9,6 e 11,7 % (m/v) no acúmulo de polímero para os cultivos B e C, respectivamente, quando comparada o cultivo A. A produtividade dos cultivos A, B e C foi 0,38, 0,48 e 0,53 g.L⁻¹.h⁻¹. Desta forma, é possível verificar que tanto a suplementação de ácido oléico, quanto de ácido linoléico, promove um aumento de produtividade no processo.

Os ácidos graxos utilizados como suplemento (oléico e linoléico) são encontrados em inúmeros óleos vegetais, logo, diversos autores têm buscado aplicar estes óleos, que são uma fonte de ácidos graxos mais econômica, como suplemento nos meios de cultivo. A suplementação de óleos de soja, oliva, palma, milho, girassol e canola foi estudada em cultivos com *C. necator*, e todos os suplementos se mostraram eficientes no aumento de produtividade do processo, porém os óleos de canola e oliva foram os que se destacaram (FUKUI e DOI, 1998; SQUIO, 2003; SCHNEIDER, 2006).

Para que a bactéria *C. necator* possa utilizar os óleos vegetais como substrato para produção de PHAs, estes devem primeiramente ser hidrolisados em seus ácidos graxos derivados por meio da enzima lipase, para só então serem incorporados à célula e metabolizados. Fukui e Doi (1998), Kahar et al. (2004) e Rao, Sridhar e Sehgal (2010) não adicionaram a enzima lipase ao meio de cultivo, porém em todos os trabalhos confirmou-se a presença desta enzima, através de análises de

atividade enzimática. O aumento da atividade enzimática foi proporcional ao aumento da biomassa ao longo dos cultivos. Estes resultados indicam que a bactéria *C. necator*, quando em presença de óleos vegetais, excreta a enzima lipase para o meio, assim os óleos podem ser hidrolisados e então convertidos a polímero ou célula.

Outro suplemento avaliado na produção de P(3HB) foi o glicerol obtido a partir de óleo de farelo de arroz. Os cultivos foram realizados em frascos agitados, utilizando-se o micro-organismo *C. necator* DSM-545. A suplementação de 3 g.L⁻¹ de glicerol ocorreu no início da fase de crescimento, onde açúcar invertido foi o substrato principal. Os autores mostraram que no cultivo suplementado, o consumo de açúcar invertido foi 62 % (m/v) menor do que no cultivo controle, o que indica que o micro-organismo deu preferência ao glicerol em relação ao açúcar invertido sendo que, ao final do experimento, a quantidade de polímero produzido foi a mesma (MAZUR et al., 2009).

2.3 Transferência de oxigênio

Nos processos produtivos que envolvem micro-organismos aeróbios ou aeróbios facultativos, é de fundamental importância o correto dimensionamento do sistema de transferência de oxigênio, ou seja, da operação de dissolução do oxigênio contido na fase gasosa para a fase líquida. Uma vez que o oxigênio está dissolvido no meio líquido, ele pode penetrar na célula e participar das reações bioquímicas (SCHMIDELL, 2001).

Do ponto de vista bioquímico, o oxigênio é o último elemento a aceitar elétrons, ao final da cadeia respiratória, sendo então reduzido a água, permitindo que ocorra a reoxidação das coenzimas que participam das reações de desidrogenação (ao longo da glicólise ou do ciclo de Krebs) e, ainda, permitindo o armazenamento de energia através da passagem das moléculas de ADP para ATP. Estas últimas irão, por sua vez, participar necessariamente nas reações de síntese de moléculas, para a sobrevivência das células já existentes e para o surgimento de novas células, onde é fundamental a introdução de energia (SCHMIDELL, 2001).

2.3.1 Previsão da biomassa através dos parâmetros respiratórios

Uma das formas de reduzir os custos de produção dos PHA's é a utilização de substratos de baixo custo, como é o caso dos resíduos agroindustriais (MARANGONI, FURIGO E ARAGÃO, et al., 2000;

RUSENDI e SHEPPARD, 1995). Porém, estes resíduos apresentam elevada concentração de sólidos suspensos e altos níveis de coloração. Estes fatores podem prejudicar a determinação de duas das mais importantes variáveis de um processo biotecnológico: a concentração da biomassa e a velocidade específica de crescimento. Apesar da ampla variedade de análises químicas, físicas e microbiológicas disponíveis (HERBERT, PHIPPS e SATRANGE, 1971), o tempo decorrido para a realização do ensaio e os resultados obtidos, apresentam baixa sensibilidade e não homogeneidade das respostas em função da interferência da cor e dos sólidos em suspensão. Embora, muitos esforços em criar instrumentos capazes de quantificar estas variáveis no tempo real do processo tenham sido realizados, poucos apresentam resultados confiáveis (ZABRISKIE e HUMPHREY, 1978).

Berbet-Molina, Silveira e Sato (2001) definiram, empiricamente, algumas expressões para a descrição matemática do crescimento de *Bacillus thuringiensis*, empregando variáveis de fácil quantificação como a concentração da fonte de carbono e a demanda de oxigênio pelo cultivo. O uso desta metodologia, entretanto, depende da determinação de certas constantes que são dependentes da relação C/N de cada meio de cultivo. Zabriskie e Humphrey (1978) descreveram um modelo, exclusivamente baseado em parâmetros respiratórios, para a quantificação indireta de concentrações microbianas. De acordo com estes autores, o modelo é satisfatório para microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos.

Silveira e Molina (2005), utilizaram o modelo proposto por Zabriskie e Humphrey (1978), para estimar a biomassa ao longo do tempo, em cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, conduzidos em diferentes concentrações iniciais da fonte de carbono. Os autores verificaram que o modelo se ajustou bem aos dados experimentais, entretanto, o ajuste foi mais preciso quando a concentração de carbono foi superior a 30 g.L⁻¹.

2.4 Vias metabólicas para produção de Poli-hidroxicanoatos

De acordo com o substrato fornecido, as vias metabólicas darão origem a diversos hidroxiaxil-CoA que poderão ou não ser incorporados ao polímero, de acordo com a especificidade da PHA sintase microbiana (REHM, 2003). As enzimas caracterizadas como responsáveis pela biossíntese dos monômeros 3HB a partir de acetil-CoA foram primeiramente descritas e amplamente estudadas em *C. necator*. São elas: β -cetotiolase, 3-cetoacil-CoA redutase e a PHA sintase. Cada uma

acetoacetil-CoA + coenzima A (CoASH) livre. Esta enzima atua tanto na biossíntese, como na degradação do P(3HB). A regulação da reação de condensação ocorre pela concentração celular de CoASH. Assim, a alta concentração celular de CoASH faz com que a reação ocorra no sentido contrário ao da biossíntese de PHA (OEDING e SCHLEGEL, 1973).

Em condições balanceadas de crescimento, nas quais todos os nutrientes necessários à multiplicação celular estão disponíveis, espera-se que os níveis de CoASH sejam altos, devido à grande demanda por grupos acetil pelo ciclo de Krebs, para formação de esqueletos carbônicos e energia. Segundo alguns autores, CoASH tem efeito inibitório sobre a enzima β -cetotiolase, impedindo deste modo a síntese de P(3HB) (OEDING e SCHLENGEL, 1973; SENIOR e DAWES, 1973). Quando algum nutriente se torna limitante à multiplicação da bactéria, a demanda por acetil-CoA diminui e com isso os níveis de CoASH se tornam reduzidos, diminuindo a inibição sobre a enzima β -cetotiolase e desencadeando a síntese de P(3HB) (ANDERSON e DAWES, 1990).

Haywood e colaboradores (1988) isolaram duas enzimas β -cetotiolase em *C. necator*, denominando-as A e B. A enzima B apresentou atividade com moléculas de 3-cetoacil-CoA de cadeia de 4 a 10 átomos de carbono, devendo estar envolvida na degradação de ácidos graxos. A enzima A apresentou atividade apenas com 3-cetoacil-CoA contendo 4 e 5 átomos de carbono, sendo assim, evidenciado seu envolvimento na síntese de P(3HB). Mais tarde, Slater e colaboradores (1998) determinaram que *C. necator* possui no mínimo três enzimas β -cetotiolases diferentes, cujos genes codificadores são designados *phaA*, *bktB* e *bktC*. *PhaA* é cataliticamente mais ativa, porém forma essencialmente acetoacetil-CoA (intermediário com 4 carbonos, produto da condensação de duas moléculas de acetil-CoA). A enzima codificada pelo gene *bktB* tem papel importante na formação de 3-cetovaleril-CoA, ou seja, na síntese de unidades de 3HV (intermediário com 5 carbonos, produto da condensação de acetil-CoA e propionil-CoA). *BktC* parece contribuir menos para a formação de 3-cetovaleril-CoA e, juntamente com *bktB* pode funcionar durante a degradação de ácidos graxos.

2.4.2 Acetoacetil-CoA redutase (phaB)

Foram detectadas duas enzimas acetoacetil-CoA redutase em *C. necator*: uma NADPH dependente e outra NADH dependente. Ambas

foram estudadas quanto a sua atividade na reação reversa (oxidação), demonstrando que a enzima NADPH dependente catalisa a oxidação de (R)-3-hidroxiacil-CoA de cadeia com 4 e 6 átomos de carbono, enquanto que a enzima NADH dependente é ativa com moléculas de (R) e (S) 3-hidroxiacil-CoA de cadeia curta e média (4 a 10 átomos de carbono). No entanto, na reação de redução, esta enzima forma apenas moléculas de (S)-3-hidroxiacil-CoA, portanto não deve participar da via de biossíntese de PHA, uma vez que não forma substrato da enzima seguinte. Assim, na biossíntese de P(3HB), a enzima acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente é responsável pela redução estereoespecífica da molécula de acetoacetil-CoA a (R)-3-hidroxiacil-CoA. O gene codificador desta enzima é denominado *phbB*. Nenhuma das duas redutases detectadas parece ser regulada por nenhum outro metabólito (HAYWOOD et al., 1988).

2.4.3 PHA sintase (*phaC*)

A enzima PHA sintase em *C. necator* é específica para substratos D(-), capaz de polimerizar 3-hidroxi, 4-hidroxi e 5-hidroxiácido de cadeia curta a partir de isômeros de 4 e 5 carbonos de hidroxiacil-CoA (ANDERSON e DAWES, 1990; STEINBUCHER & LUTKE-EVERSLOH, 2003). 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).

Uma proposta do mecanismo de formação de grânulos de P(3HB) pela ação da enzima PHA sintase segue os seguintes passos: 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 (GERNGROSS e MARTIN, 1995 citado por MADISON e HUISMANN, 1999).

Estudos realizados para avaliar a influência da atividade da PHA sintase na produção de PHAs em *C. necator* mostraram que o aumento

de sua atividade não promove a produção do polímero, indicando que a etapa de polimerização não é determinante na biossíntese de PHAs neste micro-organismo (KICHISE et al., 1999; MINUFE, NAKAMURA e FUKUI, 2010).

2.4.4 Biossíntese de PHA de cadeia curta (PHA_{SCL})

Em diversas bactérias, a biossíntese de P(3HB), um dos homopolímeros do grupo PHA_{SCL}, a partir do catabolismo de carboidratos, por exemplo, ocorre em três passos. Inicialmente, duas moléculas de acetil-CoA são condensadas para formar acetoacetil-CoA, pela ação de uma β -cetotiolase (*phaA*, *bktB*) (SLATER, et al., 1998); em seguida, acetoacetil-CoA é reduzida a (R)-3-hidroxiacetil-CoA pela ação de uma 3-cetoacetil-CoA redutase NADPH dependente (*phaB*) e finalmente (R)-3-hidroxiacetil-CoA é incorporada a uma cadeia polimérica pela ação de uma PHA sintase (*phaC*), ocorrendo a liberação da Coenzima A. A incorporação de outros monômeros PHA_{SCL} é obtida geralmente com o fornecimento de precursores estruturalmente relacionados a esses monômeros (OEDING e SCHLEGEL, 1973; SENIOR e DAWES, 1973; ALDOR e KEASLING, 2003).

2.4.5 Biossíntese de PHA de cadeia média (PHA_{MCL})

A síntese de PHA_{MCL} tanto pode ocorrer a partir de fontes de carbono estruturalmente relacionadas aos monômeros (ácidos graxos, alcoóis e alcanos) como a partir de outras fontes de carbono não relacionadas estruturalmente (carboidratos, por exemplo). No primeiro caso, a fonte de carbono é metabolizada através da β -oxidação de ácidos graxos que supre os monômeros a serem incorporados pela PHA sintase (BRANDL et al., 1988; HUIJBERTS et al., 1994). A partir de fontes de carbono não relacionadas, inicialmente é formada acetil-CoA que é utilizada na biossíntese de ácidos graxos para gerar os monômeros que são incorporados ao PHA (HAYWOOD et al., 1990; HUIJBERTS et al., 1994). O direcionamento de intermediários da β -oxidação de ácidos graxos para PHA sintase pode ser realizado por enoil-CoA hidratase (TSUGE et al., 2000), 3-cetoacetil-CoA redutase (TAGUCHI et al., 1999) ou mesmo uma epimerase (KRAAK, KESSLER e WITHOT, 1997). Intermediários da biossíntese de ácidos graxos são direcionados a PHA sintase pela ação de uma 3-hidroxiacetil-CoA:ACP transacetilase (REHM, KRÜGER e STEINBÜCHEL, 1998). A síntese de PHA_{MCL} pode ocorrer

utilizando intermediários da β -oxidação que é ativada, quando são fornecidas fontes de carbono como ácidos graxos, alcoóis e alcanos, cujos intermediários podem ser reconhecidos como monômeros a serem incorporados pela PHA sintase. A partir de outras fontes de carbono, carboidratos, por exemplo, é formado o acetil-CoA que também é utilizado na síntese *de novo* de ácidos graxos para gerar os monômeros que são incorporados ao PHA. O direcionamento de intermediários da β -oxidação de ácidos graxos para PHA sintase pode ser realizado por uma enoil-CoA redutase. Intermediários da biossíntese de ácidos graxos são direcionados a PHA sintase pela ação de uma 3-hidroxiacil-CoA:ACP transacilase.

2.5 Emulsões

Emulsão é uma dispersão de pequenas gotas de um líquido em outro líquido, os dois completamente imiscíveis. A emulsão é composta de uma fase que leva o nome de dispersa e outra fase, que fica em torno das partículas, denominada fase contínua ou dispersante. Por serem sistemas termodinamicamente instáveis, necessitam de uma energia livre positiva para que a área interfacial entre o óleo e a água seja aumentada. Isto ocorre pelo fato das moléculas de água realizarem pontes de hidrogênio umas com as outras, porém não com o óleo. Para que as emulsões se tornem estáveis por um determinado período de tempo, que pode variar de horas a dias, substâncias químicas conhecidas como emulsificantes ou surfactantes precisam ser adicionadas anteriormente à homogeneização da mistura (AKOH e MIN, 2008).

2.5.1 Miniemulsões

Miniemulsões são classicamente definidas como uma dispersão aquosa com partículas de óleo, de tamanho variando entre 50 – 500 nm relativamente estáveis, preparadas pela intensa agitação de um sistema contendo água, óleo e surfactante (LANDFESTER et al., 1999). O tamanho das partículas após a miniemulsificação depende da quantidade e do tipo de surfactante utilizado, e do tempo de ultrassonificação. A eficiência do processo de miniemulsificação é caracterizada pela medida da turbidimetria e da tensão interfacial dependentes do tempo de ultrassonificação (LANFESTER, 2000). O tamanho da partícula muda logo após a dispersão, a fim de se aproximar ao estado pseudo-estacionário. Entretanto, uma vez que este estado é alcançado, o

tamanho da partícula parece não mais função da energia de dispersão, supondo que um mínimo tempo requerido já foi alcançado (LANDFESTER, 2001).

2.5.1.1 Surfactantes

Surfactantes são moléculas que possuem superfície ativa e adsorvem na superfície das gotículas formadas durante a homogeneização, formando uma membrana protetora nas gotas que não permite que elas voltem a se unir (AKOH e MIN, 2008). Os surfactantes são compostos cujas moléculas possuem duas regiões de características distintas: uma hidrofílica e uma hidrofóbica (MANIASSO, 2001). A região hidrofílica é constituída por grupos não iônicos polares, iônicos ou ainda por ziteriônicos (onde existe um balanço entre as cargas positivas e negativas na molécula). A região hidrofóbica é geralmente constituída por cadeias carbônicas alquílicas ou alquifenílicas (lineares ou ramificadas), contendo geralmente de oito a dezoito átomos de carbono (FERREIRA, 2006).

Quando um surfactante é adicionado à água, suas moléculas tentam se arranjar de modo a minimizar a repulsão entre grupos hidrofóbicos e a água: os grupos polares ficam na solução aquosa, próximos à superfície, e os grupos apolares ficam na interface água-óleo, minimizando o contato com a água. Isto gera uma diminuição na tensão superficial da água, pois provoca um desarranjo de sua superfície (ROMIO, 2007).

2.5.1.1.1 Lecitina de soja

De acordo com a legislação brasileira, lecitina de soja é o produto obtido do grão de soja, apresentando um alto conteúdo de fosfolipídeos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina), combinado com quantidades variáveis de outras substâncias, tais como: triglicerídeos, ácidos graxos e carboidratos (ANVISA, 2011). Quimicamente as lecitinas são diésteres do ácido fosfórico. O ácido fosfórico é esterificado de um lado com a diacilglicerina ou esfingosina e por outro lado com a colina, etanolamina, ou serina. De acordo com a origem da lecitina, variam tanto a composição dos ácidos graxos como também a composição dos fosfolipídeos. Embora a lecitina inicialmente fosse extraída da gema de ovo, a lecitina comercial de hoje é quase que exclusivamente extraída da soja (OKADA, 1985).

A lecitina de soja é um produto estável a temperatura ambiente, higroscópico, solúvel na maioria dos solventes orgânicos e parcialmente solúvel em álcool etílico (MIYASAKA e MEDINA, 1981). Sua superfície ativa, ou seja, a porção dos fosfolipídios, confere ao composto uma estrutura molecular ambifílica: a parte hidrofílica, composta pelo ácido fosfórico e a parte hidrofóbica, pela cadeia de ácidos graxos. O tamanho desta cadeia de ácidos graxos confere à estrutura o caráter mais ou menos hidrofóbico. Este comportamento lhe atribui uma de suas principais aplicações que é o uso como emulsificantes para substâncias que têm superfícies ativas diferentes, como a água e óleo, permitindo que eles se misturem facilmente (MENDES, 2000).

A estrutura química da lecitina está apresentada na Figura 2.3, onde R1 e R2 podem ser substituídos por qualquer ácido graxo, e X pode ser fosfotidilcolina ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), fosfatidiletanolamina ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}_3$), ou ainda, fosfatidilserina ($-\text{CH}_2\text{CHN}^+\text{H}_3$).

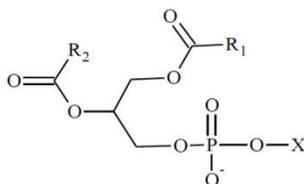


Figura 2.3 Estrutura química da lecitina de soja (FELTES, 2011).

2.5.1.2 Sistemas de dispersão

Diferentes equipamentos estão disponíveis comercialmente para a emulsificação. Os mais importantes são sistemas do tipo rotor-estator e homogeneizadores de alta pressão. A ultrassonificação é usada, especialmente, para a homogeneização de pequenas quantidades, visto que o microfluidizador ou o homogeneizador de alta pressão são necessários para emulsificação de grandes quantidades, produzindo uma dispersão bastante homogênea. Existem diversos mecanismos possíveis para o rompimento e formação da gota sob a influência do ultrassom. Um deles é a formação das gotas em consequência das oscilações instáveis da interface líquido-líquido (ROMIO, 2007).

O sonificador produz ondas de ultrassom que causam a oscilação das moléculas próximas ao principal local de propagação das gotas. Durante o ciclo de compressão, a distância média entre as moléculas decai, enquanto que durante a rarefação a distância entre as moléculas

aumenta. A rarefação resulta numa pressão negativa que pode causar a formação de vácuo ou cavitação. Em ciclos sucessivos de compressão de onda, as bolhas são forçadas a contrair e podem desaparecer totalmente. As ondas de choque produzidas e o total colapso das bolhas causam a quebra das gotículas da fase dispersa (ROMIO, 2007).

Um aspecto associado ao sonificador é que apenas uma pequena região do fluido ao redor do sonificador é diretamente afetada pelas ondas de ultrassom. Logo, para ocorrer a quebra, as gotículas da fase dispersa devem passar através dessa região. Inicialmente, a redução é pronunciada e, com o passar do tempo, o tamanho da gota tende a valores assintóticos que dependem da formulação, da energia embutida e da quantidade do meio reacional. Um esquema do processo de sonificação é representado na Figura 2.4 (ASUA, 2002).

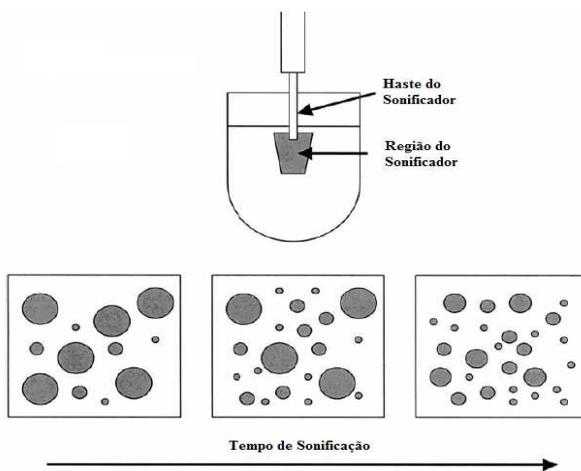


Figura 2.4 Esquema do processo de ultrassonificação (ASUA, 2002).

2.5.1.3 Degradação e coalescência

São dois os principais mecanismos que podem modificar o número e o tamanho das partículas na miniemulsão, levando a mesma a uma desestabilização e subsequente quebra de emulsão: a degradação difusional (*Ostwald ripening*) e a coalescência (LANDFESTER, 2000).

Para o caso da degradação difusional (*Ostwald ripening*), a transferência de massa das gotas menores para as maiores determina o destino da distribuição. Se as gotas pequenas não são estabilizadas contra esta degradação, elas vão desaparecer, aumentando a média do

tamanho da gota. Com isto, conclui-se que o desaparecimento pode ser bem rápido para gotas pequenas (ROMIO, 2007).

Além da difusão molecular da fase dispersa, uma desestabilização da emulsão também pode ocorrer pelo processo de colisão ou coalescência. Este processo ocorre quando duas ou mais gotas estão suficientemente próximas para que entrem em contato, e assim, formem uma única gota maior. A estabilização contra a coalescência é efetuada adicionando um surfactante apropriado, o qual promove a estabilização eletrostática e/ou estérica das gotas (CHOU, EL-AASSER e VANDERHOFF, 1980).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismo e meio de cultivo

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a linhagem bacteriana *Cupriavidus necator* DSM 545, mutante de forma espontânea para a utilização da glicose.

Os experimentos foram realizados por meio de dois pré-cultivos. No primeiro pré-cultivo, as células foram inoculadas em caldo nutriente (CN), contendo peptona de carne ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$) e extrato de carne ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$) e, como segundo pré-cultivo, foi utilizado o meio mineral (MM) sem limitação de nitrogênio, descrito por Aragão et al., (1996) com modificações.

O meio de cultivo final foi composto a partir dos nutrientes do meio mineral (em g.L^{-1}): glicose/frutose (1:1) 40, KH_2PO_4 4,39, citrato de amônio e ferro III 0,06, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5, uréia 2, ácido nitrilotriacético 0,19 e elementos traço 1 mL.L^{-1} . A solução de elementos traço tem em sua composição (em g.L^{-1}) H_3BO_3 0,3, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,03, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,02 e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,01.

3.2 Condições de cultivo

3.2.1 Cultivos em frascos agitados

Os cultivos em frascos agitados foram conduzidos em frascos erlenmeyer aletados de 1000 mL, contendo 400 mL do meio final limitado em nitrogênio. Os frascos foram incubados a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação orbital de 150 rpm durante o tempo necessário para cada experimento. O pH foi mantido em 7,0, com adição de soluções de NaOH $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ou HCl $2,7 \text{ mol.L}^{-1}$ ao longo do cultivo, de forma asséptica. No início da fase de produção, foram adicionados, na forma de pulsos, óleo de soja e miniemulsão de óleo de soja em água, de acordo com o estudo pretendido.

3.2.2 Cultivos em biorreator

Os melhores resultados obtidos no item 3.2.1, o qual avaliou diferentes concentrações de ácido oléico suplementado ao meio de cultivo, foram testados em biorreator.

Os cultivos foram realizados em biorreator de 6 L (BIOFLO III, New Brunswick Scientific CO), com volume útil de 4 L. O biorreator, contendo a solução do meio final (com exceção da uréia, da fonte de carbono e do KH_2PO_4), foi autoclavado durante 20 min a 121 °C. No início do cultivo, foram adicionadas as soluções de glicose:frutose (1:1), em concentração de 500 g.L⁻¹, KH_2PO_4 em concentração de 122 g.L⁻¹ e uréia com concentração de 100 g.L⁻¹, com a finalidade de obter a concentração inicial de 40 g.L⁻¹ de açúcares redutores totais, 1 g.L⁻¹ de fósforo e 0,8 g.L⁻¹ de nitrogênio, que representa que o meio será limitado nesta última fonte de carbono. O inóculo, proveniente do segundo pré-cultivo (MM), foi adicionado na quantidade de 10 % do volume final de meio no biorreator.

Durante o cultivo, a temperatura foi mantida em 35 °C, o pH em 7,0 com adição de soluções de NaOH 2,5 mol.L⁻¹ ou HCl 2,7 mol.L⁻¹. As condições iniciais de agitação e aeração foram de 450 rpm e 0,1 vvm (volume de ar por volume de meio, por minuto) respectivamente, e aumentadas gradualmente, de forma a se manter a concentração de oxigênio dissolvido superior a 30 % (m/v) em relação à saturação com ar atmosférico.

3.3 Suplementações do meio de cultivo

3.3.1 Suplementação com óleo de soja

Para verificar a influência do óleo de soja sobre a produção do biopolímero foram realizados cultivos com a adição de óleo na forma de suplemento nutricional. O óleo de soja, da marca LEVE, foi previamente esterilizado e adicionado nas concentrações equivalentes de 0,3 g.L⁻¹ e 0,6 g.L⁻¹ em ácido oléico no momento da limitação em nitrogênio (cerca de 0,4 gN.L⁻¹), na forma de pulso, conforme objetivo do experimento.

3.3.2 Suplementação com miniemulsão

A suplementação do meio de cultivo com miniemulsão de óleo de soja em água foi efetuada no momento da limitação do cultivo em

nitrogênio, realizada em forma de pulso, com a finalidade de se obter as concentrações equivalentes finais de $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ em ácido oléico no meio, conforme o objetivo do experimento.

3.3.3 Análise de composição química do óleo de soja

A quantificação dos ácidos graxos majoritários presentes no óleo de soja foi realizada por cromatografia gasosa no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Primeiramente, o óleo de soja, da marca LEVE, passou por uma reação de esterificação, onde $0,5 \text{ mL}$ de amostra foram misturados a 5 mL de metanol e 1 gota de ácido sulfúrico, e então colocados em refluxo por 4 horas. Após esfriar, a mistura foi transferida para um funil de separação juntamente com 3 mL de hexano e então a fase apolar foi separada e os resíduos aquosos removidos com Na_2SO_4 .

O cromatógrafo utilizado para realizar as análises foi um VARIAN CP 3800, com coluna de polietileno glicol ($\text{Ø } 0,32\text{mm}/60\text{m}$) modelo CP-WAX 52 CB. A injeção ocorreu com divisão de fluxo, e razão 1:10 e a vazão do gás de arraste foi igual a 1 mL.min^{-1} . As temperaturas de injeção e coluna foram respectivamente 250 e 220 °C . O detector foi um espectro de massa Varian 1200L triploquadruplo com ionização por impacto de elétrons a 70 eV e temperatura da fonte igual a 230 °C .

3.3.4 Preparo da miniemulsão

A miniemulsão foi preparada por meio da mistura de uma fase orgânica caracterizada pelo óleo vegetal, da marca LEVE e, de uma fase aquosa composta por água destilada em presença do surfactante lecitina de soja da marca Alfa Aesar. Inicialmente foram testadas cinco proporções desta mistura, onde a concentração de lecitina de soja variou de $0,2$ a $1,6 \%$ (m/v), com o intuito de se verificar qual das proporções testadas proporciona uma miniemulsão de maior estabilidade. As proporções da mistura para obtenção da miniemulsão estão apresentadas na Tabela 3.1 e seguem o fluxograma de processo apresentado na Figura 3.1.

O misturador ultrassônico utilizado para preparar a miniemulsão foi ULTRASONIC DISMEMBRATOR 500 (400W) da Fisher Scientific, constituído por um bastão de aço inox, o qual emite ondas de ultrassom que produzem cavitação no sistema, ocasionando assim o rompimento das gotas. O volume de amostra a ser ultrassonificada foi de

30 mL, assim, o recipiente utilizado para o preparo da miniemulsão teve aproximadamente 3 cm de diâmetro e 5 cm de altura, para assegurar uma maior homogeneidade do sistema.

Tabela 3.1 Proporções da mistura de óleo vegetal, lecitina de soja e água destilada para obtenção da miniemulsão a ser suplementada em cultivos para a produção de poli(3-hidroxi-butarato).

| Formulação | Óleo vegetal (g) | Lecitina de soja (g) | Água destilada (mL) | Tempo de solubilização (min.) | Tempo de mistura (h) |
|------------|------------------|----------------------|---------------------|-------------------------------|----------------------|
| A | 6 | 0,06 | 24 | 20 | 1 |
| B | 6 | 0,12 | 24 | 20 | 1 |
| C | 6 | 0,24 | 24 | 20 | 1 |
| D | 6 | 0,36 | 24 | 20 | 1 |
| E | 6 | 0,48 | 24 | 20 | 1 |

A homogeneização ocorreu por um período de 2 minutos em amplitude de 70 %. Para minimizar o aumento de temperatura durante a dispersão por ultrassom, a miniemulsão foi imersa em um banho de gelo.

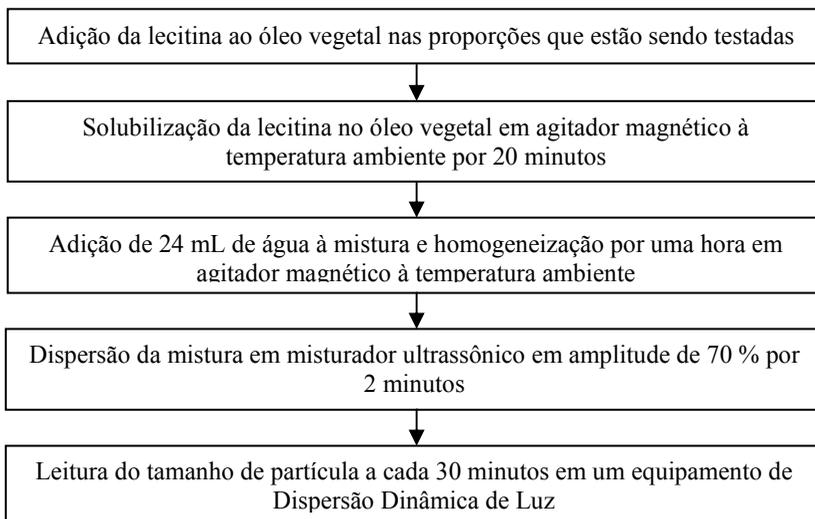


Figura 3.1 Fluxograma de processo para a obtenção das miniemulsões.

A medida do tamanho de partícula foi realizada utilizando equipamento de Dispersão Dinâmica de Luz (COULTER NP4 PLUS ou ZETASIZER, NANO SERIES) que determina o diâmetro médio das partículas considerando a taxa de difusão das partículas através do fluido. A amostra é iluminada por um feixe de laser e a luz espalhada pelas partículas é captada por um cabo de fibra ótica colocado em um determinado ângulo e transmitida para o tubo fotomultiplicador e pulso amplificador/discriminador, onde é transformada em um sinal elétrico. Como cada partícula muda de posição em relação ao fluido e em relação às demais partículas devido ao movimento Browniano, estas interferem na intensidade de luz captada pelo detector. As partículas maiores mudam de posição mais devagar, e causam uma lenta flutuação de intensidade, ao contrário das menores, que se movem mais rapidamente e causam rápidas flutuações de intensidade. Estas flutuações na intensidade fornecem informações sobre a taxa de difusão das partículas. Conhecendo-se o coeficiente de difusão das partículas no fluido com a equação de Stokes-Einstein, obtém-se o tamanho de partícula (ROMIO, 2007).

A amostra de miniemulsão para análise de tamanho médio de partícula, no COULTER NP4 PLUS, foi diluída com água destilada em proporção de 1:5 (0,5 mL de amostra e 2 mL de água) preparada diretamente na cubeta de vidro.

3.4 Técnicas analíticas

3.4.1 Amostragem

As amostras do cultivo, de 2 mL, foram coletadas em microtubos, centrifugadas a 10956 $\times g$ por 3 minutos e os sobrenadantes foram utilizados para as análises de consumo de substrato e nitrogênio e a atividade enzimática durante o cultivo. Os sobrenadantes foram congelados e os precipitados lavados uma vez com água destilada e, após a última centrifugação, congelados para posterior análise de polímeros.

3.4.2 Determinação da concentração de biomassa

A biomassa ao longo do cultivo foi determinada por espectrometria, por meio de leitura da absorbância em espectrofotômetro (modelo SF325NM, da marca TECNAL) a 600 nm. Para manter uma precisão adequada (região linear), a faixa de

absorbância utilizada foi entre 0,0 e 0,8. A partir deste valor, foram feitas diluições para manter a linearidade.

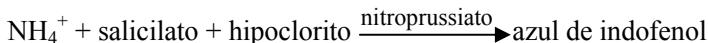
A determinação da concentração celular foi realizada por meio de análise gravimétrica, em que o precipitado obtido após a centrifugação de 2 mL da amostra foi submetido à secagem em estufa a 100 °C por 24 h. Após este tempo, as amostras foram colocadas em dessecador por 20 minutos e pesadas. A amostragem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

3.4.3 Determinação de açúcares redutores totais

A determinação de açúcares redutores totais (ART) foi realizada pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). As amostras foram diluídas adequadamente, de forma que a concentração de substrato se encontrasse dentro do intervalo de concentração da curva padrão, ou seja, entre 0,3 e 2,0 g.L⁻¹ de glicose (Figura A1 do Apêndice). Um volume de 0,5 mL de amostra foi adicionado em tubos *Folin Wu*, juntamente com 1 mL de reagente DNS, e então submetido a tratamento térmico em banho de água a 100 °C por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo e acrescentou-se água destilada até que o menisco do tubo fosse atingido, totalizando um volume de 12,5 mL. A absorbância foi lida a 540 nm em espectrofotômetro (modelo SF325NM, da marca TECNAL).

3.4.4 Determinação de nitrogênio

O nitrogênio foi determinado utilizando-se o *kit* Uréia ES (Gold Analisa) que determina uréia pelo método enzimático-colorimétrico. A uréia, através da ação enzimática, é decomposta em nitrogênio amoniacal, que é determinado por colorimetria. O fundamento do método é apresentado a seguir:



Reativos do *kit*

- Reativo 1: tampão fosfato 20 mmol.L⁻¹, salicilato de sódio 62 mmol.L⁻¹ e nitroprussiato de sódio 3,4 mmol.L⁻¹
- Reativo 2: solução enzimática de urease > 500 U.mL⁻¹

- Reativo 3: oxidante hipoclorito de sódio 7 mmol.L^{-1} e NaOH 150 mmol.L^{-1}
- Reativo 1A: mistura dos reativos 1 e 2.

As amostras foram devidamente diluídas para que a concentração de nitrogênio se encontrasse dentro do intervalo de concentração da curva padrão, ou seja, entre $0,05$ e $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrogênio (Figura A2 do Apêndice). O procedimento analítico para determinação da concentração de nitrogênio das amostras encontra-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Volumes de amostra e reagente utilizados na quantificação de nitrogênio.

| | Branco | Amostra |
|---|--------------------|--------------------|
| Amostra | - | 10 μL |
| Reativo 1A | 1000 μL | 1000 μL |
| Homogeneizar e incubar por 10 minutos em temperatura ambiente | | |
| Reativo 3 | 1000 μL | 1000 μL |
| Homogeneizar e incubar por 10 minutos em temperatura ambiente | | |

A absorbância das amostras foi lida a 600 nm em espectrofotômetro (modelo SF325NM, da marca TECNAL).

3.4.5 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada utilizando-se o *kit* Lipase (Gold Analisa), que determina a atividade enzimática pelo método colorimétrico. A lipase sérica hidrolisa especificamente um tioéster, liberando o tioálcool correspondente e ácido butírico. O tioálcool reage com o ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzóico em meio tamponado formando um ânion de coloração amarela, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de enzima e apresenta a absorção máxima em 412 nm . O inibidor empregado na metodologia evita a interferência de esterases inespecíficas que poderiam hidrolisar o substrato.

Reativos do *kit*

- Tampão: Tampão TRIS 100 mmol.L^{-1} e azida sódica $7,7 \text{ mmol.L}^{-1}$
- Inibidor: PMFS (fenil-metil-sulfonil fluoreto) 20 mmol.L^{-1} em etanol
- Reagente de cor: Acetato de sódio 20 mmol.L^{-1} ; DTNB (ácido ditio bis-2-nitrobenzóico) 3 mmol.L^{-1} e azida sódica $7,7 \text{ mmol.L}^{-1}$
- Substrato: BALB (tributirato de 2,3 dimercaptopropanol) 20

mmol.L⁻¹; lauril sulfato de sódio 20 mmol.L⁻¹ em etanol

- Inativador: lauril sulfato de sódio 27,6 mmol.L⁻¹

As amostras utilizadas para esta análise foram armazenadas em temperatura entre 2 e 8 °C por um período máximo de 24 horas após término do cultivo, a fim de garantir que a atividade enzimática não sofresse alteração. O procedimento analítico para determinação da concentração de lipase das amostras encontra-se na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 Volumes de amostra e reagente utilizados na determinação da atividade enzimática.

| | Branco | Amostra |
|---|---------------|----------------|
| Tampão | 1,0 mL | 1,0 mL |
| Amostra | 50 µL | 50 µL |
| Inibidor | 20 µL | 20 µL |
| Reagente de cor | 100 µL | 100 µL |
| Homogeneizar e incubar a 37 °C por 2 minutos | | |
| Substrato | - | 100 µL |
| Homogeneizar e incubar a 37 °C por 30 minutos | | |
| Inativador | 2,0 mL | 2,0 mL |
| Substrato | 100 µL | - |

A absorbância das amostras foi lida a 412 nm em espectrofotômetro (modelo SF325NM, da marca TECNAL).

A atividade enzimática foi calculada pela Equação 3.1.

$$\text{Atividade enzimática} = \text{At} \cdot \frac{1000}{7} = \text{At} \cdot 143 \quad (3.1)$$

Onde:

At: Absorbância do teste

O fator fixo 143 é utilizado para converter as unidades espectrofotométricas de lipase em U.L⁻¹ (unidade de atividade enzimática por litro de meio). A reação é linear até 75 U.L⁻¹. Para valores maiores, o tempo de incubação após adição do substrato deve ser reduzido. Para o cálculo, deve-se multiplicar a absorbância por 30 e dividir pelo tempo de incubação utilizado.

3.4.6 Determinação da concentração de P(3HB)

A concentração de P(3HB) foi determinada por cromatografia gasosa, conforme o método de metanólise baseado em Braunegg et al. (1978), com as modificações propostas por Brandl et al. (1988).

Metanólise

Após o descongelamento das amostras, estas foram ressuspensas em 2 mL de clorofórmio PA e 2 mL de metanol acidificado, que contém $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido benzóico, como padrão interno, e 15 % (v/v) de H_2SO_4 , em tubos de ensaio com tampa de rosca. A suspensão foi homogeneizada em vortex e então as amostras foram submetidas a tratamento térmico em banho de água por duas horas a 100°C . Posteriormente as amostras foram resfriadas em banho de gelo, e 1 mL de água destilada foi acrescentada no tubo. A mistura foi homogeneizada durante 30 segundos em vortex. A fase orgânica (inferior) foi retirada utilizando-se uma pipeta de *Pasteur* e armazenada sob refrigeração para posterior análise de cromatografia gasosa.

A curva padrão foi feita utilizando-se o poli(3-hidroxibutirato) (Sigma), como padrão externo, com massa variando entre 0,001 e 0,03 g. Os padrões sofreram o mesmo processo de metanólise que as amostras. Um exemplo de curva padrão encontra-se na Figura A3 do Apêndice.

Cromatografia gasosa

A coluna utilizada para a dosagem de P(3HB) foi de sílica fundida (\varnothing 0,53mm/30m) modelo Supercowax-10. O cromatógrafo foi um CG-90 equipado com detector de ionização de chama (FID ar-hidrogênio). O gás de arraste foi o nitrogênio com vazão constante de 30 mL.min^{-1} . As temperaturas de injeção, detecção e coluna foram respectivamente 190 , 230 e 120°C . A integração e os cromatogramas foram obtidos através do *software* Clarity Lite (DataApex[®]).

3.5 Tratamento dos dados

Considerando-se que o acúmulo de P(3HB) é intracelular, é importante a definição dos termos a seguir, para melhor entendimento da metodologia adotada para os cálculos:

X_t (biomassa total) = biomassa contendo P(3HB) intracelular

X_r (biomassa residual) = $X_t - \text{P(3HB) intracelular}$

A análise cinética dos resultados obtidos para os cultivos foi realizada por meio do ajuste das curvas da biomassa total (X_t) e P(3HB) *versus* o tempo para obtenção de X_r , pelo *software* Lissage (Desenvolvido por Simões, D.A., Arroyo, G. e Uribebarrea, J.L. 1995). A partir destes ajustes, determinaram-se as velocidades específicas de crescimento celular e produção de P(3HB) em relação a X_r , as produtividades global e da fase de produção de P(3HB), e os fatores de conversão de substrato em célula e de substrato em P(3HB).

As diferenças percentuais (aumentos ou reduções expressos em porcentagem) foram calculadas utilizando-se a Equação (3.2).

$$\text{aumento/redução (\%)} = \frac{\text{Valor referência} - \text{Valor comparativo}}{\text{Valor referência}} \cdot 100 \quad (3.2)$$

3.5.1 Produtividade global de P(3HB)

A produtividade global (Equação 3.3) foi calculada pela diferença entre a concentração de P(3HB) em um instante de tempo t ao longo do cultivo e a concentração inicial de P(3HB), dividida pelo intervalo de tempo correspondente.

$$P_r = \frac{P(3HB)_t - P(3HB)_{t_0}}{t - t_0} \quad (3.3)$$

Em que:

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

$P(3HB)_t$ = massa de P(3HB) no instante de tempo t (g) ou concentração de P(3HB) no instante de tempo t ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

$P(3HB)_{t_0}$ = massa de P(3HB) no tempo t_0 inicial (g) ou concentração de P(3HB) no tempo t_0 inicial ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

3.5.2 Produtividade da fase de produção de P(3HB)

A produtividade da fase de produção (Equação 3.4) foi calculada pela diferença entre a concentração de P(3HB) em um instante de tempo t ao longo da fase de produção e a concentração inicial de P(3HB) no início da fase de produção, dividida pelo intervalo de tempo correspondente.

$$P_{rPHB} = \frac{P(3HB)_t - P(3HB)_{t_{0P}}}{t - t_{0P}} \quad (3.4)$$

Em que:

P_{rPHB} = produtividade média de P(3HB) ($\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$) ou ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)

$P(3HB)_t$ = massa de P(3HB) no instante de tempo t (g) ou concentração de P(3HB) no instante de tempo t ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

$P(3HB)_{t_{0P}}$ = massa de P(3HB) no tempo t_{0P} inicial (g) ou concentração de P(3HB) no tempo t_0 inicial ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

3.5.3 Velocidades específicas de crescimento celular e produção de P(3HB)

A partir dos perfis de concentração celular e formação de produto (ajustes feitos com auxílio do *software* Lissage), foi possível determinar, em cada instante, as velocidades instantâneas de crescimento microbiano (dX_r/dt) e de formação de produto ($dP(3HB)/dt$). Dividindo-se as velocidades instantâneas pela concentração celular residual no tempo t , as velocidades específicas de crescimento celular (μ_{X_r}) e formação de produto ($\mu_{P(3HB)}$) foram obtidas e estão representadas pelas Equações 3.5 e 3.6 respectivamente.

$$\mu_{X_r} = \frac{1}{X_r} \cdot \frac{dX_r}{dt} \quad (3.5)$$

$$\mu_{P(3HB)} = \frac{1}{X_r} \cdot \frac{dP(3HB)}{dt} \quad (3.6)$$

3.5.4 Fatores de conversão

Os fatores de conversão de substrato em célula, e substrato em P(3HB) foram calculados por meio do coeficiente angular da reta obtida relacionando-se o consumo de substrato ao longo do tempo com a concentração celular ou a concentração de P(3HB) ao longo do tempo. Um exemplo de gráfico para esta determinação encontra-se na Figura A4 de Apêndice.

3.5.5 Determinação do oxigênio dissolvido

A concentração do oxigênio dissolvido (OD) no meio de cultivo foi medida continuamente através de um eletrodo polarográfico (Mettler-Toledo, Germany), e os dados gerados foram salvos com auxílio de um *software* de aquisição de dados, para posterior análises do coeficiente global de transferência de oxigênio ($K_{L,a}$) e velocidade de respiração celular (QO_2X).

3.5.6 Transferência e consumo de oxigênio durante o cultivo: determinação do $K_{L,a}$ e QO_2

Durante o cultivo, oxigênio é injetado no biorreator e parte dele dissolve-se no meio líquido. Determinada quantia deste oxigênio é consumido pelo micro-organismo para manutenção e crescimento celular. O balanço de oxigênio apresentado na Equação 3.7 representa este fenômeno.

$$\frac{dC}{dt} = K_{L,a}(C_s - C) - QO_2X \quad (3.7)$$

Onde:

QO_2 : velocidade específica de respiração ($gO_2 \cdot g_{cel}^{-1} \cdot h^{-1}$)

$K_{L,A}$: coeficiente volumétrico de transferência de O_2 (h^{-1})

C_s : concentração de saturação de O_2 dissolvido no líquido ($gO_2 \cdot L^{-1}$)

C : concentração de oxigênio no meio líquido ($gO_2 \cdot L^{-1}$)

X : concentração de biomassa ($g_{cel} \cdot L^{-1}$)

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

A determinação do $K_{L,a}$ e da QO_2 foi realizada com emprego do método dinâmico (SCHMIDELL, 2001). Por este método, em determinado instante do cultivo, interrompe-se a aeração para anular a transferência de oxigênio. Conforme ilustra a Figura 3.2, a concentração de OD (C_0), no instante inicial começa a diminuir e o sinal do sensor é registrado continuamente. Ao se atingir certo valor (C_{01}), retoma-se a

aeração nas condições anteriores e registra-se o aumento da concentração de OD até atingir novamente o valor inicial (C_0). Este procedimento deve levar somente alguns minutos, dependendo do estágio do cultivo, sendo importante que a concentração não atinja valores críticos que prejudiquem o metabolismo. Nesse curto espaço de tempo, pode-se supor que não ocorre aumento de X e que QO_2 se mantém constante.

Para o trecho sem aeração, resulta a Equação 3.8.

$$\frac{dC}{dt} = -QO_2X \quad (3.8)$$

Com a consideração anterior de que QO_2 é constante, a Equação 3.8 pode ser integrada resultando na Equação 3.9.

$$C = C_0 - QO_2X(t - t_0) \quad (3.9)$$

A Equação 3.9 prevê uma variação linear com o tempo no trecho sem aeração. Assim, foi obtido o valor de QO_2 através do coeficiente angular QO_2X e do valor de X obtido da análise gravimétrica ao longo do tempo de cultivo.

O valor de K_La foi determinado com a utilização dos dados obtidos durante o aumento da concentração do OD, ilustrado pelo segundo trecho da Figura 3.2, onde a Equação 3.7 foi aplicada integralmente. Assim, rearranjando-se a Equação 3.7, obtém-se a Equação 3.10.

$$\frac{dC}{dt} = K_La \left(C_s - \frac{QO_2X}{K_La} \right) - K_LaC \quad (3.10)$$

Considerando estado estacionário no momento que antecede a interrupção da aeração ($C = C_0$), chega-se à Equação 3.11.

$$C_0 = C_s - \frac{QO_2X}{K_La} \quad (3.11)$$

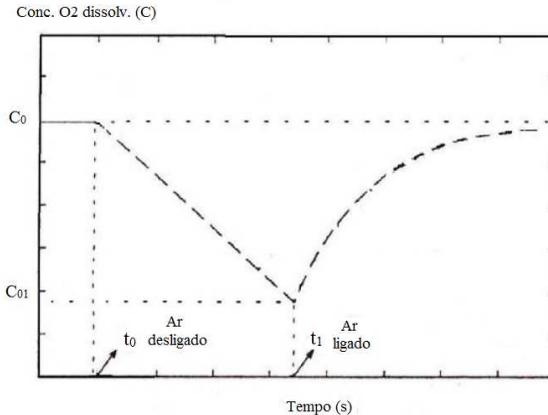


Figura 3.2 Ilustração para explicar o método dinâmico utilizado para determinar $K_L a$ e QO_2 (adaptado por SCHMIDELL, 2001)

Introduzindo a Equação 3.11 na Equação 2.10, obtém-se a Equação 3.12.

$$\frac{dC}{dt} = K_L a(C_0 - C) \quad (3.12)$$

Essa equação pode ser integrada, lembrando que para o instante inicial de retomada da agitação e aeração, ou seja, para $t = t_1$, tem-se $C = C_{01}$, e chega-se à Equação 3.13.

$$\ln\left(\frac{C_0 - C}{C_0 - C_{01}}\right) = -K_L a(t - t_1) \quad (3.13)$$

Assim, isolando-se C , e realizando um ajuste não linear aos dados experimentais representados pela segunda parte da Figura 3.2, encontra-se o valor de $K_L a$.

Os *softwares* utilizados para obter os dados $QO_2 X$ e $K_L a$ ao longo do cultivo, utilizando-se a metodologia descrita acima, foram *Microsoft Office Excel 2007* e *Statistica 6.0*.

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

Micro-organismos com alta velocidade específica de crescimento (μ_{Xr}) devem apresentar alta velocidade específica de respiração (QO_2)

(SCHMIDELL, 2001). Pirt (1975) sugeriu uma relação linear para relacionar as velocidades, representada pela Equação 3.14.

$$QO_2 = m_o + \frac{1}{Y_{X/O}} \mu_{Xr} \quad (3.14)$$

Onde:

m_o : velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção celular ($gO_2 \cdot g_{cel}^{-1} \cdot h^{-1}$);

$Y_{X/O}$: fator de conversão de oxigênio para células ($g_{cel} \cdot gO_2^{-1}$).

A velocidade específica de respiração para manutenção celular (m_o) significa o consumo de oxigênio para $\mu_{Xr} = 0$, ou seja, a velocidade específica de consumo de O_2 para manter as células viáveis. Graficando-se os dados de QO_2 em função de μ_{Xr} , obtêm-se os valores de m_o e $Y_{X/O}$ por meio do coeficiente linear e coeficiente angular da reta de ajuste obtida, respectivamente.

3.5.8 Determinação da biomassa residual a partir dos parâmetros respiratórios

A Equação (3.14) pode ser reescrita da forma apresentada na Equação (3.15).

$$QO_2 X = \frac{1}{Y_{X/O}} \frac{dX}{dt} + m_o \cdot X \quad (3.15)$$

Onde:

X: Concentração celular;

dX/dt : velocidade instantânea de crescimento.

A Equação (3.15) pode ser integrada pelo método dos trapézios, como sugerido por Zabriskie e Humphrey (1978), resultando na Equação (3.17).

$$\int_{t_{n-1}}^{t_n} QO_2 X dt = \int_{X_{n-1}}^{X_n} \frac{1}{Y_{X/O}} dX + \int_{t_{n-1}}^{t_n} m_o \cdot X \cdot dt \quad (3.16)$$

$$X_n = \frac{Y_{X/O}(\Delta t/2) \cdot [(QO_2 X)_n + (QO_2 X)_{n-1}] + [1 - m_o \cdot Y_{X/O}(\Delta t/2)] \cdot X_{n-1}}{1 + m_o \cdot Y_{X/O}(\Delta t/2)} \quad (3.17)$$

Onde:

$\Delta t = t_n - t_{n-1}$: intervalo de tempo do processo;

X_{n-1} : concentração celular em t_{n-1} ;
 X_n : concentração celular em t_n ;
 $(\text{QO}_2\text{X})_{n-1}$: demanda de oxigênio em t_{n-1} ;
 $(\text{QO}_2\text{X})_n$: demanda de oxigênio em t_n .

A Equação (3.17) foi aplicada ponto a ponto, com o auxílio do *software Microsoft Office Excel 2007*, sendo o primeiro valor de concentração celular determinado a partir do inóculo de cada batelada. Com os parâmetros $Y_{X/O}$ e m_o , e os valores de QO_2X , ao longo do tempo, para cada cultivo, foi possível estimar as concentrações celulares nos cultivos com *C. necator*.

3.5.8.1 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com a finalidade de avaliar os resultados obtidos pelo ajuste do modelo proposto por Zabriskie e Humphrey (1978) aos dados experimentais. Os seguintes índices foram utilizados para avaliar os ajustes: erro médio quadrático (MSE), fator BIAS e fator de exatidão (FE).

A Equação (3.18) descreve o cálculo do MSE, sendo que quanto menores os valores obtidos para MSE, melhor é o ajuste do modelo aos dados experimentais.

$$\text{MSE} = \frac{\sum (\text{Valor}_{\text{observado}} - \text{Valor}_{\text{predito}})^2}{n - p} \quad (3.18)$$

Onde:

n: número de pontos experimentais;

p: número de parâmetros do modelo.

O fator bias representa a diferença média entre os valores observados e preditos. Pode ser calculado através da Equação (3.19):

$$\text{BIAS} = 10^{\left(\frac{\sum \log \left(\frac{\text{Valor}_{\text{observado}}}{\text{Valor}_{\text{predito}}} \right)}{n} \right)} \quad (3.19)$$

O fator BIAS procura dar o mesmo peso na média dos valores que sobreestimam e subestimam a média, ou seja, é um desvio relativo médio. Se BIAS for igual a 1, a resposta observada é igual à resposta predita. No entanto, quando BIAS for maior que 1, significa que o valor predito é maior que o observado e, quando BIAS for menor que 1, significa que o valor predito é menor que o observado.

O fator de exatidão (FE), representado pela Equação (3.20) é uma medida da diferença média absoluta entre os valores preditos e observados.

$$\text{Fator exatidão} = 10^{\left(\frac{\sum \log \left(\left| \frac{\text{Valor}_{\text{predito}}}{\text{Valor}_{\text{observado}}} \right| \right)}{n} \right)} \quad (3.20)$$

Conforme aumenta o valor deste fator, o modelo é menos exato na média. No cálculo do fator BIAS obtém-se uma média dos valores, onde os sinais opostos, tendem a se cancelar, já no cálculo do fator de exatidão, por se tratar de valores absolutos, isto não acontece e seu resultado sempre será maior que 1, sendo que quanto maior este valor, menor a exatidão da estimativa da média.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Preparo da miniemulsão

4.1.1 Tempo de ultrassonificação

O primeiro teste visou verificar o tempo de ultrassonificação necessário para obter uma miniemulsão. Os tempos de dois e quatro minutos foram avaliados para diferentes concentrações de lecitina de soja no meio, sendo a amplitude (potência do sonificador) fixada em 70 %. A concentração de lecitina variou de 0,2 a 1,2 % (m/v) (0,06 a 0,36 g de lecitina em meio contendo 6 mL de óleo de soja e 24 mL de água destilada), conforme apresentado na Tabela 3.1 (item – 3.3.4). Para minimizar o aquecimento das amostras, um banho de gelo foi utilizado. Os resultados de tamanho médio das partículas obtidas podem ser observados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Variação do tamanho médio das partículas de miniemulsão em relação a diferentes tempos de ultrassonificação e diferentes concentrações de lecitina de soja.

| Teste | % (m/v) lecitina | Tamanho médio (nm) | | Redução de tamanho (%) |
|-------|---------------------|--------------------|-------|---------------------------|
| | | 2 min | 4 min | |
| A | 0,2 | 456 | 503 | - |
| B | 0,4 | 461 | 382 | 17,14 |
| C | 0,8 | 372 | 347 | 6,72 |
| D | 1,2 | 283 | 269 | 4,95 |

Na Tabela 4.1 é possível verificar que, com o aumento da concentração de lecitina de soja de 0,2 para 1,2 % (m/v) houve uma redução no tamanho médio das partículas da miniemulsão de 38 % e 46 % para 2 e 4 minutos de ultrassonificação, respectivamente. Ainda nesta mesma tabela, observa-se que o aumento no tempo de ultrassonificação praticamente não reduziu o tamanho médio das partículas, sendo que na primeira concentração avaliada o maior tempo resultou em um tamanho médio de partícula maior. Assim, o tempo de ultrassonificação para os demais ensaios foi fixado em 2 minutos.

O *software* de obtenção de dados do DLS (equipamento que determina o diâmetro médio das partículas) determina se a leitura do tamanho da partícula apresenta confiabilidade. Quando a leitura não

apresenta confiabilidade, significa que as partículas formadas, após a sonificação, não atingiram o estado estacionário, tendendo a se unir, e assim, formar micelas com tamanho médio maior. Quando as micelas apresentam tamanho médio superior a 500 nm, a amostra passa a ser uma emulsão, enquanto a miniemulsão é caracterizada por possuir tamanho médio de partícula entre 50 e 500 nm. Observou-se para as formulações A e B, nos dois tempos avaliados que as leituras não apresentaram confiabilidade, assim estas foram desconsideradas para os experimentos posteriores.

4.1.2 Estabilidade da miniemulsão

Com o objetivo de se verificar a estabilidade da miniemulsão, variou-se a concentração de surfactante (lecitina de soja) no intervalo de 0,8 a 1,6 % (m/v) (0,12 a 0,48 g de lecitina), que representam as formulações C, D e E da Tabela 3.1 (item – 3.3.4). A formulação E, que não foi avaliada no primeiro teste, foi acrescentada nesta segunda etapa, para elucidar se ao aumentar ainda mais a concentração da lecitina de soja haveria uma redução maior no tamanho médio da partícula. O tempo de ultrasonificação para este estudo foi fixado em dois minutos, como já citado anteriormente. Após a ultrasonificação da amostra, realizaram-se leituras do tamanho médio de partícula ao longo do tempo. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Variação do tamanho médio das partículas de miniemulsão em relação ao tempo, para diferentes concentrações de lecitina de soja, com dois minutos de sonificação e 70 % de amplitude.

| Teste | % (m/v) lecitina | Tamanho médio (nm) | | | | | |
|-------|---------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| | | 0 min | 30 min | 60 min | 90 min | 120 min | 150 min |
| C | 0,8 | 272 | 289 | 245 | 291 | - | 277 |
| D | 1,2 | 247 | 242 | 250 | - | 255 | 252 |
| E | 1,6 | 226 | 238 | 242 | - | 252 | 250 |

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4.2 observou-se que todas as formulações apresentaram tamanho médio de partícula dentro do intervalo que descreve uma miniemulsão, ou seja, entre 50 e 500 nm, conforme Landfester et al. (1999). A formulação D foi a que apresentou maior estabilidade ao longo do tempo avaliado e, o tamanho médio das partículas para esta formulação foi 9 % menor do que para a formulação C e igual à formulação E, ao final do tempo avaliado. Os

espaços em branco na tabela representam leituras que não puderam ser realizadas devido a problemas técnicos. Assim definiu-se que a melhor concentração de lecitina de soja para a elaboração da miniemulsão é de 1,2% (m/v). Vale ressaltar que uma leitura do tamanho médio de partícula desta formulação foi realizada após 48 h e esta ainda se mantinha estável.

4.2 Composição Química do óleo de soja LEVE

Os resultados da análise cromatográfica para verificação da composição química do óleo de soja da marca LEVE estão apresentados na Tabela 4.3, juntamente com os valores de referência fornecidos pela Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução N° 482, de 23 de setembro de 1999, a qual fornece as características mínimas de qualidade a que devem obedecer os óleos e gorduras vegetais.

Apenas o ácido palmítico encontra-se fora dos valores de referência, todos os demais ácidos graxos estão dentro do intervalo recomendado pela ANVISA, sendo a porcentagem de ácido oléico neste óleo igual a 24,22 % (m/v).

Tabela 4.3 Composição química do óleo de soja da marca LEVE e valores de referência recomendados pela ANVISA para óleos de soja em geral.

| Ácido graxo | Óleo de soja LEVE (%) (m/v) | Valores de referência ANVISA (%) (m/v) |
|-------------------|--------------------------------|---|
| palmítico | 17,69 | 7 - 14 |
| esteárico | 3,76 | 1,4 - 5,5 |
| oléico | 24,22 | 19 - 30 |
| linoléico | 47,06 | 44 - 62 |
| linolênico | 4,86 | 4 - 11 |

A partir da quantificação do ácido oléico, é possível definir o volume de óleo a ser suplementado ao meio de cultivo. Assim, uma vez que concentrações de 0,3 e 0,6 g.L⁻¹ de ácido oléico serão suplementadas ao meio de cultivo, o volume de óleo deve obedecer às concentrações de 1,24 e 2,48 mL_{óleo}.L⁻¹, respectivamente.

4.3 Ensaios preliminares em frascos agitados

Foram realizados cultivos em frascos agitados com o objetivo de avaliar a produção de P(3HB) sob influência da suplementação com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado. Um cultivo não foi suplementado (controle), dois cultivos foram suplementados com um volume de óleo *in natura* que representou 0,3 g.L⁻¹ e 0,6 g.L⁻¹ de ácido oléico, e outros dois cultivos foram suplementados com um volume de miniemulsão que representou 0,3 g.L⁻¹ e 0,6 g.L⁻¹ de ácido oléico. As Figuras 4.1 e 4.2 apresentam os dados de concentração total de células (X_t) e de concentração de polímero ao longo dos cultivos, respectivamente.

Na Figura 4.1, nota-se que as curvas de crescimento de biomassa para todos os cultivos apresentaram pouca diferença, principalmente, comparando-se o cultivo controle com os demais. Assim, se apenas esta figura for avaliada, não é possível obter nenhuma conclusão, a respeito da adição de óleo. Porém, na Figura 4.2 verifica-se que a curva do cultivo controle é bastante próxima às demais, porém decaiu no final, apresentando valores inferiores a todos os demais cultivos. A linha pontilhada nas duas figuras (Figuras 4.1 e 4.2) representa o momento em que ocorreu a limitação da fonte de nitrogênio, e como já citado, este momento corresponde à suplementação do óleo.

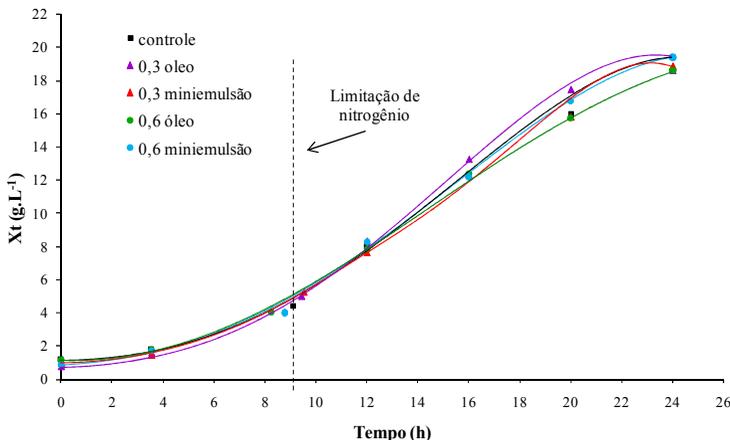


Figura 4.1 Concentração de células totais (X_t) ao longo dos cultivos sem suplementação e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado nas concentrações de 0,3 e 0,6 g.L⁻¹ de ácido oléico. As linhas representam o ajuste pelo *software* Lissage.

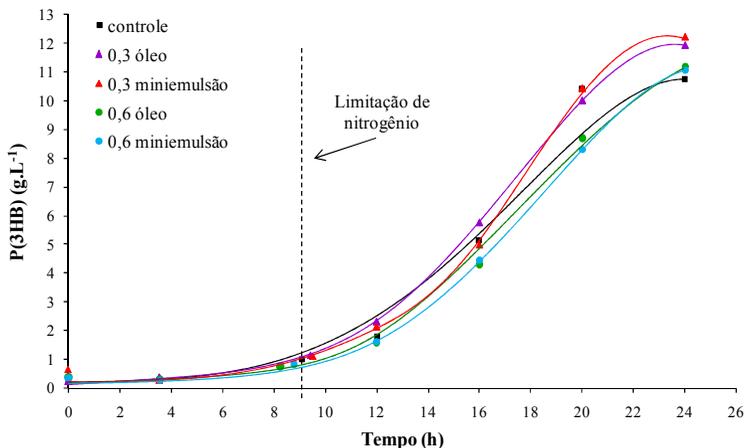


Figura 4.2 Concentração de biopolímero (P(3HB)) ao longo dos cultivos sem suplementação e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado nas concentrações de 0,3 e 0,6 g.L⁻¹ de ácido oléico. As linhas representam o ajuste pelo *software* Lissage.

No momento da suplementação e nas quatro horas posteriores, não ocorre diferença na produção de biopolímero entre os cinco cultivos. Porém, logo após, os cultivos suplementados com 0,3 g.L⁻¹ de ácido oléico se diferenciaram dos demais, apresentando valores superiores de concentração de P(3HB). Já os cultivos suplementados com 0,6 g.L⁻¹ de ácido oléico apresentaram apenas uma pequena diferença do cultivo controle ao final do experimento.

Na Tabela 4.4, pode-se ver a diferença no acúmulo final do biopolímero, em porcentagem, para todos os cultivos, assim como os valores finais de produtividade global e produtividade na fase de produção, a qual considera para o cálculo de produtividade o momento em que houve o início da fase de produção. Nesta figura, verifica-se que, apesar de todos os cultivos suplementados terem produzido mais P(3HB) do que o controle, a porcentagem de polímero produzido para os cultivos suplementados com 0,6 g.L⁻¹ de ácido oléico na forma de óleo de soja *in natura* e miniemulsionado foram muito próximos ao controle. Os cultivos suplementados com o equivalente a 0,3 g.L⁻¹ de ácido oléico na forma de óleo de soja *in natura* e miniemulsionado mostraram um acúmulo maior, sendo 10,8 e 16,4 % (m/v) superior ao controle, respectivamente.

Estes resultados indicam que a suplementação de óleo de soja, em concentração de 0,3 g.L⁻¹ de ácido oléico, apresenta melhores resultados

para a produção de P(3HB) em relação aos cultivos utilizando a concentração de $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ em ácido oléico.

Dalcanton (2006) utilizou a concentração de $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido oléico, presente no óleo de soja *in natura*, para a suplementação de cultivos na produção de P(3HB) por *C. necator* utilizando glicose/frutose (1:1) como principal fonte de carbono e obteve resultados semelhantes ao presente trabalho, onde o aumento alcançado na porcentagem de P(3HB) produzido foi de 11,6 % (m/v). Schneider (2006) avaliou a influência de diferentes concentrações de ácido oléico no meio. O resultado obtido pelo autor foi similar aos apresentados neste trabalho, onde a concentração de $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido oléico mostrou-se melhor do que a concentração de $0,9 \text{ g.L}^{-1}$.

Tabela 4.4 Dados finais de % P(3HB) (m/v), produtividade global e produtividade da fase de produção para os cultivos controle e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado.

| Cultivos | % (m/v) P(3HB) | Produtividade global ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) | Produtividade da fase de produção ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) |
|------------------------|-------------------|--|---|
| controle | 55,5 | 0,44 | 0,64 |
| 0,3 óleo | 61,5 | 0,49 | 0,83 |
| 0,3 miniemulsão | 64,6 | 0,50 | 0,86 |
| 0,6 óleo | 60,1 | 0,46 | 0,67 |
| 0,6 miniemulsão | 57,0 | 0,45 | 0,68 |

Na Figura 4.3 é apresentada a produtividade global, ao longo do tempo, para os cinco cultivos realizados neste experimento. Verifica-se que, novamente os cultivos suplementados com $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido oléico apresentaram melhores resultados frente ao cultivo controle e os cultivos suplementados com $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido oléico. O comportamento das curvas é similar aos da Figura 4.4, onde a diferença se pronuncia a partir da décima quinta hora de cultivo. Apesar de pequena diferença, o cultivo suplementado com $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de miniemulsão de óleo de soja mostrou maior produtividade ao fim do cultivo.

Uma provável explicação é que, ao miniemulsionar o óleo vegetal, as micelas de óleo ficaram com tamanho bastante reduzido, o que facilitou a hidrólise do triacilglicerol em ácido graxo (ácido oléico) pelas enzimas lipases, excretadas pelo micro-organismo *C. necator*. E, após esta hidrólise, o ácido graxo pode ser metabolizado via β -oxidação para a produção de P(3HB). Outro fato que reforça esta hipótese está

relacionado aos cultivos suplementados com óleo de soja *in natura*, em que foi possível visualizar que o óleo ficou na superfície do meio de cultivo, formando grandes aglomerados, o que não ocorreu ao suplementar o meio com óleo de soja miniemulsionado, pois não houve a formação de grandes micelas e o óleo se dispersou com facilidade no meio.

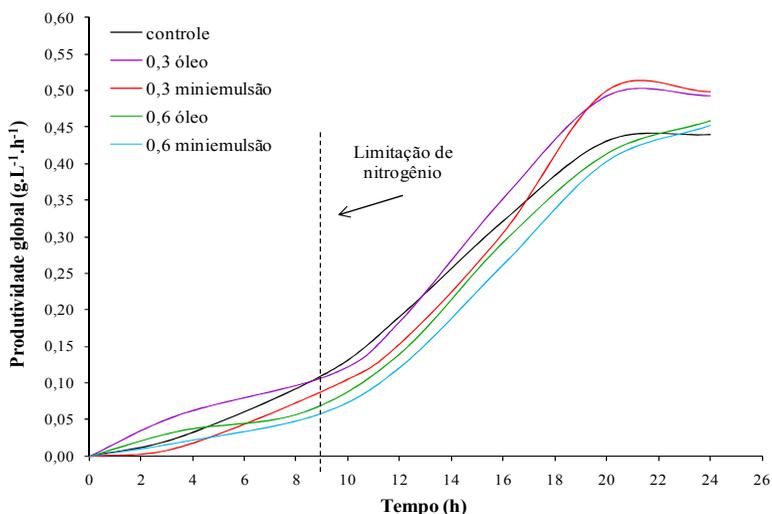


Figura 4.3 Produtividade global para o cultivo controle e para os cultivos suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado nas concentrações de 0,3 e 0,6 g.L⁻¹ de ácido oléico.

Da mesma forma, o fato de que a miniemulsão fica mais dispersa no meio poderia explicar a maior velocidade específica de produção de P(3HB) (μ_{PHB}) apresentada na Figura 4.4, onde o cultivo suplementado com 0,3 g.L⁻¹ de miniemulsão apresentou valores superiores às demais. Provavelmente, o acesso do micro-organismo ao substrato fica facilitado nesta situação, e a velocidade de consumo do óleo é maior, conseqüentemente, a velocidade de produção do P(3HB) também.

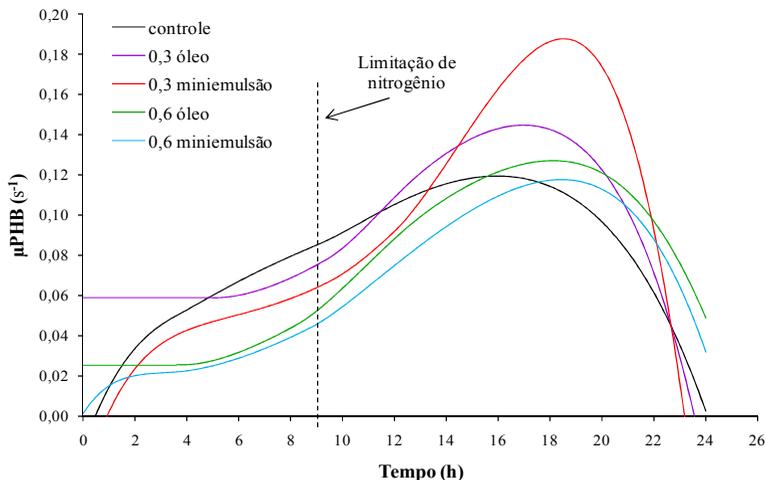


Figura 4.4 Velocidade específica de produção de P(3HB) pra cultivo controle e para os cultivos suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado nas concentrações de 0,3 e 0,6 g.L⁻¹ de ácido oléico.

Quando óleos vegetais são adicionados ao meio de cultivo, primeiramente os triacilgliceróis devem ser convertidos em seus respectivos ácidos graxos e glicerol (DELGADO, 2006). Esta conversão é realizada pela ação da enzima lipase. Já existem estudos que mostram a capacidade da bactéria *C. necator* de excretar lipase para o meio, quando lipídeos estão presentes (FUKUI e DOI, 1998 e KAHAR et al., 2004). Assim esta enzima não precisa ser adicionada separadamente ao meio de cultivo. Após a conversão dos triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol, os ácidos graxos são convertidos a Acetil-CoA pela via conhecida por β -oxidação. As unidades de Acetil-CoA formadas podem ser utilizadas para três fins: o ciclo de Krebs, a biossíntese de P(3HB) e a biossíntese de ácidos graxos. Quando o meio de cultivo não se encontra limitado em um dos nutrientes essenciais, o Acetil-CoA é desviado para o ciclo de Krebs, onde ocorre a produção de energia e intermediários que serão utilizados na produção de biomassa. Já em condições de limitação, o Acetil-CoA é desviado para a biossíntese de P(3HB), uma vez que o crescimento celular no meio diminui. No caso da glicose, esta é convertida a Acetil-CoA pela via glicolítica que então entra na via de biossíntese de P(3HB).

Como na via intermediária da β -oxidação, ocorre a síntese de (R)-3-Hidroxiacil-CoA, que é polimerizado a P(3HB) pela enzima PHA sintase (via de produção de P(3HB)), esta rota metabólica faz com que a

síntese de P(3HB) ocorra com uma velocidade específica maior, pois o ácido graxo não precisa ser primeiramente convertido a Acetil-CoA para então entrar na via de síntese de P(3HB). Da mesma forma, o Acetil-CoA que é direcionado para a via metabólica de biossíntese de ácidos graxos, em determinado momento desta rota biossintética, é convertido a (R)- 3-Hidroxiacil-CoA, e uma vez que a enzima PHA sintase está ativa no meio, P(3HB) é sintetizado.

Por este motivo, a suplementação do óleo de soja, tanto *in natura* quanto miniemulsionado, ao meio de cultivo promove o acúmulo de polímero e o aumento da produtividade do processo.

Os resultados obtidos através dos ensaios em frascos agitados mostraram que a concentração de $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido oléico proporciona um aumento de produtividade e, conseqüentemente, de produção de polímero mais acentuado do que a concentração de $0,6 \text{ g.L}^{-1}$. Maia et al. (1999) estudaram a atividade da lipase extracelular quando *Fusarium solani* cresceu em meio contendo óleo de oliva e perceberam que o aumento da concentração de óleo de oliva acima de 0,5 % (v/v) não estimulou a produção da enzima. Este comportamento da atividade enzimática com relação à concentração de ácidos graxos no meio pode ter ocorrido no presente trabalho. Schneider (2006) observou que não houve um aumento de acúmulo de polímero para os meios de cultivos suplementados com concentrações de ácido oléico superiores a $0,6 \text{ g.L}^{-1}$, um motivo para isto ocorrer, pode ser devido ao fato que concentrações superiores a $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ não estimulem a produção da lipase extracelular para *C. necator*. Assim, definiu-se que para os experimentos posteriores, realizados em biorreator, a concentração de $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ seria utilizada.

A diferença na produtividade do processo e porcentagem final de polímero produzido, não foi acentuada para a suplementação de óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, apesar da miniemulsão ter sido pouco melhor. Assim, cultivos em biorreator foram realizados, para verificar com maior precisão estes comportamentos, uma vez que as condições de cultivo podem ser melhor controladas.

4.4 Ensaios preliminares em biorreator

O tratamento dos dados de biomassa total (X_t), produção de polímero (P(3HB)) e biomassa residual (X_r), obtidos nos experimentos em biorreator, serão todos apresentados em massa (g), para facilitar a análise dos dados, sem a interferência de variações do volume ao longo dos cultivos.

4.4.1 Cultivo controle

O cultivo controle em biorreator, assim como o cultivo controle em frascos agitados, não foi suplementado com óleo de soja, para que fosse possível uma comparação entre as diferentes condições experimentais. Na Figura 4.5, são apresentados os dados de X_t , P(3HB) e X_r , obtidas neste cultivo. A produtividade global do experimento foi de $2,15 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$, a porcentagem final de polímero igual a 68 % (m/v) e as velocidades específicas máximas de crescimento celular e produção de P(3HB) foram de $0,26$ e $0,16 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

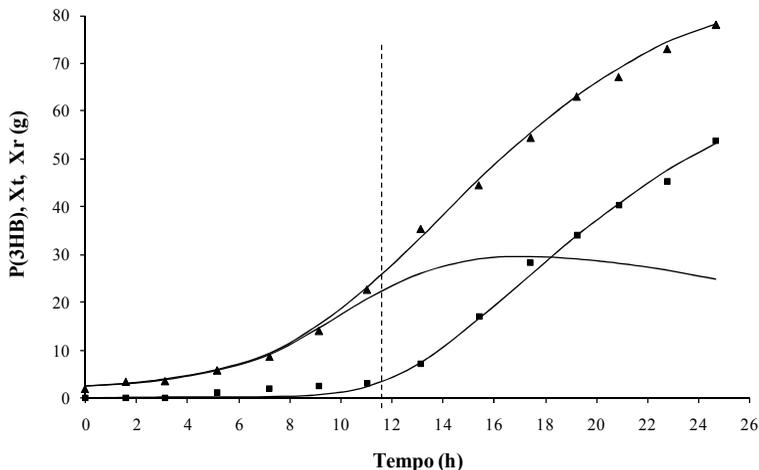


Figura 4.5 Dados obtidos ao longo do cultivo controle, onde (▲) representa a biomassa total (X_t), (■) representa a produção de P(3HB) e (—) representa a biomassa residual (X_r). A linha contínua representa os ajustes feitos pelo *software* Lissage.

4.4.2 Cultivo suplementado com óleo de soja miniemulsionado no momento da exaustão de nitrogênio

No cultivo suplementado com óleo de soja miniemulsionado, o óleo foi adicionado no momento da exaustão da fonte de nitrogênio, de forma que a concentração de ácido oléico no meio de cultivo fosse igual a $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A suplementação ocorreu no momento da exaustão do nitrogênio por problemas de quantificação deste substrato ao longo do cultivo.

Os dados de X_t , P(3HB) e X_r , obtidos para este cultivo podem ser visualizados na Figura 4.6. A produtividade global do experimento foi

de $2,08 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$, a porcentagem final de polímero igual a 64 % (m/v) e as velocidades específicas máximas de crescimento celular e produção de P(3HB) foram de $0,27$ e $0,15 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Ao comparar os resultados para estes dois cultivos em biorreator, controle e suplementado com miniemulsão de óleo de soja, percebe-se que a produtividade global, a porcentagem de acúmulo de polímero, e as velocidades específicas, para ambos os cultivos, são praticamente iguais.

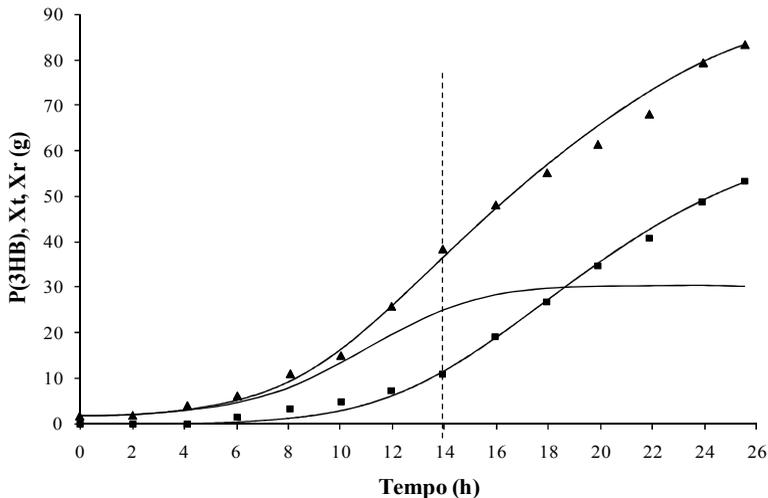


Figura 4.6 Dados obtidos ao longo do cultivo suplementado com óleo de soja miniemulsionado, no momento da exaustão da fonte de nitrogênio, onde (▲) representa a biomassa total (X_t), (■) representa a produção de P(3HB) e (—) representa a biomassa residual (X_r). A linha contínua representa os ajustes feitos pelo *software* Lissage e a linha pontilhada representa o momento da adição do suplemento.

Todos os cultivos realizados em frascos agitados sofreram a suplementação do óleo de soja, tanto *in natura* quando miniemulsionado, no momento da limitação da fonte de nitrogênio, ou seja, quando este substrato se encontrava em uma concentração aproximada de $0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (a concentração de $0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrogênio caracteriza a limitação deste nutriente, uma vez que a produção de P(3HB) é promovida quando a concentração atinge este valor), diferentemente deste caso, onde a suplementação ocorreu no momento da exaustão da fonte de nitrogênio. Estes resultados mostram que pode haver um momento ótimo para que a suplementação do meio seja realizada, e os ácidos graxos sejam devidamente convertidos a polímero, para proporcionar aumento de produtividade e acúmulo de P(3HB).

As lipases possuem grande importância no processo proposto neste trabalho, uma vez que, sem a presença destas no meio de cultivo, a célula não é capaz de incorporar os ácidos graxos, e consequentemente, estes não são convertidos a polímero. Autores reportam que a composição do meio de cultivo influencia diretamente a produção e a excreção da lipase para o meio (GONÇALVES, 2007; PINHEIRO, 2006). Desta forma, é necessário verificar em qual momento o suplemento deve ser adicionado ao meio, para que a atividade enzimática seja máxima, pois quanto maior a quantidade de enzima, ou quanto maior for a sua atividade, maior será a velocidade de hidrólise dos ácidos graxos, e consequentemente, maior a velocidade de consumo deste substrato.

4.5 Avaliação da atividade enzimática em função da suplementação do meio

Baseada na hipótese de que há um momento ótimo para a adição do suplemento ao meio de cultivo, de forma a promover a atividade enzimática, e consequentemente acelerar a hidrólise dos ácidos graxos, a atividade enzimática das lipases foi avaliada ao suplementar-se o meio em diferentes momentos ao longo do cultivo. Para isto, sete cultivos em frascos agitados foram realizados, um cultivo controle, dois cultivos onde ocorreu a suplementação de óleo de soja *in natura* e miniemulsionado quando a concentração da fonte de nitrogênio era de aproximadamente $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, dois cultivos onde ocorreu a suplementação de óleo de soja *in natura* e miniemulsionado quando a concentração da fonte de nitrogênio era de aproximadamente $0,4 \text{ g.L}^{-1}$, e por fim, dois cultivos onde ocorreu a suplementação de óleo de soja *in natura* e miniemulsionado quando a concentração da fonte de nitrogênio era de aproximadamente $0,2 \text{ g.L}^{-1}$.

Os valores finais de biomassa total (X_t), produção de P(3HB) e porcentagem de acúmulo de P(3HB) para os sete cultivos estão apresentados na Tabela 4.5, juntamente com o valor da concentração de nitrogênio que era esperada e a concentração real na hora da suplementação. Vale ressaltar que a concentração de nitrogênio que é considerada limitante para produção de P(3HB) é igual a $0,4 \text{ g.L}^{-1}$.

Tabela 4.5 Dados finais de biomassa total (X_t), produção de P(3HB) e porcentagem de P(3HB), para os cultivos controle e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, em diferentes concentrações de nitrogênio.

| Forma de adição | Momento da adição (h) | [N] teórico ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | [N] real ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | X_t ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | P(3HB) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | % P(3HB) (m/v) |
|------------------|-----------------------|--|---|--|---|----------------|
| - | - | - | - | 16,57 | 9,30 | 56 |
| <i>in natura</i> | 12,5 | 0,50 | 0,54 | 13,01 | 5,65 | 44 |
| miniemulsão | 12,5 | 0,50 | 0,49 | 11,88 | 3,29 | 28 |
| <i>in natura</i> | 14,0 | 0,40 | 0,42 | 16,41 | 9,14 | 56 |
| miniemulsão | 14,0 | 0,40 | 0,44 | 14,87 | 8,10 | 54 |
| <i>in natura</i> | 16,0 | 0,20 | 0,26 | 12,28 | 4,64 | 38 |
| miniemulsão | 16,0 | 0,20 | 0,28 | 12,88 | 5,42 | 42 |

Na Figura 4.7, observa-se o comportamento da atividade enzimática ao longo dos sete cultivos. A atividade enzimática para todos os cultivos é muito parecida até o momento da suplementação do óleo de soja (entre 1 e 2 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$). Como a bactéria *C. necator* é capaz de excretar lipase para o meio de cultivo, mesmo sem um substrato indutor presente no meio, existe uma produção basal desta enzima. Este é um comportamento típico, que acontece com os micro-organismos produtores de lipase (ALONSO, 2001).

Após a suplementação, houve um aumento na atividade em todos os seis cultivos suplementados, apenas o cultivo controle manteve seu valor inicial, o que já era esperado, uma vez que a excreção da enzima não foi induzida neste caso. Este comportamento está de acordo com os resultados presentes na literatura onde, para que haja uma maior produção e excreção da enzima, substratos indutores devem ser acrescentados ao meio. A atividade enzimática tem sido detectada em meios de cultivo que contêm substratos lipídicos, como ácido oléico e óleos vegetais, o que sugere que a enzima seja induzida por estes substratos (DEIVE, COSTAS e LONGO, 2003).

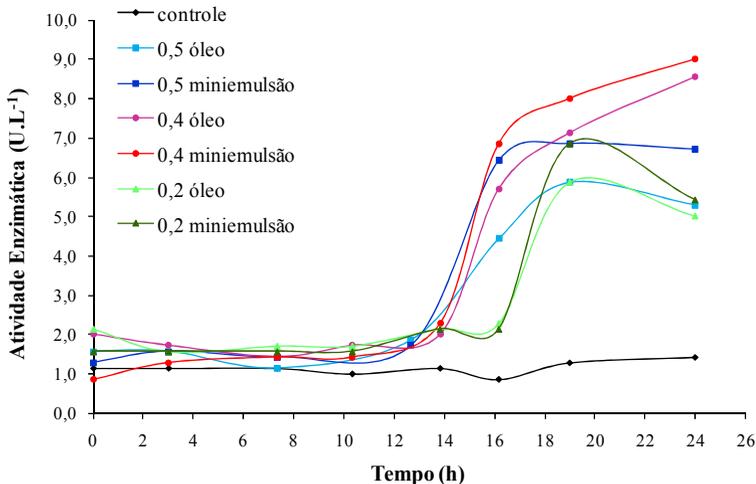


Figura 4.7 Atividade enzimática dos cultivos controle e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, quando a concentração de nitrogênio era aproximadamente $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,2 \text{ g.L}^{-1}$.

De forma geral, em todos os cultivos onde a suplementação foi realizada com óleo de soja miniemulsionado a atividade enzimática foi maior do que quando o óleo de soja *in natura* foi suplementado ao meio. Em quatro dos seis cultivos suplementados, o comportamento da atividade enzimática foi similar, onde primeiramente houve um aumento de atividade, até atingir um valor máximo, e então houve um decaimento da atividade até o final do cultivo.

Os cultivos suplementados com óleo de soja *in natura*, quando as concentrações de nitrogênio eram de $0,5$ e $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, tiveram um mesmo comportamento, atingindo o mesmo valor máximo, em 19 horas de cultivo, apesar de terem sido suplementados em concentrações diferentes de nitrogênio. Já os cultivos suplementados com miniemulsão de óleo de soja, quando as concentrações de nitrogênio eram iguais a $0,5$ e $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, alcançaram o mesmo valor máximo de atividade enzimática em 19 horas de cultivo, como nos casos anteriores, porém os valores finais de atividade enzimática diferiram, sendo que no cultivo suplementado quando a concentração de nitrogênio era de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, este valor foi superior. Porém, os melhores valores de atividade enzimática foram obtidos nos cultivos suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado quando a concentração de nitrogênio foi de aproximadamente a $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ no momento da suplementação. A atividade enzimática foi ligeiramente superior nestes cultivos em relação

aos demais, pois ao invés de atingir um valor máximo e posteriormente apresentar um decaimento, as curvas de atividade enzimática ainda não alcançaram seu máximo, e continuariam a crescer se o cultivo tivesse sido prolongado, para então decair.

Na Figura 4.8, estão apresentadas as sete curvas geradas para a atividade enzimática, sendo o tempo “0”, o momento da adição do suplemento. Através desta Figura é possível visualizar melhor o comportamento da atividade enzimática após o momento da suplementação.

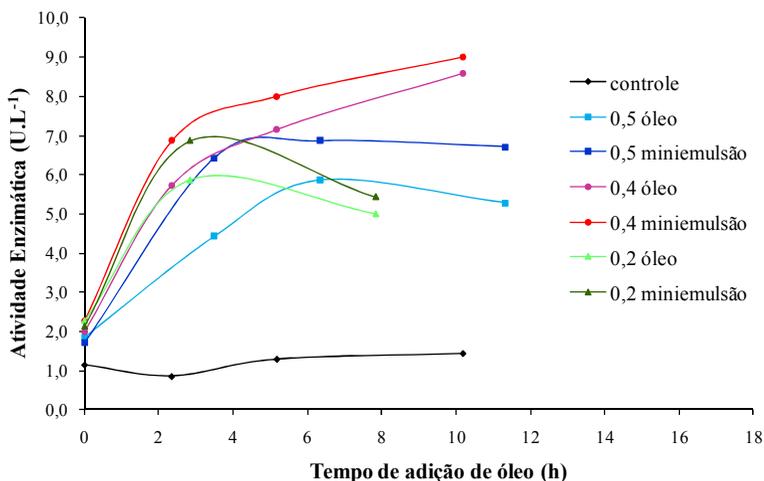


Figura 4.8 Atividade enzimática dos cultivos controle e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, considerando o tempo “0” como sendo o momento da adição do suplemento.

De acordo com os resultados obtidos para a atividade enzimática, definiu-se que o melhor momento para suplementar os cultivos com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, é quando a concentração de nitrogênio no meio for próxima a $0,4 \text{ g.L}^{-1}$, que é a concentração limitante, onde a produção de P(3HB) é induzida.

4.6 Cultivos suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado

Uma vez definida a concentração de óleo de soja a ser suplementada no meio de cultivo e o melhor momento para realizar a suplementação, dois cultivos foram realizados em biorreator para

verificar a influência deste suplemento na produtividade de P(3HB) e no acúmulo de polímero pela célula.

O cultivo controle não foi repetido, uma vez que ele não é influenciado pela suplementação e será utilizado apenas para comparação com os demais. Para os dois cultivos que serão apresentados a seguir, o tempo de fase de produção foi ampliado, para que fosse possível estudar melhor a fase de produção de P(3HB), pois nos cultivos apresentados nas figuras 4.5 e 4.6, as curvas de biomassa total e produção de polímero apresentavam uma tendência a continuar crescendo, o que pode influenciar no resultado final dos experimentos. Vale ressaltar que pulsos da fonte de carbono foram realizados ao longo dos cultivos, de forma a garantir que este substrato não atingisse concentrações limitantes.

Na Figura 4.9 (A) e (B), são apresentados os dados de X_t , P(3HB) e X_r , obtidas no cultivo suplementado com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, respectivamente. O tempo de fase de produção para ambos os cultivos foi de 22 h. Os cultivos foram parados neste momento, pois as curvas de biomassa e P(3HB) começaram a decair, indicando uma possível lise celular e consumo de P(3HB). Conforme Aragão et al. (1996), para prolongar a fase de produção e proporcionar maior acúmulo de polímero, os cultivos deveriam ter sido alimentados com a fonte de nitrogênio, ao longo da fase de produção, de forma a manter esse nutriente em níveis limitantes. Assim a velocidade específica de crescimento do micro-organismo seria mantida em níveis mínimos por um período de tempo maior, e o início da lise celular demoraria mais para ocorrer.

As porcentagens máximas de polímero acumulado nos cultivos suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado foram de 72,5 e 78,5 % (m/v), respectivamente, enquanto a porcentagem máxima de P(3HB) acumulado no cultivo controle foi igual a 68 % (m/v). O cultivo controle poderia ter um acúmulo maior de polímero se a fase de produção tivesse sido prolongada, porém, percebe-se pela inclinação das curvas, de biomassa total e P(3HB), para o cultivo controle, que ambas apresentam uma tendência a estabilizar-se, enquanto as demais continuam crescendo. Esta comparação pode ser melhor visualizada nas Figuras 4.10 (A) e (B), que mostram a evolução da biomassa total e P(3HB), respectivamente, para os três cultivos.

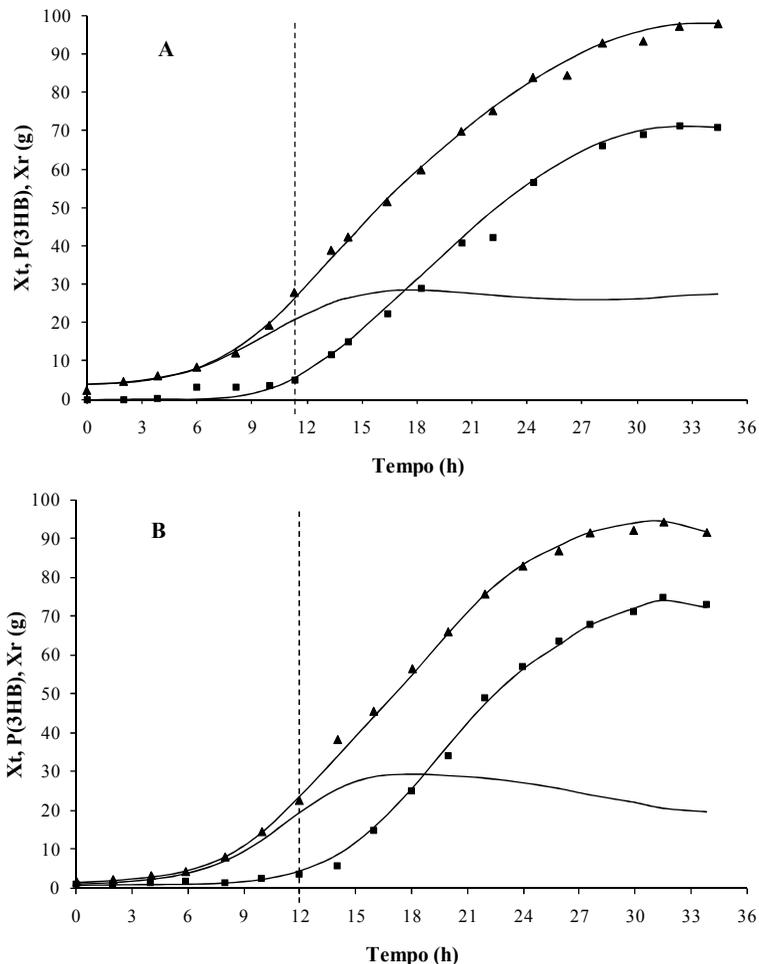


Figura 4.9 Dados obtidos ao longo do cultivo suplementado com óleo de soja *in natura* (A) e miniemulsionado (B), no momento da limitação da fonte de nitrogênio, onde (▲) representa a biomassa total (X_t), (■) representa a produção de P(3HB) e (—) representa a biomassa residual (X_r). A linha contínua representa os ajustes feitos pelo *software* Lissage e a linha pontilhada representa o momento da adição do suplemento.

Assim como havia ocorrido nos cultivos realizados em frascos agitados, as curvas de biomassa total foram praticamente iguais para os três cultivos. Já as curvas de produção de P(3HB) mostram pequenas diferenças. Até o momento da limitação da fonte de nitrogênio, que

ocorreu com aproximadamente 12 horas de cultivo, as três curvas foram muito próximas, e posteriormente apresentaram diferentes comportamentos.

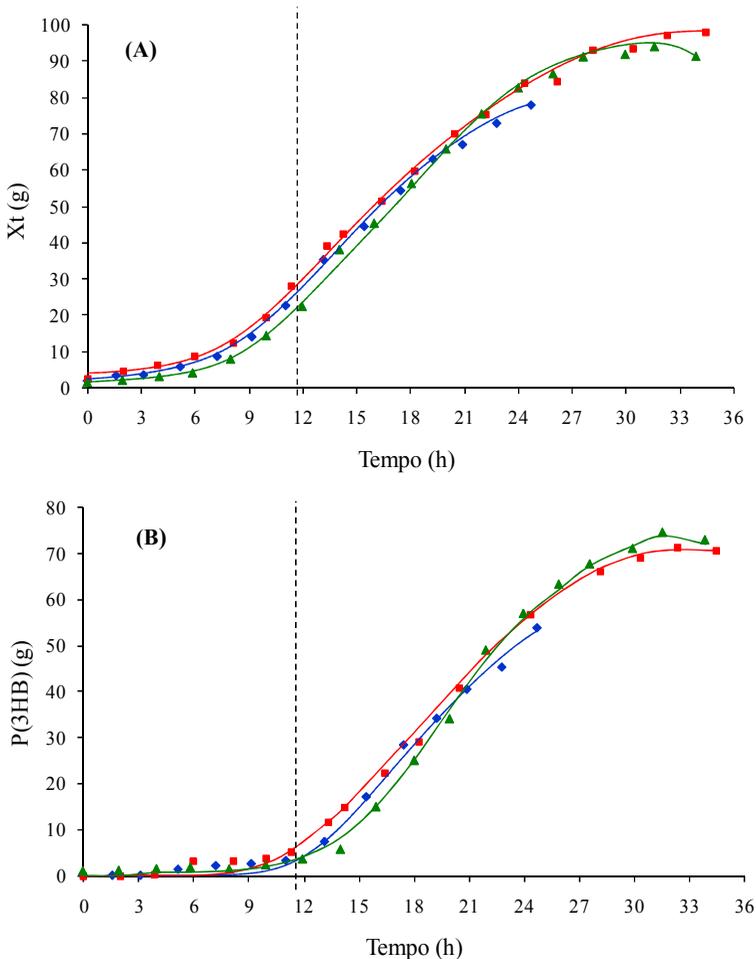


Figura 4.10 Evolução da biomassa total (A) e da produção de P(3HB) (B), para os cultivos controle (\blacklozenge), suplementado com óleo de soja *in natura* (\blacksquare), e suplementado com óleo de soja miniemulsionado(\blacktriangle). A linha contínua representa os ajustes feitos pelo *software* Lissage, a linha pontilhada representa o momento da suplementação com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado.

Na Figura 4.11, que mostra as velocidades específicas de produção de P(3HB), percebe-se um comportamento similar para o

cultivo controle e para o cultivo suplementado com óleo de soja *in natura*, onde ambos apresentam a velocidade específica máxima logo após o momento da suplementação e posteriormente decaem. Diferentemente, o cultivo suplementado com óleo de soja miniemulsionado atinge a velocidade específica máxima de produção do polímero pouco mais tarde e alcança valor superior às outras duas.

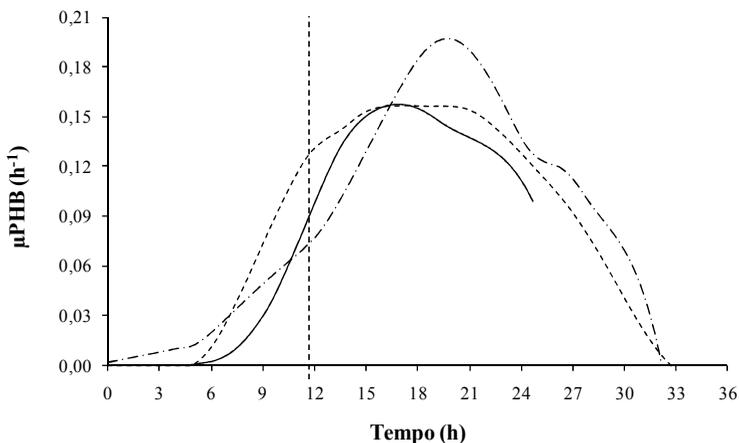


Figura 4.11 Velocidade específica de produção de P(3HB) ao longo do tempo para os cultivos controle (—), suplementado com óleo de soja *in natura* (---), e suplementado com óleo de soja miniemulsionado (- · - · -). A linha pontilhada representa o momento da suplementação com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado.

Na Figura 4.12, pode-se verificar a produtividade global de P(3HB) ao longo do tempo para os três cultivos. Inicialmente, o comportamento das curvas é similar, e após a limitação da fonte de nitrogênio, a produção do polímero é induzida, e as curvas apresentam maior diferenciação. A produtividade final do cultivo controle é menor quando comparada aos outros dois cultivos, analisando-se a tendência da curva, acredita-se que esta não continuaria crescendo, mas sim se estabilizaria em um patamar constante, assim como ocorreu com as demais após atingir a produtividade máxima, para então decair.

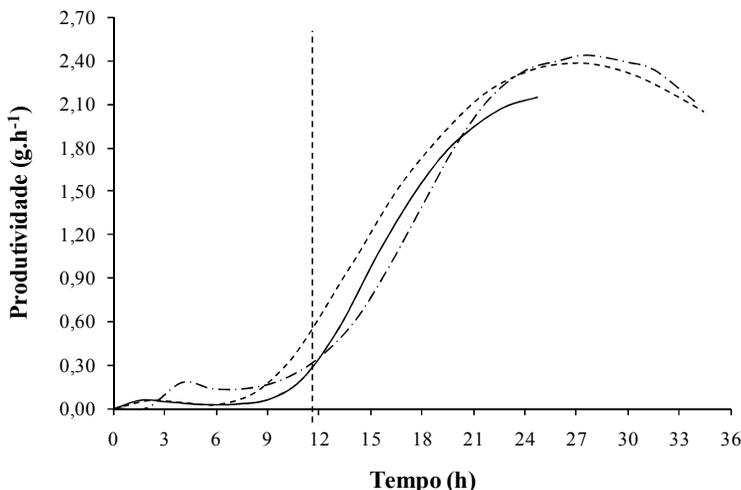


Figura 4.12 Produtividade global de P(3HB) ao longo do tempo para os cultivos controle (—), suplementado com óleo de soja *in natura* (-----), e suplementado com óleo de soja miniemulsionado (- · - · -). A linha pontilhada representa o momento da suplementação com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado.

Dalcanton (2006) alcançou aumento de 12 % no acúmulo final de polímero para cultivos realizados em frascos agitados a 35 °C, com glicose como substrato principal e suplementação de óleo de soja *in natura*.

Rodrigues (2005) verificou que a suplementação de óleo de soja *in natura*, na concentração de 0,3 g.L⁻¹ de ácido oléico, em cultivos onde o amido hidrolisado foi a principal fonte de carbono, promoveu um aumento de 10 % (m/v) na porcentagem final de polímero intracelular, sendo a temperatura de cultivo igual a 30 °C. Neste mesmo trabalho, Rodrigues reportou um aumento de 50 % na produtividade global de P(3HB).

Squio (2003) suplementou o meio de cultivo com 0,3 g.L⁻¹ de ácido oléico puro, e constatou uma produção de polímero 10 % (m/v) maior no cultivo suplementado. Este autor também estudou a suplementação do meio com óleo de canola, de forma que a concentração de ácido oléico no meio fosse igual a 0,3 g.L⁻¹, e verificou aumento de 8 % (m/v) de P(3HB) intracelular.

Nos cultivos em biorreator, realizados no presente estudo, o aumento de polímero intracelular foi de 6,6 e 15,5 % (m/v) nos cultivos suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado quando

comparados com o cultivo controle, respectivamente. A produtividade máxima dos cultivos suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado foi 0,23 e 0,29 $\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$ maior, quando comparadas ao cultivo controle, respectivamente. Sendo os valores máximos de produtividade para os cultivos controle e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado de 2,15, 2,38 e 2,44 $\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente.

Na tabela 4.6 são mostrados os fatores de conversão de glicose/frutose em célula ($Y_{Xr/S}$), glicose/frutose em P(3HB) ($Y_{P(3HB)/S}$), e de nitrogênio em célula ($Y_{Xr/N}$) para os três cultivos realizados em biorreator.

Tabela 4.6 Fatores de conversão de glicose/frutose em célula ($Y_{Xr/S}$) para as fases de crescimento e de produção, glicose/frutose em P(3HB) ($Y_{P(3HB)/S}$) e nitrogênio em célula ($Y_{Xr/N}$), para os cultivos controle e suplementados com óleo de soja *in natura* e minimeulsionado.

| cultivo | $Y_{Xr/S}$ (crescimento) ($\text{g}_{Xr}\cdot\text{g}_S^{-1}$) | $Y_{Xr/S}$ (produção) ($\text{g}_{Xr}\cdot\text{g}_S^{-1}$) | $Y_{Xr/N}$ ($\text{g}_{Xr}\cdot\text{g}_N^{-1}$) | $Y_{P(3HB)/S}$ ($\text{g}_{P(3HB)}\cdot\text{g}_S^{-1}$) |
|-------------|---|--|---|---|
| controle | 0,34 | 0,10 | 6,50 | 0,39 |
| óleo | 0,32 | 0,02 | 6,60 | 0,36 |
| miniemulsão | 0,36 | 0,03 | 6,80 | 0,34 |

O fator de conversão de nitrogênio em célula foi praticamente igual para os três cultivos, e está próximo ao valor encontrado por Aragão (1996), que foi de 7,3 $\text{g}_{Xr}\cdot\text{g}_N^{-1}$. Schneider (2006) obteve o valor de 8,3 $\text{g}_{Xr}\cdot\text{g}_N^{-1}$, quando o cultivo foi realizado em temperatura de 37 °C. Segundo este autor, o aumento pode ter ocorrido devido à maior permeabilidade da membrana celular em temperaturas mais altas, o que poderia facilitar a absorção dos nutrientes, e/ou melhorar a eficiência na absorção dos mesmos.

Schneider (2006) obteve fator de conversão de glicose/frutose em célula na fase de crescimento igual 0,32 e na fase de produção igual a 0,10 $\text{g}_{Xr}\cdot\text{g}_S^{-1}$, sendo que a temperatura de cultivo utilizada por este autor foi igual a 30 °C. Os dados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os valores presentes na literatura. Vale ressaltar, que o $Y_{Xr/S}$ teórico é de 0,5 $\text{g}_{Xr}\cdot\text{g}_S^{-1}$ (ROELS, 1983).

O fator de conversão de glicose/frutose em P(3HB) também foi parecido nos três experimentos. Como os ácidos graxos não puderam ser quantificados ao longo da fase de produção, não é possível saber o fator de conversão destes substratos em P(3HB). Porém esperava-se que nos cultivos suplementados com óleo de soja, o $Y_{P(3HB)/S}$ fosse superior,

quando comparados com o cultivo controle. Mazur et al. (2009) suplementaram o meio de cultivo, de *C. necator* DSM 545 crescendo em glicose/frutose, com biodiesel não purificado, que apresenta em sua composição alguns ácidos graxos, e verificaram que nos cultivos suplementados, houve preferência pelo consumo do biodiesel à glicose/frutose, elevando desta maneira o $Y_{P(3HB)/S}$ da glicose/frutose. Uma explicação para o resultado apresentado na Tabela 4.6, pode ser o tempo de cultivo, uma vez que o cultivo controle teve menor tempo de produção que os outros dois, e ao fim dos cultivos suplementados, a fonte de carbono está sendo utilizada em maior quantidade para a manutenção celular e assim, a quantidade de polímero acumulado pela passa a ser menor, o que reduz o fator de conversão.

A atividade enzimática foi avaliada nos cultivos realizados em biorreator suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, e os valores de atividade enzimática obtidos, estão apresentados na Figura 4.13. Como o cultivo controle foi realizado antes de perceber-se a necessidade de realização desta análise, a quantificação de atividade enzimática não pode ser feita, contudo, assim como no cultivo controle feito em frascos agitados, espera-se que a atividade enzimática apresente apenas uma produção basal, a qual ocorre sem adição de indutores no meio de cultivo. Apenas para termos de comparação, a atividade enzimática obtida para o cultivo controle em frascos agitados foi apresentada juntamente com os cultivos suplementados em biorreator, na Figura 4.13.

Ambas as curvas seguiram a mesma tendência apresentada pelos cultivos realizados em frascos agitados, onde até o momento da suplementação, apenas uma atividade basal foi observada e, após a suplementação, a produção de enzima foi induzida, e a atividade alcançou um valor máximo e então decaiu.

Conforme Zarevúcka et al. (2005) e Dalmau et al. (2000), a produção de lipase atinge seu ponto máximo ao entrar na fase estacionária de crescimento e diminui rapidamente após atingir este nível. Nos dois cultivos suplementados, a fase estacionária de crescimento celular ocorreu com, aproximadamente, 16 horas de cultivo. A atividade enzimática atingiu seu valor máximo logo após este período para o cultivo suplementado com óleo de soja *in natura*, porém no caso da miniemulsão do óleo de soja, este valor máximo ocorreu apenas com 22 horas de cultivo.

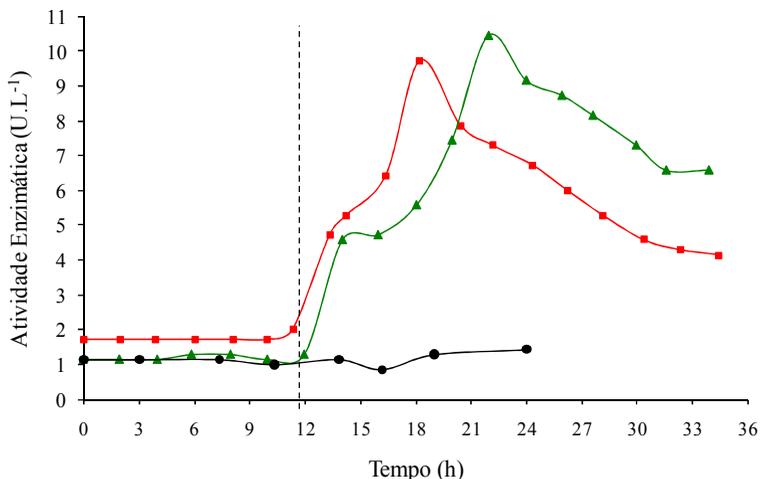


Figura 4.13 Atividade enzimática ao longo do tempo para os cultivos controle (●), e suplementados com óleo de soja *in natura* (■), e miniemulsionado (▲). A linha pontilhada representa o momento da suplementação do óleo de soja.

No presente estudo foi percebido um aumento de acúmulo e produtividade de P(3HB), porém, este aumento não foi tão acentuado quanto nos outros trabalhos presentes na literatura. A principal hipótese levantada para explicar esta diferença foi a alteração da fonte de nitrogênio entre o presente trabalho, em que uréia foi utilizada, e os demais, em que sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) foi utilizado como fonte de nitrogênio.

A justificativa para esta hipótese é que, dentre os componentes do meio de cultivo, o nitrogênio vem mostrando grande influência sobre a produção de lipase. No caso da levedura *Candida sp.* o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentou o melhor resultado para síntese de lipase (TAN et al., 2003). Ginalska, Bancercz e Kornilowicz-Kowalska (2004) concluíram que a uréia foi a fonte de nitrogênio que proporcionou a maior produção de lipase em cultura de *Geotrichium* R59 (uma nova cepa isolada pelos autores). Estes resultados mostram que, para cada micro-organismo, pode existir uma fonte de nitrogênio que promova a maior produção de lipase.

Kahar et al. (2004) avaliaram a atividade enzimática em cultivos com *C. necator* H16, onde a fonte de nitrogênio era NH_4Cl , e obtiveram atividade máxima de 9 U.L^{-1} . A atividade enzimática máxima obtida no cultivo suplementado com óleo de soja *in natura* (neste trabalho) foi de

10 U.L⁻¹. Apesar de os valores serem próximos, não é possível tirar grandes conclusões, uma vez que as cepas utilizadas nos experimentos são diferentes, contudo, estas fontes de nitrogênio parecem ter uma influência similar sobre esta linhagem bacteriana. Dados de atividade enzimática para cultivos de *C. necator* com (NH₄)₂SO₄ como fonte de nitrogênio não foram encontrados na literatura.

Desta forma, se o (NH₄)₂SO₄ apresentar maior influência sobre a produção de lipase, atividades enzimáticas maiores serão obtidas em cultivos que utilizam este substrato como fonte de nitrogênio e assim, os ácidos graxos presentes no meio serão hidrolisados de forma mais rápida e incorporados ao polímero com maior velocidade. Contudo, esta suposição só poderá ser confirmada realizando-se experimentos utilizando-se esta fonte de nitrogênio.

Quando os cultivos suplementados são comparados entre si, a diferença na produtividade é de apenas 0,06 g.h⁻¹, o que mostra que a miniemulsão, apesar de apresentar maior área de contato entre o óleo e a água, não proporcionou maior acúmulo de polímero como era esperado. Este comportamento pode ter ocorrido, pois a estrutura formada na miniemulsão pode ter dificultado o acesso do micro-organismo a este substrato em um primeiro momento, e apenas após uma desestabilização desta estrutura é que o óleo de soja pode ter sido consumido. Quando o surfactante é adicionado ao meio, com o objetivo de estabilizar as gotículas de óleo formadas, uma estrutura termodinamicamente estável é criada, onde a parte polar do surfactante fica em contato com a água e a parte apolar em contato com o óleo. Cada surfactante tem um efeito diferente sobre a estabilidade termodinâmica devido às diferentes estruturas químicas destes compostos. Assim, outros surfactantes devem ser avaliados na preparação da miniemulsão, objetivando reduzir este fenômeno.

4.6.1 Transferência de oxigênio para os cultivos controle e suplementados com óleo de soja in natura e miniemulsionado

A transferência de oxigênio foi estudada durante os cultivos de *C. necator* para estimar os parâmetros respiratórios deste micro-organismo nas condições de cultivo impostas nos ensaios em biorreator, realizados neste trabalho. Dentre os parâmetros respiratórios estão a velocidade específica de respiração (QO₂), coeficiente de transferência global de oxigênio (K_{1a}), velocidade específica de consumo de oxigênio para manutenção celular (*mo*) e fator de conversão de oxigênio em célula (Y_{X/O}).

Para que os parâmetros respiratórios fossem determinados, o modelo dinâmico proposto por Humphrey e Taguchi (1966) foi utilizado. Na Figura 4.14, visualiza-se uma curva típica gerada durante o cultivo suplementado com óleo de soja *in natura*, obtida durante a execução do método dinâmico, para determinar o QO_2X em um determinado tempo de cultivo. Onde C_0 representa a concentração de oxigênio inicial, ou seja, antes de a aeração ser cessada, t_0 é o instante em que a aeração foi cessada, onde pode-se verificar um decaimento de C até atingir o valor C_{01} , e t_1 é o momento da retomada da aeração nas mesmas condições que estava sendo mantidas anteriormente.

De acordo com a concentração celular existente no momento da aplicação do método, o tempo para realização do mesmo pode levar mais, ou menos tempo. Contudo, o intervalo de tempo não deve ser muito longo, para que seja válida a suposição de que a concentração celular ao longo do processo não é alterada, assim como o valor de QO_2 , neste período. Espera-se que o decaimento da concentração de oxigênio dissolvido, no trecho sem aeração, seja linear a partir do momento que esta é interrompida, e assim o coeficiente angular da reta que descreve este decaimento é igual ao QO_2X . Sabendo-se a concentração celular no momento da realização deste procedimento, é possível calcular o QO_2 . No entanto, ao observar a Figura 4.14, verifica-se que a variação linear inicia apenas alguns segundos depois que a aeração é interrompida. Isto ocorre, pois inicialmente ainda existem algumas bolhas de ar no seio do líquido e, portanto, ainda ocorre alguma transferência de O_2 para o meio.

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) foi determinado a partir da curva de retomada da aeração e agitação do sistema. Vale ressaltar que a concentração de oxigênio dissolvido não deve alcançar valores inferiores ao valor crítico no período de decaimento da curva, para que a respiração microbiana não seja inibida, o que acarretaria em lise celular. No período de retomada da aeração, considera-se que a velocidade de respiração não tenha sido afetada. Assim, obtém-se os valores para K_{La} ao plotar os dados de concentração de oxigênio dissolvido *versus* o tempo, para o período da retomada da aeração, com auxílio do *software* Statística 6.0 e através da Equação (3.12 – item 3.5.6), encontra-se o valor de K_{La} . Na Figura 4.15, está representado o ajuste realizado no *software* Statística 6.0 para determinar o K_{La} , em dados de respirometria gerados ao longo do cultivo suplementado com óleo de soja *in natura*, logo após a limitação da fonte de nitrogênio.

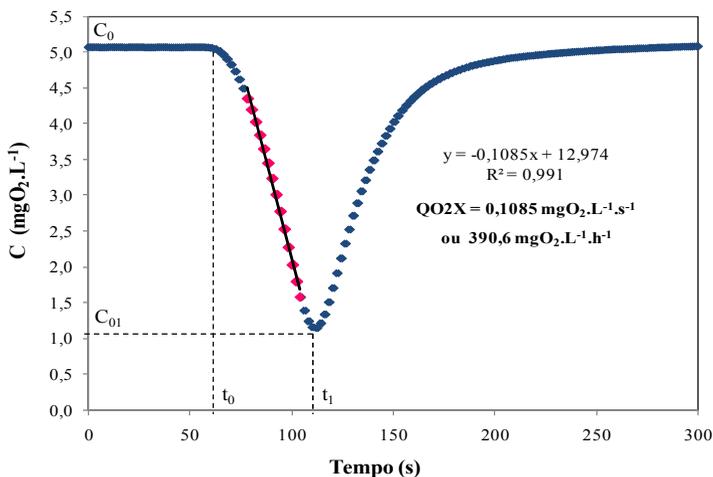


Figura 4.14 Variação da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo, após aplicação do método dinâmico para determinação dos parâmetros respiratórios no cultivo suplementado com óleo de soja *in natura*.

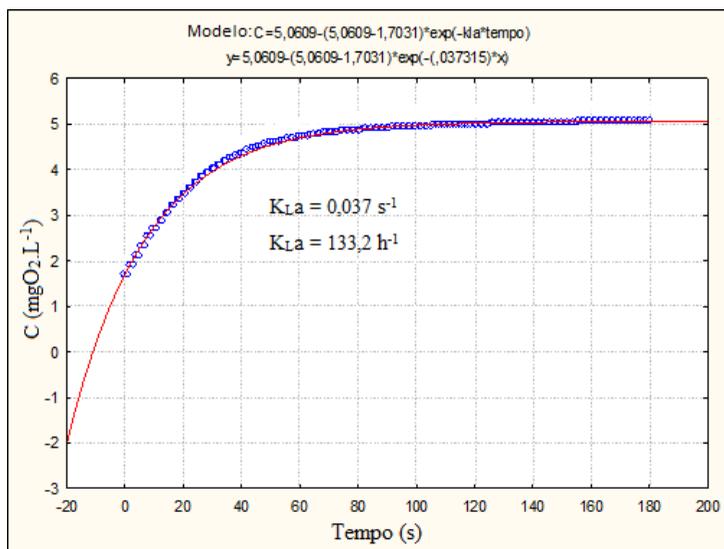


Figura 4.15 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência oxigênio (K_La), utilizando-se o método dinâmico no cultivo suplementado com óleo de soja *in natura*.

Em estágios mais avançados do cultivo, onde a concentração celular é maior, observou-se que o nível crítico para a concentração de

oxigênio dissolvido foi alcançado, uma vez que o decaimento da concentração ocorre de forma muito rápida depois de cessada a aeração no sistema. Quando a concentração crítica foi alcançada, ao final da curva de retomada da aeração, a concentração de oxigênio dissolvido alcançou um patamar superior ao patamar inicial do ensaio, o que indica que ocorreu lise celular, ou que o metabolismo do micro-organismo foi afetado de forma prejudicial. Este comportamento pode ser visualizado na Figura 4.16, onde a curva, obtida ao longo do cultivo controle, mostra o comportamento do oxigênio dissolvido ao longo da respirometria, para o caso em que a concentração de oxigênio alcançou valores inferiores à concentração crítica. Ao longo da fase de produção, verificou-se que a velocidade específica de respiração e, conseqüentemente, o coeficiente volumétrico de transferência de O_2 apresentaram um decaimento. Este efeito ocorreu, pois na fase de produção a velocidade específica de crescimento microbiano decaiu, e desta forma o consumo de oxigênio é utilizado para a manutenção celular, em sua maioria.

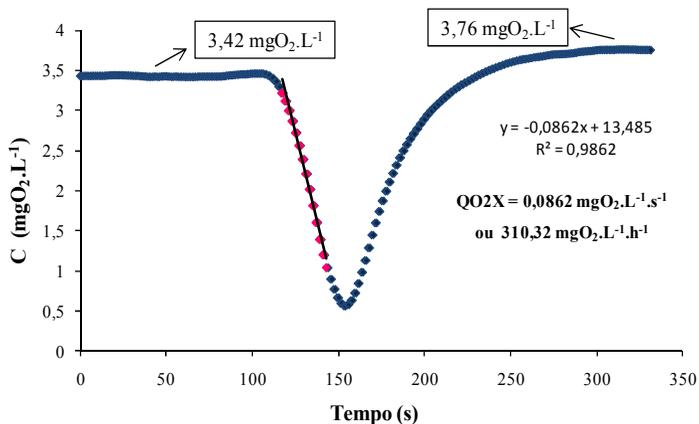
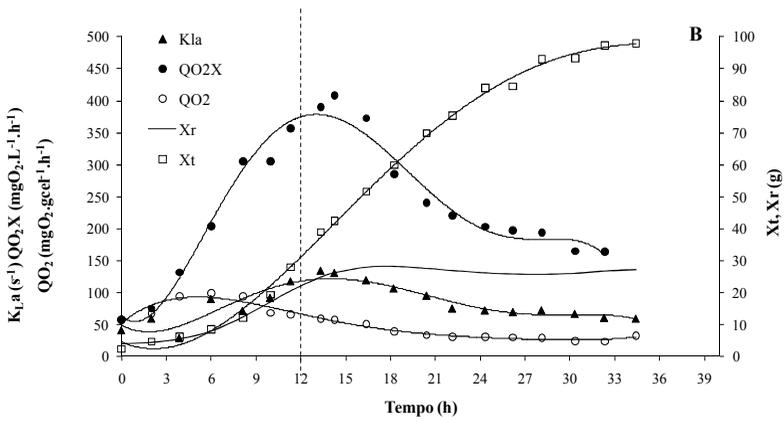
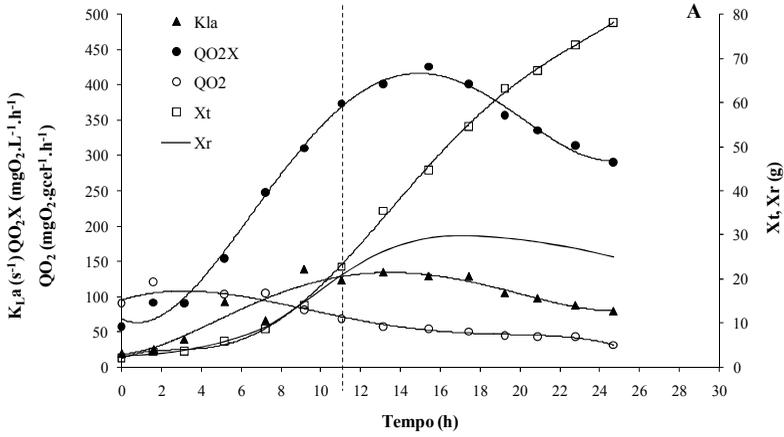


Figura 4.16 Variação da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo, após aplicação do método dinâmico para determinação dos parâmetros respiratórios, quando a concentração de oxigênio dissolvido alcança valores inferiores à concentração crítica no cultivo controle.

Nas Figuras 4.17 (A), (B) e (C) serão apresentados os resultados da análise de respirometria dos cultivos controle, suplementado com óleo de soja *in natura* e suplementado com óleo de soja miniemulsionado, respectivamente. A análise de respirometria foi realizada a cada amostragem, durante o cultivo, para determinação dos parâmetros respiratórios do micro-organismo.



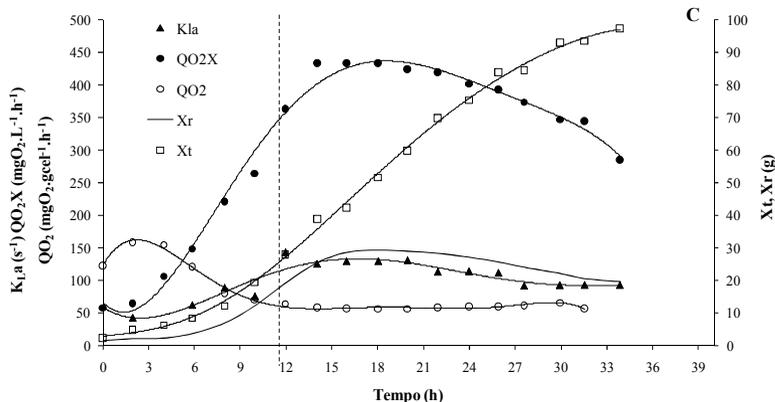


Figura 4.17 Dados de K_{La} (\blacktriangle), QO_2X (\bullet), QO_2 (\circ), X_t (\square) e X_r (—) durante os cultivos controle (A), suplementado com óleo de soja *in natura* (B), e suplementado com óleo de soja miniemulsionado (C). A linha contínua representa os ajustes feitos pelo *software* Lissage e a linha pontilhada representa o momento da adição do suplemento.

A concentração inicial da fonte de nitrogênio foi praticamente igual para os três cultivos (1 g.L^{-1}), desta forma, a biomassa residual atingida também foi muito próxima em todos os casos (7 g.L^{-1}). Este comportamento pode ser confirmado pelas curvas de QO_2X , que atingiram valores máximos muito próximos, em torno de $430 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Após a exaustão da fonte de nitrogênio, a velocidade específica de crescimento microbiano reduziu, o que caracterizou a fase estacionária de crescimento e promoveu o acúmulo de polímero intracelular. Nesta etapa, ocorreu um decréscimo na velocidade específica de consumo de oxigênio, que foi proporcional ao decréscimo da velocidade específica de crescimento microbiano.

O comportamento da velocidade específica de respiração (QO_2), que é a razão entre a velocidade de respiração da biomassa (QO_2X) e a concentração de biomassa residual (X_r), apresenta comportamento similar a QO_2X . No início do cultivo, quando a concentração de biomassa aumenta ao longo do tempo, os valores de QO_2 também aumentam, até atingir um valor máximo na fase exponencial de crescimento, onde $\mu_{X_r} = \mu_{\text{máx}}$, e então começam a decair. Os valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) seguem este mesmo comportamento, pois, quanto maior for a demanda de oxigênio pelas células, maior também deverá ser a quantidade de oxigênio suprida ao meio de cultivo. Em todos os cultivos, o valor de K_{La} atingiu seu máximo no momento da exaustão da fonte de nitrogênio, onde é

iniciada a fase estacionária de crescimento, e a biomassa atinge seu valor máximo. Como a biomassa no momento da exaustão de nitrogênio é praticamente igual para todos os cultivos, o valor de K_{La} máximo ficou em torno de 130 h^{-1} para todos os casos, devido à demanda de oxigênio ser muito similar.

Conforme Farias (2009), os valores de K_{La} devem ficar numa faixa entre 100 e 250 h^{-1} para a fase de crescimento e 70 e 100 h^{-1} na fase de produção para cultivos com o micro-organismo *C. necator*. Os valores obtidos neste trabalho diferem dos propostos por este autor, onde no início da fase de crescimento o K_{La} apresentou valores inferiores a 100 h^{-1} , e na fase de produção, valores inferiores a 70 h^{-1} também foram verificados.

4.7 Previsão da biomassa a partir do QO_2X

Atualmente, acompanha-se o crescimento da biomassa ao longo do cultivo através de leituras de absorbância, que são transformadas em concentração celular através de uma relação linear existente entre estes dados durante a fase de crescimento. Zabriskie e Humphrey (1978) propuseram uma relação entre a velocidade específica de respiração e a concentração celular, a qual pode ser utilizada para previsão da biomassa ao longo do cultivo, uma vez definidos os valores de $Y_{X/O}$ e m_o para o micro-organismo.

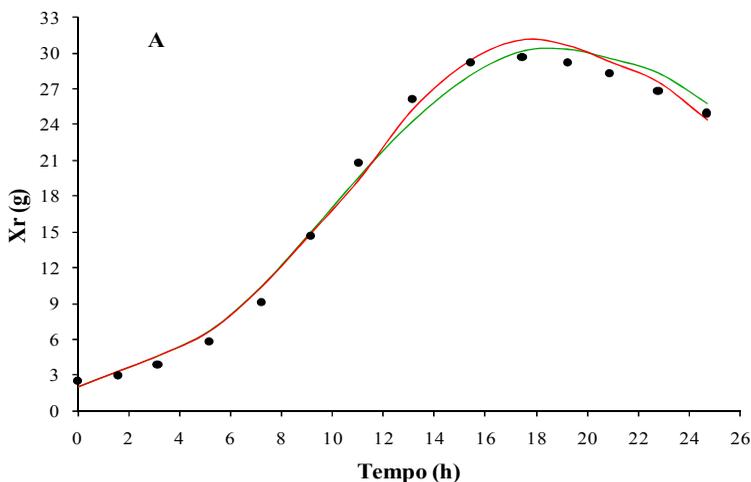
O modelo proposto foi aplicado aos cultivos controle e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, de duas maneiras distintas. Na primeira, investigaram-se os valores de $Y_{X/O}$ e m_o para todo o cultivo e na segunda, dividiu-se o cultivo em fase de crescimento e fase de produção e dois valores de $Y_{X/O}$ e m_o foram encontrados para aplicação do modelo. Neste contexto, investigou-se a relação proposta por Pirt (Schmidell, 2001) para ambas as fases, considerando-se inicialmente o cultivo como um todo e, posteriormente, o cultivo dividido em duas fases. Esta separação entre as fases foi realizada, pois pelos dados apresentados na Figura 4.17 percebe-se uma mudança na respiração microbiana entre a fase de crescimento e a fase de produção.

Na fase de crescimento, a demanda de oxigênio aumenta ao longo do tempo, uma vez que a concentração celular também está aumentando, sendo usado apenas em pequena parte para a manutenção celular, já na fase de produção, o crescimento microbiano reduz de forma acentuada e a demanda de oxigênio também sofre um decréscimo, sendo que a maior

parte desta demanda é utilizada para a manutenção das células já presentes no meio.

Os gráficos gerados para determinação dos parâmetros $Y_{X/O}$ e m_o encontram-se nas Figuras A5, A6 e A7 do Apêndice, e seus respectivos valores, para os três cultivos, estão resumidos na Tabela 4.7. Estes parâmetros foram obtidos pela relação entre a velocidade específica de consumo de oxigênio dissolvido (QO_2) e a velocidade específica de crescimento celular (μ_{Xr}) ao longo do cultivo. De acordo com Pirt, existe uma relação linear entre esses dados, conforme se pode observar na Equação 3.13 (item – 3.5.7).

Os valores observados e preditos pelo modelo na estimativa da concentração da biomassa residual para os cultivos controle, e suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, considerando o cultivo inteiro e dividido em fase de crescimento e produção, estão apresentados nas Figuras 4.18 (A), (B) e (C), respectivamente.



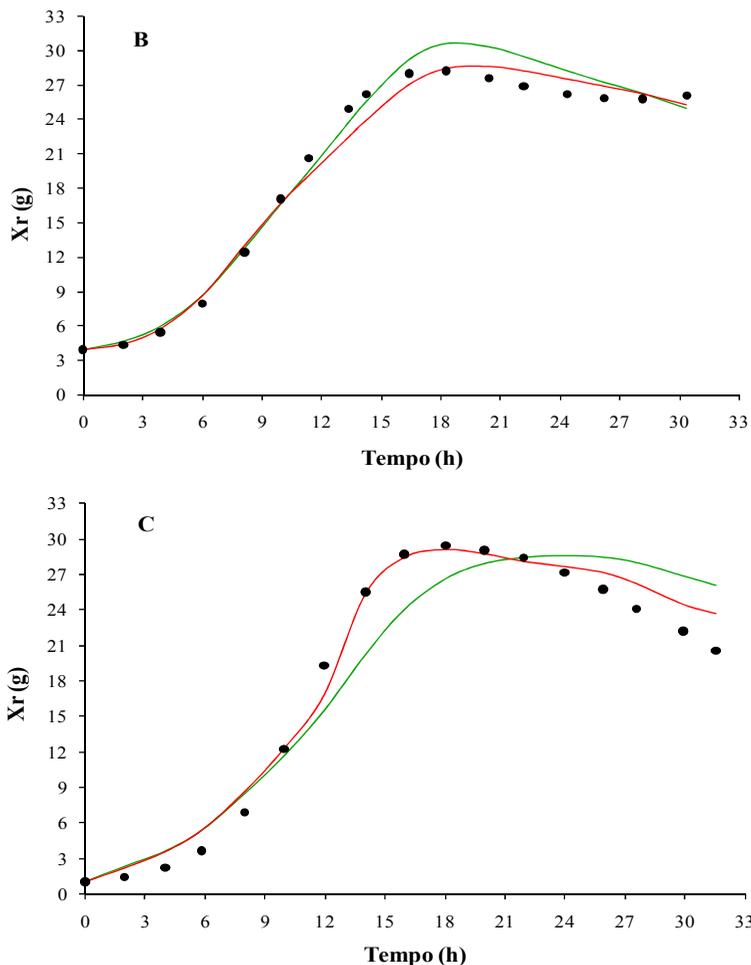


Figura 4.18 Dados de Biomassa residual (●), ajuste considerando as fases de crescimento e produção juntas (—), ajuste considerando as fases de crescimento e produção separadas (—), durante os cultivos controle (A), suplementado com óleo de soja *in natura* (B), e suplementado com óleo de soja miniemulsionado (C).

Tabela 4.7 Fator de conversão de oxigênio em célula ($Y_{X/O}$) e velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção celular (m_o) para os cultivos controle, suplementado com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado.

| Cultivo | Cultivo inteiro | | Fase de crescimento | | Fase de produção | |
|-------------|---------------------|--|---------------------|--|---------------------|--|
| | $Y_{Xr/O}$ (g/g) | m_o $mgO_2 \cdot g_{cel}^{-1} \cdot h^{-1}$ | $Y_{Xr/O}$ (g/g) | m_o $mgO_2 \cdot g_{cel}^{-1} \cdot h^{-1}$ | $Y_{Xr/O}$ (g/g) | m_o $mgO_2 \cdot g_{cel}^{-1} \cdot h^{-1}$ |
| controle | 0,0048 | 46,22 | 0,0051 | 48,96 | 0,0066 | 47,09 |
| óleo | 0,0032 | 34,47 | 0,0047 | 48,89 | 0,0024 | 34,19 |
| miniemulsão | 0,0045 | 55,14 | 0,0031 | 30,47 | 0,0149 | 57,52 |

De um modo geral, observa-se boa correlação entre os resultados experimentais e os estimados pelo modelo, com desvios mais acentuados no período de declínio da curva de X_r , para as três figuras. Este comportamento está provavelmente relacionado às mudanças fisiológicas por que passam os micro-organismos durante esta fase do cultivo. De acordo com Silveira e Molina (2005), que utilizaram o modelo para descrição do comportamento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, este modelo, assim como outros descritos na literatura, é deficiente na previsão do comportamento do cultivo após a fase estacionária, em que ocorre a lise celular.

Para determinar o melhor ajuste dos valores observados em relação aos valores preditos, o cálculo de alguns índices estatísticos foi realizado. A partir destes índices será possível verificar se os valores de $Y_{X/O}$ e m_o forneceram um melhor ajuste aos dados experimentais, quando foram calculados para o cultivo separado em duas fases, ou quando foram calculados considerando o cultivo como um todo. O resultado desta análise estatística está apresentado na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 Índices estatísticos calculados para os ajustes do modelo proposto por Zabriskie e Humphrey (1978) aos dados experimentais de X_r para os cultivos controle, suplementado com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado.

| Cultivo | Cultivo inteiro | | | Cultivo separado | | |
|-------------|-----------------|------|------|------------------|------|------|
| | MSE* | BIAS | FE* | MSE* | BIAS | FE* |
| controle | 1,41 | 0,97 | 1,10 | 2,14 | 0,96 | 1,09 |
| óleo | 6,54 | 0,96 | 1,08 | 0,58 | 0,99 | 1,06 |
| miniemulsão | 5,95 | 0,88 | 1,30 | 1,12 | 0,87 | 1,19 |

*MSE representa o erro médio quadrático e FE o Fator de exatidão.

Para todos os cultivos, o valor de BIAS mostra que os dados preditos são menores do que os valores obtidos experimentalmente. Para

o fator de exatidão, em todos os casos, este índice foi menor na situação em que o cultivo foi separado em fase de crescimento e produção de P(3HB), o que mostra que o ajuste é mais preciso quando as duas fases são separadas para o cálculo de $Y_{X/O}$ e m_o .

O valor de MSE para o cultivo controle foi maior na situação onde o cultivo foi separado em duas partes do que quando ele foi considerado inteiro. Para os cultivos suplementados com óleo de soja, o valor de MSE foi superior no caso em que o cultivo não foi separado, o que mostra que, para ambos os cultivos, o erro médio quadrático foi menor ao considerar-se o cultivo separado em duas fases para o cálculo do $Y_{X/O}$ e m_o .

Ambos os modelos para prever a biomassa residual, considerando o cultivo todo ou dividindo-se as fases, apresentaram bons ajustes aos dados experimentais, o que mostra que o modelo é válido e pode ser utilizado como uma ferramenta para predição da biomassa ao longo do cultivo. O modelo que considera o cultivo separado em duas fases, foi o que apresentou um ajuste ligeiramente superior para a predição do crescimento de *C. necator* ao longo do cultivo.

Ao longo do cultivo, os dados de respirometria são gerados em intervalos de tempo pré-definidos, e, a partir dos ajustes destes dados, é possível obter os dados de QO_2X e K_La a ponto a ponto. Uma vez determinados os parâmetros $Y_{X/O}$ e m_o para o micro-organismo, a previsão da biomassa ao longo do cultivo é feita de forma simples e com maior precisão do que a previsão da biomassa através dos dados de absorvância. Ao utilizar os dados de absorvância para predição, a equação linear se ajusta bem aos dados experimentais apenas na fase de crescimento; já através dos parâmetros cinéticos de respiração a previsão da biomassa é precisa ao longo de todo o cultivo. Uma previsão precisa da biomassa é importante quando suplementações ou adições de meio ocorrem em algum momento do cultivo, pois se sabendo a biomassa e o fator de conversão de nutrientes, como a fonte de carbono e nitrogênio, é possível calcular o momento de alimentar o reator.

A limitação de um nutriente essencial ao micro-organismo ao longo do cultivo pode ser verificada pelos dados cinéticos de transferência de oxigênio no reator. Como já discutido, os valores de QO_2X e K_La apresentam um valor máximo quando a biomassa residual apresenta seu valor máximo, e entra na fase estacionária de crescimento, sendo que logo após este momento os valores apresentam um decréscimo. Assim, a partir do momento que os valores de QO_2X e K_La apresentarem um decaimento, sabe-se que o cultivo está na fase de produção. Uma vez que a Equação 3.16 (item – 3.5.8) se ajustou melhor

aos dados experimentais quando o cultivo foi separado em duas fases, os valores de $Y_{X/O}$ e m_o para a fase de crescimento devem ser utilizados para predição da biomassa até o momento em que ocorra o decréscimo dos valores de QO_2X e K_{La} , e então deve-se passar a utilizar os valores obtidos para a fase de produção.

5 CONCLUSÕES

Por meio dos resultados obtidos, pode-se concluir que em uma amplitude de 70 % e tempo de ultrassonificação de dois minutos, a concentração de lecitina de soja que permitiu a obtenção de uma miniemulsão estável, por um período de até 48 horas, foi de 1,2 % (m/v).

Ao avaliar a suplementação de óleo de soja *in natura* e miniemulsionado em diferentes concentrações de ácido oléico, concluiu-se que as suplementações que ocorreram em concentração de 0,3 g.L⁻¹ do equivalente em ácido oléico foram capazes de promover um maior aumento na produtividade do que as suplementações realizadas com 0,6 g.L⁻¹ de ácido oléico.

No estudo da atividade enzimática, os melhores resultados foram obtidos ao suplementar o meio de cultivo com óleo de soja, tanto *in natura* quanto miniemulsionado, quando a concentração da fonte de nitrogênio no meio era correspondente a 0,4 g.L⁻¹. O cultivo controle, como já era esperado, apresentou apenas uma atividade enzimática basal, uma vez que, neste cultivo não houve a indução da produção de lipase pelo óleo de soja.

Os dados cinéticos mostraram que houve uma maior produção de biopolímero nos cultivos suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, quando comparados ao cultivo controle, o que proporcionou um aumento de produtividade em ambos os cultivos. Os aumentos na produtividade e acúmulo de polímero foram menores neste trabalho do que os obtidos por outros autores na literatura, o que pode ter sido causado pelas diferentes fontes de nitrogênio utilizadas, que interferem diretamente na produção da lipase e em sua atividade no meio de cultivo.

Quando os cultivos suplementados são comparados entre si, a diferença na produtividade foi de apenas 0,06 g.h⁻¹, o que mostra que a miniemulsão, apesar de apresentar maior área de contato entre o óleo e a água, não proporcionou maior acúmulo de polímero como era esperado. Este comportamento pode ter ocorrido, pois a estrutura formada na miniemulsão dificultou o acesso do micro-organismo a este substrato em um primeiro momento, e apenas após uma desestabilização desta estrutura é que o óleo de soja pode ser consumido.

Os dados de transferência de oxigênio para os três cultivos demonstraram que a velocidade específica de respiração (QO₂X) aumenta ao longo da fase de crescimento, uma vez que a concentração

celular no meio está aumentando. Porém, ao entrar na fase de produção e consequentemente atingir a fase estacionária de crescimento, a velocidade respiração apresenta um decréscimo, fato que ocorre, pois o crescimento celular no meio é muito pequeno e o oxigênio é necessário em sua maioria para o fenômeno de manutenção celular. O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) possuiu o mesmo comportamento descrito acima, apresentando um valor máximo no início da fase estacionária de crescimento celular.

Após aplicar o modelo de Zabriskie e Humphrey (1978) aos dados experimentais, verificou-se que o modelo se ajustou bem aos dados experimentais em todos os casos. A análise estatística mostrou que o modelo se ajustou melhor quando os dados experimentais para determinação do fator de conversão ($Y_{X/O}$) e da velocidade específica de consumo de oxigênio para manutenção celular (m_o) foram separados em duas fases, uma de crescimento e outra de produção. Esta separação promoveu melhores resultados, pois a respiração microbiana é diferente nas duas fases. Assim, é possível concluir que o modelo pode ser utilizado como uma ferramenta na predição da biomassa celular ao longo do cultivo de forma mais precisa do que a predição pela absorbância, que apresenta bons ajustes apenas na fase de crescimento.

De forma geral, através dos dados obtidos neste trabalho, conclui-se que não houve diferença entre os cultivos suplementados com óleo de soja *in natura* e miniemulsionado, com lecitina de soja nas condições de emulsificação testadas. Sendo assim, a suplementação do óleo *in natura* é preferível, pois acarreta menores custos no processo. Trabalhos futuros com outros surfactantes e/ou em outras condições de emulsificação poderão mostrar se este comportamento se repete para outras miniemulsões.

6 SUGESTÕES

A partir dos resultados obtidos e das conclusões delineadas anteriormente, pode-se sugerir, para a continuidade deste trabalho:

- Utilizar outros surfactantes para a obtenção da miniemulsão, de forma a verificar se a estrutura formada promoverá melhores resultados para a suplementação do meio de cultivo;

- Avaliar a suplementação com outros óleos vegetais, como o óleo de canola, por exemplo, que apesar de ter um maior custo, também já mostrou bons resultados em trabalhos reportados na literatura;

- Realizar alimentações da fonte de nitrogênio durante a fase de produção, de forma que este nutriente se mantenha em concentrações limitantes no meio de cultivo, para avaliar se a fase de produção de P(3HB) pode ser prolongada, promovendo melhores resultados com relação ao acúmulo do polímero e conseqüentemente, aumento de produtividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; DOI, Y.. Structural effect on enzymatic degradabilities for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 185-192. 1999.

ABIPLAST. **O perfil da indústria brasileira de transformação de material plástico**. Disponível em: <http://www.abiplast.org.br>. Acesso em: 21 julho 2010.

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

AKOH, C. C.; MIN, D. V. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 3 ed. Boca Raton (Fla.). 2008.

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

ALONSO, F. O. M.. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)**. Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado (Centro de Ciências da Saúde). Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2001.

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

ANVISA. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm. Acesso em: 03 agosto de 2010.

ANVISA. **Norma Técnica para Complemento Nutricional**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/19_95.htm. Acesso em: 15 maio de 2011.

ARAGÃO, G. M. F.. **Production de Poly- β -hydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise em oeuvre dès cultures**. Toulouse. These Du Doctorale (Sciences de la Vie), L'institut National dès Sciences appliquees de Toulouse. 1996.

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

ASSUA, J. M. Miniemulsions polymerization. **Progress in polymer science**, v. 27, p. 1283. 2002.

BASSAS, M.; RODRÍGUEZ, E.; LLORENS, J.; MANRESA, A.. Poly(3-hydroxyalkanoate) produced from *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (NCBIM 40045): Effect of fatty acid nature as nutrient. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 352, p. 2259–2263. 2006.

BERBET-MOLINA, M. A.; SILVEIRA, M. M. & SATO, S. **Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meio semi-sintético: simulação matemática do crescimento**. Anais do I Congresso da Sociedade Brasileira de Biotecnologia, São Paulo, p. 178–183, 2001.

BOHMERT, K., BALBO, I.; KOPKA, J.; MITTENDORF, V.; NAWRATH, C.; POIRIER, Y.; TISCHENDORF, G.; TRETHEWEY, R. N.; WILLMITZER, L.. Transgenic Arabidopsis plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up to 4 % of their fresh weighy. *Planta*, v. 211, p. 841-845. 2000.

BRANDL, H. GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, 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., LEFEBVRE G., GENSER K. F.. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 65, p. 127-161. 1998.

BYRON, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Trends in Biotechnology**, v. 5, p. 246-250. 1987.

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

CHEN, Y.; YANG, H.; ZHOU, Q.; CHEN, J.; GU, G.. Cleaner recovery of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 501–506. 2001.

CHOI, J.; LEE, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 13 – 21. 1999.

CHOU, Y. J.; EL-AASSER, M. S.; VANDERHOFF, J. W.. Mechanism of emulsification of styrene using hexadecyltrimethylammonium bromide-cetyl alcohol mixture. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 1, p. 129-150. 1980.

DALCANTON, F. **Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos**. Florianópolis. Dissertação de mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina. 2006.

DALCANTON, F.; IENCZAK, J. L.; FIORESE, M. L.; ARAGÃO, G. M. F.. Produção de Poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* em meio hidrolisado de amido de arroz com suplementação de óleo de soja em diferentes temperaturas. **Química nova**, p. 1 – 5. 2010.

DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M.; CASAS, C.. Effect of different carbon source on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 657 – 663. 2000.

DEIVE, F. J.; COSTA, M.; LONGO, M. A.. Production of thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology letters**, v. 25, p. 1403 – 1406. 2003.

DELGADO, C. C. R. **Estudo da biossíntese de poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) a partir de óleo de soja**. São Paulo. Dissertação de mestrado

(Interunidades em Biotecnologia USP-IPT-BUTANTAN), Universidade de São Paulo. 2006.

DENNIS, D.; MCCOY, M.; STANGL, A.; VALENTIN, H. E.; WU, Z.. Formation of poly(3-hydroxybutirate – co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha*. **Journal of biotechnology**, v. 64, p. 177 – 186. 1998.

FARIAS, D. **Produção e caracterização de poli(3-hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato) por *Cupriavidus necator* em melão cítrico**. Florianópolis. Dissertação de mestrado (Engenharia de alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

FARIAS, D.; IENCZAK, J. L.; ARAGÃO, G. M. F.; SCHMIDELL, W.. **Estimativa da concentração celular através dos dados de velocidade específica de respiração de *Cupriavidus necator* na produção de Poli(3-hidroxibutirato)**. XVII Congresso brasileiro de Engenharia Química, Recife. 2008.

FELTES, M. M. C.. **Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis ricos em ácidos graxos ômega-3 a partir de glicerólise enzimática de óleo de peixe**. Florianópolis. Tese de doutorado (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. 2011.

FERREIRA, M. S. **Formulação de combustíveis alternativos em sistemas microemulsionados empregando óleos vegetais e derivados**. São Luís. Dissertação de mestrado (Química). Universidade Federal do Maranhão. 2006.

FUKUI, T.; DOI, Y. Efficient production of polyhydroxyalcanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 333 – 336. 1998.

GINALSKA, G.; BANCERZ, R.; KORNILLOWICZ-KOWALSKA, T.. A thermostable lipase produced by a newly isolated *Geotrichum*-like strain, R59. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, p. 177 – 182. 2004.

GOMES, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista brasileira de Engenharia Química**, v. 17, p. 24 – 29. 1997.

GONÇALVES, F. A. G.. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. Dissertação de mestrado (Ciência de Alimentos). Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais. 2007.

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 and Environmental Microbiology**, p. 3354-3359. 1990.

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. 1988.

HERBERT, D.; PHIPPS, P. J. & SATRANGE, R. E. **Chemical analyses of microbial cells. Methods in Microbiology**, vol. 5B, p. 209 – 344, Academic Press, New York, 1971.

HUIJBERTS, G. N. M.; RIJK, T. C. ; WARRD, P. ; EGGINK, G.. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1949-1954, 1994.

HUMPHREY, A. E.; TAGUCHI, H.. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. **Journal of Fermentation Technology**, v. 44, p. 881-889. 1966.

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

KICHISE T.; FUKUI, T.; YOSHIDA, Y.; DOI, Y.. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) by recombinant *Ralstonia eutropha* and effects of PHA synthase activity on in vivo PHA biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 66-77. 1999.

- KIM, B. S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 774 – 777. 2000.
- KIM, B. S.; CHANG, H. N.. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 109-112. 1998.
- KRAAK, M. N.; KESSLER, B.; WITHOT, B.. *In vitro* activities of Granule-Bound Poly[(R)-3-Hydroxyalkanoate] Polymerase C1 of *Pseudomonas oleovorans*. **European Journal of Biochemistry**, v. 250, p. 432-439. 1997.
- LANDFESTER, K.; BECHTHOLD, N.; TIARKS, F.; ANTONIETTI, M.. Formulation and stability mechanism of polymerizable miniemulsions. **Macromolecules**, v. 32, p. 5222-5228. 1999.
- LANDFESTER, K. Recent developments in miniemulsions – formation and stability mechanisms. **Macromolecular Symposia**, v. 150, p. 171-178. 2000.
- LANDFESTER, K. Polyreactions in miniemulsions. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 22, p. 896-936. 2001.
- 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. **Trends Biotechnology**, v. 14, p. 437 - 438. 1996b.
- LEE, W.; LOO, C.; NOMURA, C. T.; SUDESH, K.. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6844–6851. 2008.
- LIU, F.; LI, W.; RIDGWAY, D.; GU, T.; SHEN, Z.. Production of poly-beta-hydroxybutyrate on molasses by recombinant *Escherichia coli*, **Biotechnology Letters**, v. 20, pp. 345-348. 1998.

LUND, B.; NORDDAHL, B.; AHRING, B.. Production of lactic acid from whey using hydrolysed whey protein as nitrogen source. **Biotechnology Letters**, v. 14, p.851-856. 1992.

LUZIER, W. D. Materials derived from biomass/biodegradable materials. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 839–842. 1992.

MADISON, L. L.; HIUSMAN, G. W.. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Mycrobiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 21-53. 1999.

MAIA, M. M. D; MORAIS, M. M. C.; MORAIS, M. A.; MELO, E. H. M.; LIMA FILHO, J. L.. Production of extracellular lipase by phytopatogenic fungus *Fusarium solani* FS1. **Revista de microbiologia**, v. 30, p. 304 – 309. 1999.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química nova**, v. 24, p. 87-93. 2001.

MARANGONI, C.; FURIGO, 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.

MAZUR, L. P.; SILVA, D. D. ; GRIGULL, V. H. ; GARCIA, M. C. F. ; MAGALHÃES, T. O. ; WAGNER, T. M. ; EINLOFT, S.; DULLIUS, J. ; SCHNEIDER, A. L. ; PEZZIN, A. P. T.. Strategies of biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) supplemented with biodiesel obtained from rice bran oil. **Materials Science and Engineering**, v. 29, p. 583-587. 2009.

MENDES, A. C. **Lecitina de Soja: processo de obtenção e refino**. Porto Alegre. Monografia (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

MIFUNE J.; NAKAMURA S.; FUKUI T.. Engineering of pha operon on *Cupriavidus necator* chromosome for efficient biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from vegetable oil. **Polymer degradation and stability**, v. 95, p. 1305-1312. 2010.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428. 1959.

MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, p. 1062, 1981.

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

OKADA, M. **Lecitinas, origem, produção e propriedades**. In: I reunião SANBRA sobre lecitinas e suas aplicações, 1985. Campinas. Resumo de palestras. Dezembro de 1985.

PETRAOSVITS, L. A.; PURNELL, M. P. ; NIELSEN, L. K. ; BRUMBLEY, S. M.. Production of polyhydroxybutyrate in sugarcane. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, p. 162-172. 2007.

PINHEIRO, T. L. F.. **Produção de lipase por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como micro-organismo**. Erechim. Dissertação de mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. 2006.

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

POLOVO, S.; TOFFANO, P.; BASAGLIA, M.; CASELLA, S.. Polyhydroxyalcanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7902-7907. 2010.

RAO, U.; SRIDHAR, R.; SEHGAL, P. K.. Biosynthesis and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* from spent palm oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 13-20. 2010.

RAMSAY, B. A. Production and use of biopolymers. **Proceedings of the Symposium on physiology**. Seggau, Austria, 1994.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI, KALIA, V. C..

Polyhydroxyalcanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 137-146. 2003.

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

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

REHM, B. H. A.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A.. A new metabolic link between fatty acid *de novo* synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 24044-24061. 1998.

RODRIGUES, R. C. **Condições de cultura para a produção de Plo(3-hidroxiбутирато) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de indústrias de alimentos**. Florianópolis. Dissertação de mestrado (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. 2005.

ROELS, J. A.. **Energetics and kinetics in biotechnology**. Editora: Essevier biomedical, New York, USA, p. 24, 1983.

ROMIO, A. P. **Obtenção de nanocápsulas via polimerização em miniemulsão**. Dissertação de mestrado (Engenharia química). Universidade Federal de Santa Catarina. 2007.

RUSENDI, D.; SHEPPARD, J. D. Hydrolysis of potato processing waste for the production of poly- β -hydroxybutyrate. **Bioresource Technology**, vol. 54, p. 191-196, 1995.

SCHIMIDELL W. **Agitação e aeração em biorreatores**. In: W. Schimidell, U.A. Lima, E. Aquarone, W. Borzani. *Biotecnologia Industrial*: Engenharia Bioquímica São Paulo: Edgard Blücher, vol. 2.; p.277-331, 2001

SCHNEIDER, A. L. S.. **Síntese, caracterização e biodegradação de poli(3-hidroxiбутирато) – P(3-HB) de *Ralstonia eutropha* e blendas de P(3-HB)/PLC (Poli- ϵ -caprolactona)**. Florianópolis. Tese de doutorado (Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina. 2006.

SCHNEIDER, A. L. S.; SILVA, D. D.; GARCIA, M. C. F.; GRIGULL, L. P.; MAZUR, L. P.; FRLAN, S. A.; ARAGÃO, G. M. A.; PEZZIN, A.

- P. T.. Biodegradation of Poly(3-Hydroxybutyrate) produced from *Cupriavidus necator* with different concentrations of oleic acid as nutritional supplement. **Journal of polymers and the environment**, v. 18, p. 401 – 406. 2010.
- SENIOR, P. J.; DAWES, E. A.. The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Biochemical Journal**, v. 134, p. 225-238. 1973.
- SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. C.. Produção biotecnológica de poli-hidroxicanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. XY. 2007.
- SILVEIRA, M. M.; MOLINA, M. A. B.. Indirect estimation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* biomass concentration using oxygen balance data. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, p. 495 – 500. 2005.
- SLATER, S.; HOUMIEL, K. L.; TRAN, M.; MITSKY, T. A.; TAYLOR, N. B.; PADGETTE, S. R.; GRUYS, K. J.. Multiple β -ketotiolases mediate poly(β -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. **Journal of bacteriology**, p. 1979-1987. 1998.
- SQUIO, C. R. **Estratégia de alimentação e utilização de suplementos nutricionais na produção de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha***. Florianópolis. Dissertação de mestrado (Engenharia de alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. 2003.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y.. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 1503-1555. 2000.
- STEINBÜCHEL, A.; HUSTEDE, E.; LIEBERGESELL, M.; PIEPER, U.; TIMM, A.; VALENTIN, H.. Molecular-basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 217-230. 1992.

STEINBÜCHEL A.; LÜTKE-EVERSLOH T.. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v.16, n. 2, p. 81-96. 2003.

TAGUCHI, K.; AOYAGI, Y.; MATSUSAKI, H.; FUKUI, T; DOI, Y.. Over-expression of 3-ketoacyl-ACP synthase III or malonyl-CoA-ACP transacylase gene induces monomer supply for the polyhydroxybutyrate production in *Escherichia coli* HB101. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 579-584. 1999.

TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DING, L.. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 459 – 365. 2003.

TAVARES, V. B.; SIVERI, K. ; CERON, C. R.; SILVA, R. ; TRABUCO, E. ; LOMBARDI, F. R. ; GOMES, E.. Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de **Penicillium citrinum**: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química nova**, v. 21, p. 722-725. 1998.

TSUGE, T.; FUKUI, T.; MATSUSAKI, H.; TAGUCHI, S.; KOBAYASHI, G.; ISHIZAKI, A.; DOI, Y.. Molecular cloning of two (R)-specific enoyl-CoA hidratase genes from *Pseudomonas aeruginosa* and their use for polyhydroxyalkanoate synthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 184, p. 193-198. 2000.

VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International journal of systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, p. 2285-2289. 2004.

ZABRISKIE, D. W.; HUMPHREY, A. E. Real-time estimation of aerobic batch fermentation by component balancing. **AIChE Journal**, v. 24, p. 1380-0146, 1978.

ZAREVÚCKA, M.; KEJÍK, Z.; SAMAN, D.; WIMMER, Z.; DEMNEROVÁ, K.. Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 481 – 486. 2005.

YAZDANI, S. S.; GONZALES, R.. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, p. 183-213. 2007.

WONG, H. H.; LEE, S. Y. Poly(3-hydroxybutirate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 30-33. 1998.

APÊNDICE

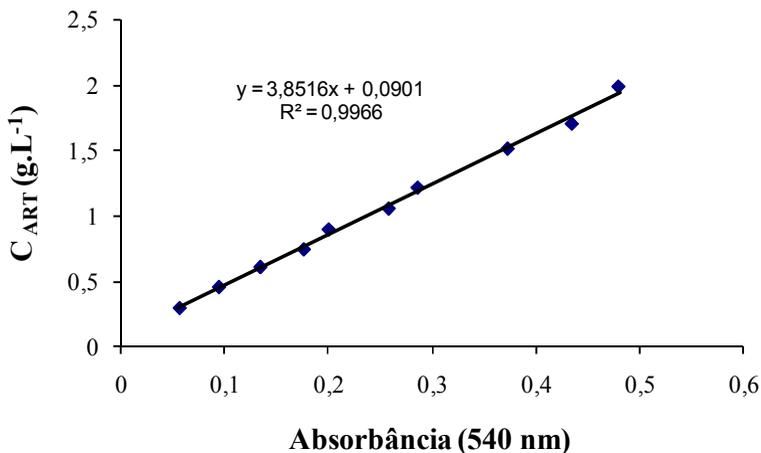


Figura A 1 Curva típica padrão para determinação da concentração de açúcares redutores totais.

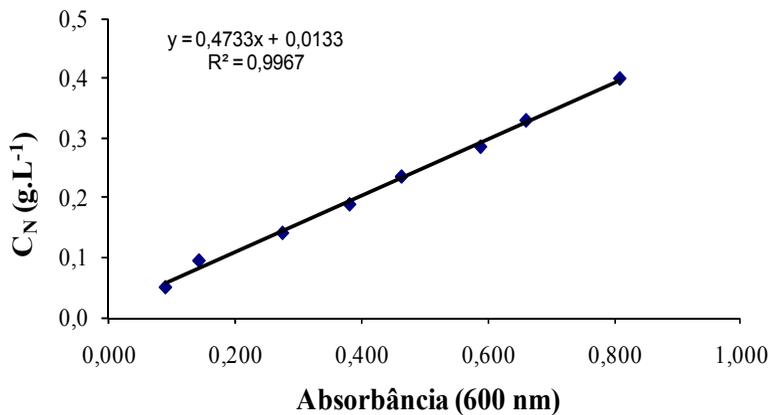


Figura A 2 Curva típica padrão para determinação da concentração de nitrogênio.

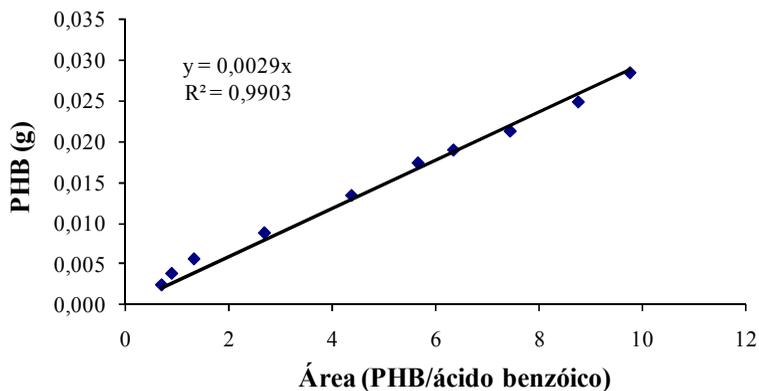


Figura A 3 Curva típica padrão para determinação da concentração de P(3HB).

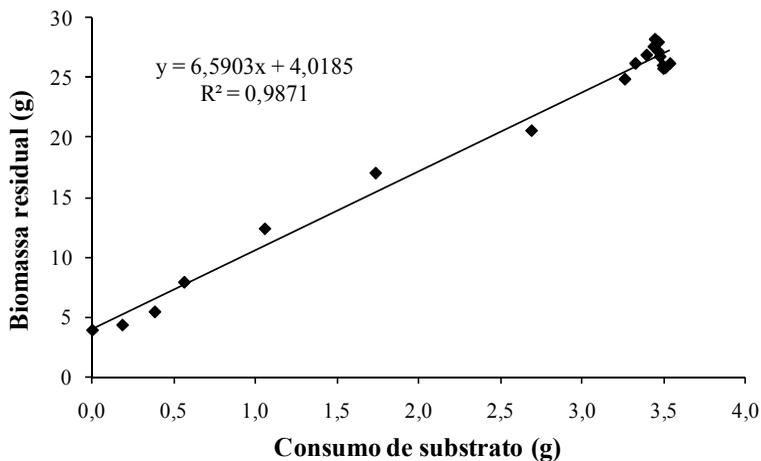


Figura A 4 Curva típica para determinar o fator de conversão de nitrogênio em célula ($Y_{X/N}$).

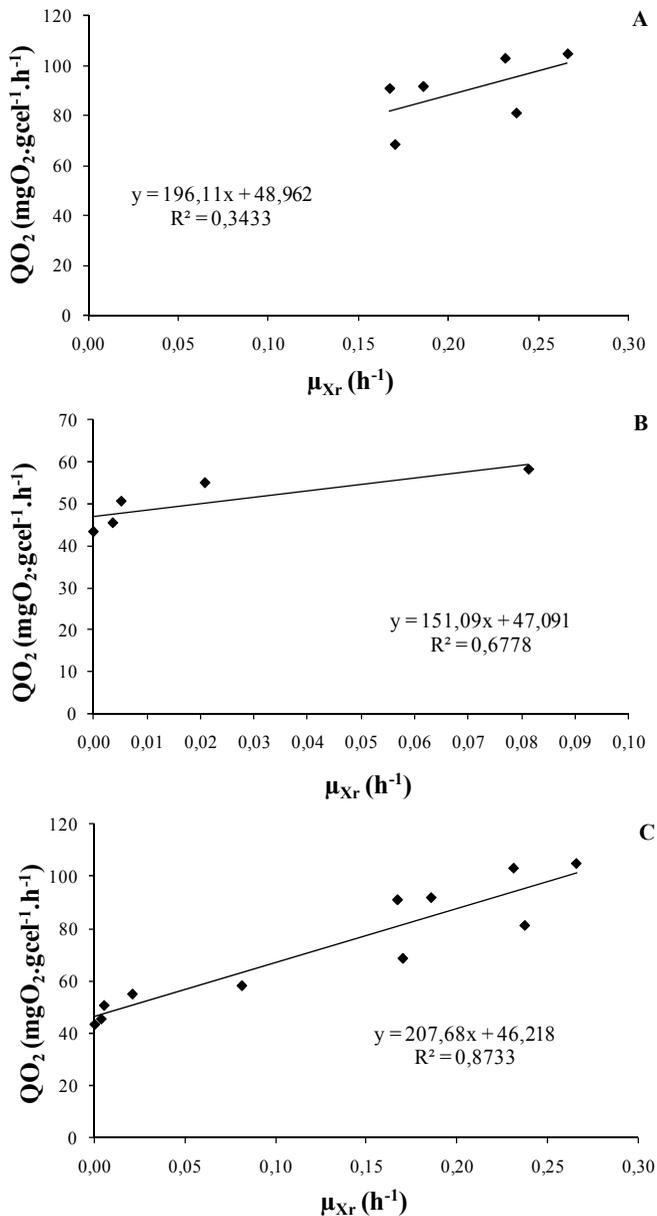


Figura A 5 Gráficos para determinação do $Y_{X/O}$ e do m_o para o cultivo controle, em duas fases separadas, crescimento (A) e produção (B), e o cultivo em uma só fase (C).

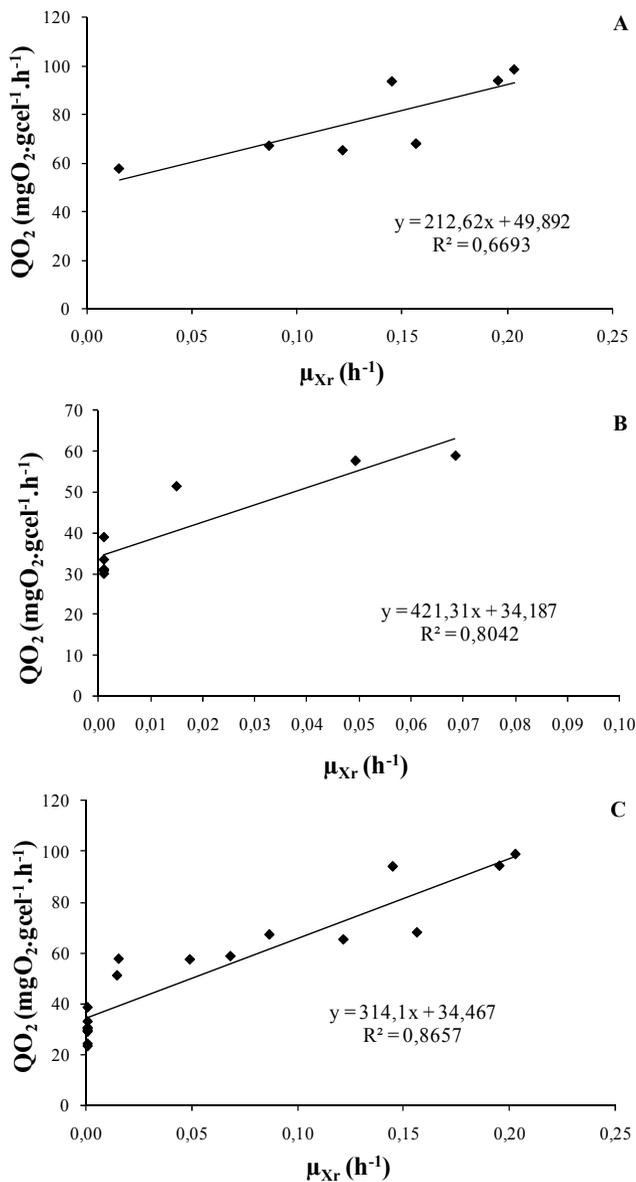


Figura A 6 Gráficos para determinação do $Y_{X/O}$ e do m_o para o cultivo suplementado com óleo de soja *in natura*, em duas fases separadas, crescimento (A) e produção (B), e o cultivo em uma só fase (C).

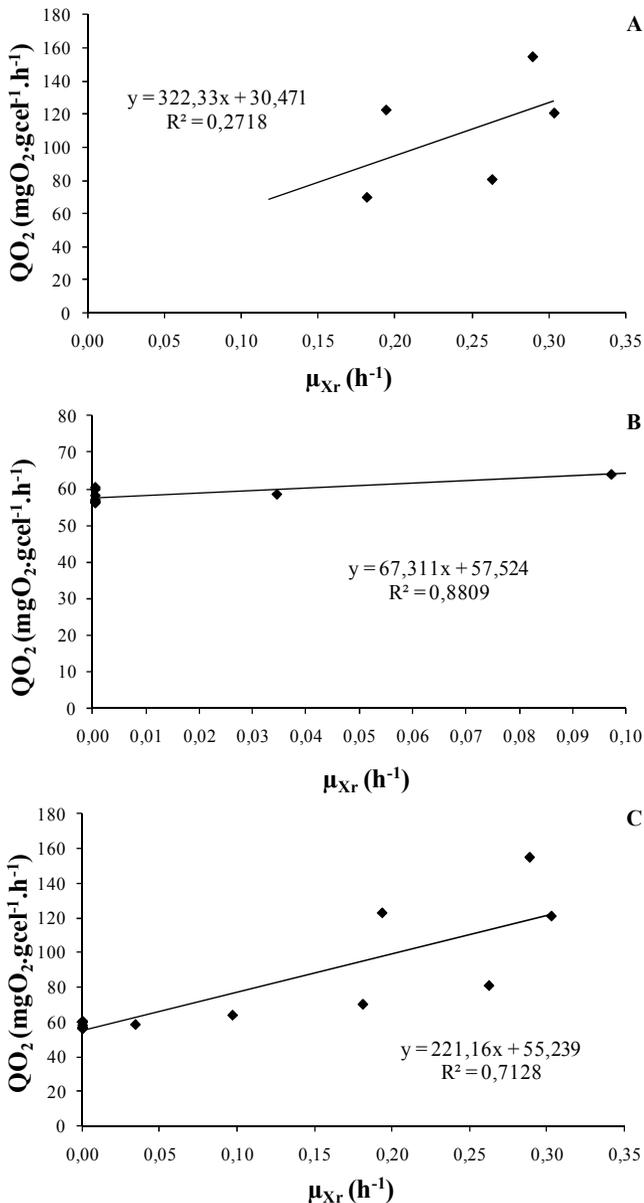


Figura A 7 Gráficos para determinação do $Y_{X/O}$ e do m_o para o cultivo suplementado com óleo de soja miniemulsionado, em duas fases separadas, crescimento (A) e produção (B), e o cultivo em uma só fase (C).