



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Seminário do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



V-OKTOBER FÓRUM – PPGEQ

17, 18 E 19 DE OUTUBRO DE 2006

## PRODUÇÃO DO BIOPOLÍMERO POLY(3-HYDROXYBUTYRATO).

Débora Jung Luvizetto<sup>1</sup>, Rossano Gambetta<sup>3</sup>, Argimiro Resende Secchi<sup>1</sup>, Nilo Sérgio Medeiros Cardozo<sup>1</sup>, Rosane Rech<sup>2</sup>, Marco Antonio Zacchia Ayub<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Grupo de Integração, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos (GIMSCOP)  
Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - BRASIL,  
E-MAIL: {debora, nilo, arge}@enq.ufrgs.br

<sup>2</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Rio Grande do Sul (UFRGS)  
Porto Alegre - RS - BRASIL, E-MAIL: {rrech, mazayub}@ufrgs.br

<sup>3</sup>Programa de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE/ UFRJ)  
Rio de Janeiro - RJ - BRASIL, E-MAIL: {rossano}@peq.coppe.ufrj.br

**Palavras Chaves:** biopolímeros, poly(3-hydroxybutyrato).

**Resumo:** O objetivo deste trabalho é a produção e caracterização do P(3HB) obtido pelo cultivo da bactéria *Alcaligenes latus*, em meio mineral utilizando sacarose como fonte de carbono e nitrogênio como substrato limitante em um bioreator de 5L, obtendo-se assim dados experimentais para fazer a modelagem fenomenológica da produção do P(3HB), crescimento celular, crescimento das cadeias do polímero e consumo de substrato, visando à obtenção de um modelo capaz de prever as características finais do polímero obtido. A partir de um planejamento experimental, realizado em shaker a 30°C e 160 rpm, determinou-se a melhor concentração inicial de sacarose e a melhor razão carbono/nitrogênio para maximizar o acúmulo de biomassa. A partir desta condição, pretende-se realizar novos experimentos em diferentes condições de operação do biorreator de 5L, dentro de um planejamento experimental, para a validação do modelo.

### 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os polímeros representam uma parcela muito importante do mercado de produtos para embalagens. No entanto, como a maioria dos polímeros comerciais caracteriza-se por apresentar taxas de decomposição quase desprezíveis nas condições ambiente, a disposição final de resíduos plásticos vem se tornando um problema crítico para a sociedade e causando danos ao meio ambiente. Neste contexto a utilização de biopolímeros torna-se uma alternativa interessante, tendo em vista que uma de suas principais características é a biodegradabilidade e que a reação de degradação gera como produtos somente H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub>. Além disso, os biopolímeros são obtidos a partir de fontes renováveis, podendo-se utilizar uma variedade de substratos como, por exemplo, sacarose, amido,

metano, óleo mineral e subprodutos da agroindústria como melaço, soro de leite, entre outros, não ficando sujeito às oscilações de preço do petróleo, nem à escassez deste.

Biopolímeros compreendem uma larga variedade de polímeros sintetizados por organismos vivos, e são classificados de acordo com sua estrutura em: ácidos nucleicos, polianidridos, polioxoesteres, politioesteres, polissacarídeos, poliisoprenoides polifenóis e poliamidas.<sup>1-2</sup> Dentre os polioxoesteres destacam-se os Polihidroxicanoatos (PHAs), que são sintetizados por microorganismos como reserva de carbono e energia, o que ocorre, em geral, quando há excesso de fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial como nitrogênio, fósforo, entre outros.<sup>2-3</sup>

Os PHAs são polímeros termoplásticos ou elastômeros, atóxicos, enantiômeros puros,



17, 18 E 19 DE OUTUBRO DE 2006

insolúveis em água, impermeáveis ao ar, biocompatíveis e biodegradáveis.<sup>2</sup> O poli(3-hidroxi-butirato) (P(3HB)) é o mais difundido e melhor caracterizado membro dos PHAs. O P(3HB) é altamente cristalino e possui algumas propriedades semelhantes ao polipropileno.<sup>4,5</sup> Na Figura 1 é possível verificar a composição de alguns tipos de PHAs.

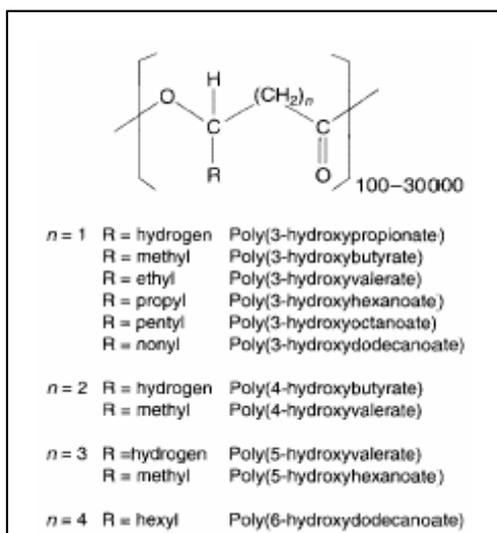


Figura 1: Formulas de alguns PHAs (Lee, 1996).

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

**2.1 Microrganismo e meio de cultura:** O microrganismo utilizado foi a bactéria *Alcaligenes latus*, DSMZ 1123, cedida liofilizada pela Fiocruz. Esta bactéria, estocada em glicerol, foi cultivada em caldo nutriente por um período de 18 horas para reativação (pré-inóculo). Após este período, foi adicionado 5% do pré-inóculo em um meio mineral contendo 30g/L de sacarose e 5g/L de sulfato de amônio (inóculo). Aproximadamente 6 horas depois, no início da fase de crescimento exponencial, o inóculo (5%) é transferido para diversos frascos erlenmeyers, com diferentes concentrações de sacarose e sulfato de amônio, conforme o planejamento de experimentos mostrado na Tabela 1. Este procedimento pode ser melhor explicitado na Figura 2.

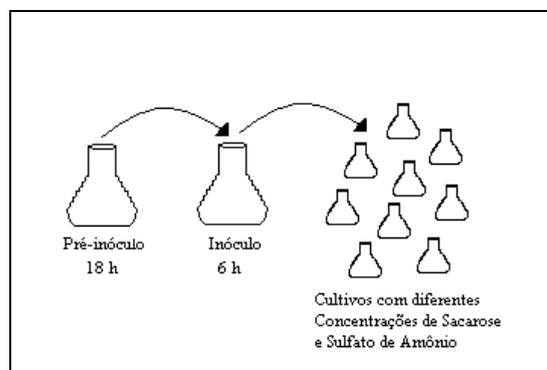


Figura 2: Desenho esquemático do procedimento do inóculo.

O meio mineral empregado foi o sugerido por Wang e Lee (1997) e consiste em: 1,5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 3,6 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,008 g/L de  $\text{CaCl}_2$ ; 0,1 g/L de Ácido Cítrico; 0,05 g/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . A este meio, é adicionado 1 mL de solução de micronutrientes a cada 1 L de meio mineral. A solução de micronutrientes contém: 0,3 g/L de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,2 g/L de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,03 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,03 g/L de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,03 g/L de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,03 g/L de  $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 0,01 g/L de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

Os cultivos foram realizados em *shaker*, à 30°C, pH 7 e 160 rpm, com erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral.

**2.2 Planejamento de experimentos:** A fim de se determinar a concentração inicial ótima de Sacarose (S), bem como a razão Carbono/Nitrogênio (C:N) inicial para maior crescimento foi realizado um planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central rotacional, com três repetições no ponto central, conforme Tabela 1. As variáveis codificadas são mostradas nas equações 1 e 2.

$$X_1 = \frac{S - 30}{14} \quad (1)$$

$$X_2 = \frac{C : N - 15}{7} \quad (2)$$

Na tabela, também é mostrada a concentração de Sulfato de Amônio (N) inicial de forma a manter a razão Carbono/Nitrogênio proposta.

O tempo de cultivo para cada conjunto de experimento foi de 4, 8, 12, e 24 horas.



## V-OKTOBER FÓRUM – PPGEQ

17,18 E 19 DE OUTUBRO DE 2006

**Tabela 1:** Planejamento realizado.

EXP	X <sub>1</sub> (S)	X <sub>2</sub> (C:N)	S (g/L)	C:N	N (g/L)
1	1	1	44	22	2,00
2	1	-1	44	8	5,50
3	-1	1	16	22	0,73
4	-1	-1	16	8	2,00
5	0	-1,414	30	5	6,00
6	0	1,414	30	25	1,20
7	-1,414	0	10	15	0,67
8	1,414	0	50	15	3,33
9a	0	0	30	15	2,00
9b	0	0	30	15	2,00
9c	0	0	30	15	2,00

Para a análise dos resultados do planejamento experimental, utilizou-se o Software STATISTICA. As Variáveis independentes foram: Razão carbono/nitrogênio e Concentração de sacarose. A variável dependente foi a concentração de biomassa.

**2.3 Métodos analíticos:** A determinação da quantidade total de células é feita por medidas gravimétricas (peso seco). Amostras em duplicata (10-20 mL) são coletadas dos cultivos, centrifugadas, lavadas e colocadas em estufa à 85°C até atingirem peso constante.

A quantidade de P(3HB) é obtida através do método de propanólise, segundo Riis e Mai (1988). Coloca-se aproximadamente 40 mg de células secas em um frasco, adiciona-se 2 mL de 1,2-Dicloroetano, 2 mL de n-propanol acidificado (4 partes de n-propanol para 1 parte de ácido clorídrico) e 2 µL de solução de padrão interno, composto por 2 g de ácido benzóico em 50 mL de n-propanol. O frasco, hermeticamente fechado, é deixado em banho à 100°C por duas horas com agitação intermitente. Posteriormente, ele é resfriado até atingir a temperatura ambiente e é adicionado 4 mL de água destilada. Da fase orgânica resultante é obtido o cromatograma. Foi necessário construir uma curva de calibração, correlacionando-se as áreas de massas conhecidas de P(3HB) padrão (Sigma-Aldrich) (80, 50, 40, 20, 10 e 5 mg), com a área do padrão interno. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso Shimadzu 14B, com detector de ionização de chama. A coluna utilizada foi uma Carbowax 60 m x 0,25 mm.

A análise de sacarose foi feita pelo método Fenol-Ácido Sulfúrico. Segundo Dubois *et al* (1956), açúcares, oligossacarídeos e polissacarídeos ao reagirem com ácido sulfúrico concentrado e fenol,

originam um composto alaranjado. Deve ser feito o seguinte procedimento: adiciona-se 500 µL de amostra previamente diluída, 500 µL de solução de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico. A reação é exotérmica, portanto é preciso esperar esfriar para realizar as leituras. São feitas leituras no espectrofotômetro a 490 nm. É necessário fazer uma curva de calibração. Este método é sensível a variação de sacarose de 0 à 0,1 g/L. A sacarose também será analisada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), Perkin Elmer série 200, coluna Rezex-RHM 300 mm x 7,8mm, utilizando, como fase móvel, água padrão HPLC, à temperatura de 80°C.

O nitrogênio, utilizado como substrato limitante, será analisado pelo método indofenol<sup>9</sup>, o qual se baseia na formação de uma coloração azul, resultante da reação do íon amônio com hipoclorito de sódio e compostos fenólicos na presença de nitrocianeto de sódio, que é o catalisador. Para a análise utiliza-se 1 mL de amostra previamente diluída, em um frasco de 1,5 mL. Adiciona-se 40 µL de solução de fenol (1,1 mL de fenol para 10 mL de etanol), 40 µL de solução de nitrocianeto de sódio (50 mg de nitrocianeto de sódio em 10 mL de água deionizada) e 100 µL de solução oxidante. A solução oxidante é composta por 1 mL de citrato alcalino (20 g de citrato de sódio e 1 g de hidróxido de sódio em 100 mL de água deionizada). Os frascos devem ser deixados por uma hora no escuro. A cor intensa azul é medida em espectrofotômetro à 640 nm. O range linear de detecção é de 0 até 0,6 mg/L segundo a curva de calibração.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 3 mostra a concentração de biomassa total obtida, isto é, concentração de biomassa residual mais P(3HB). Nota-se um acúmulo considerável em 12 horas, porém há um decréscimo em 24 horas. Este decréscimo pode ser devido à ocorrência de morte celular. Observadas em microscópio, com aumento de 1000 vezes, as células têm forma de bacilos, e foi possível observar que no tempo de 12 horas, as células estavam mais finas que inicialmente, e no tempo de 24 horas a situação era muito pior, indicando que é necessário melhorar as condições do meio de cultivo.



17, 18 E 19 DE OUTUBRO DE 2006

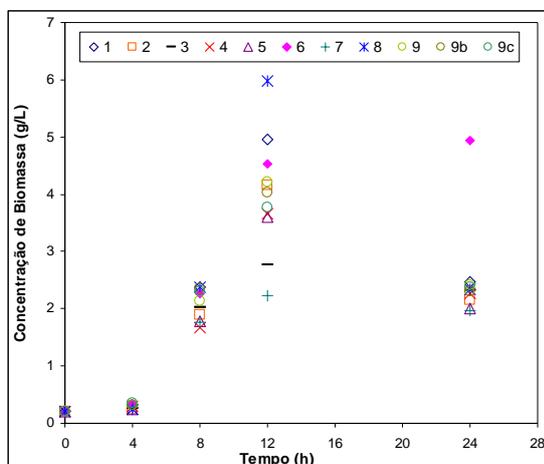


Figura 3: Concentração de biomassa versus tempo de cultivo para todo o conjunto de experimento.

Como pode ser observado na Figura 4, não houve consumo total de sacarose, logo, o motivo das células estarem em condições inadequadas não é falta de carbono.

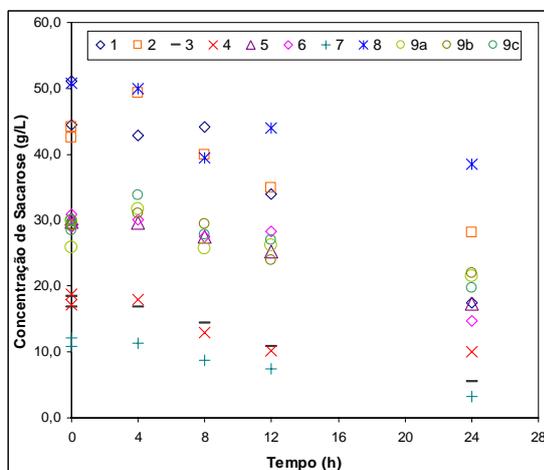


Figura 4: Concentração de Sacarose versus tempo de cultivo para todo o conjunto de experimento.

Uma das variáveis importantes para cultivos de microrganismos é o pH do meio. A variação de pH pode ser observada na Figura 5.

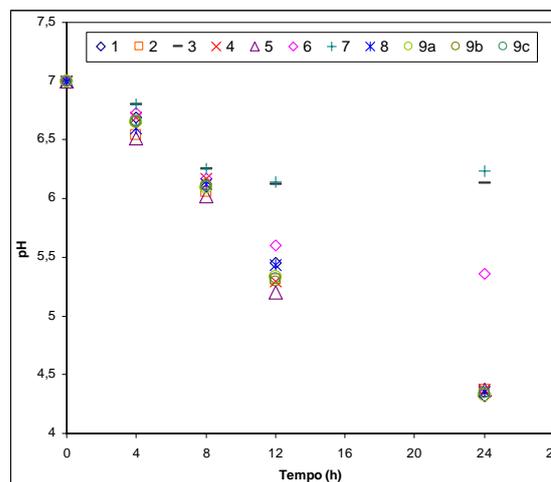


Figura 5: Variação do pH nos cultivos.

O pH ótimo de crescimento dessa bactéria, bem como para produção de P(3HB) é 7.

Como podemos notar, o pH, de modo geral, caiu de 7 para 4, ficando muito longe do ponto ótimo. Isso nos leva a considerar que a queda de biomassa possa ter ocorrido devido à variação do pH.

Outra variável que ocasionaria condição de *starvation* nas células é a limitação de nitrogênio, que foi proposta para possibilitar a produção de P(3HB), pois as células, em condições de limitação de nitrogênio e excesso de carbono, começam a armazenar este biopolímero como reserva de alimento. Segundo Anderson *et al* (1990), quanto maior o acúmulo de P(3HB), mais arredondadas ficam as células, para armazenar o biopolímero. Como as análises de nitrogênio não ficaram prontas, não é possível verificar a influência desse composto. Contudo, se o nitrogênio tivesse sido todo consumido, deveria ocorrer um acúmulo significativo de P(3HB), o que não foi verificado, conforme mostrado na Figura 6.

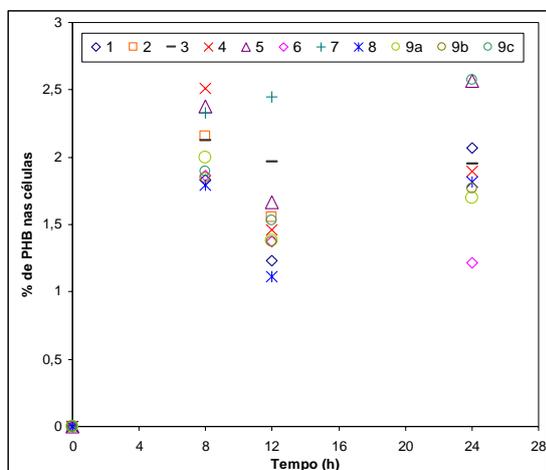


Figura 6: P(3HB) acumulado nas células.

Obteve-se em média 2% de acúmulo nas células, em quanto que o normal para essa bactéria, mesmo sem restrição de nitrogênio, é um acúmulo em torno de 25%, podendo chegar até 80% de polímero acumulado nas células nos casos de limitação de nitrogênio.<sup>3,6</sup> A queda de pH também pode ser a causa da baixa produção de P(3HB), e para verificar isto, será realizado um experimento em biorreator, o qual possui controle de pH, para elucidar esta questão.

Os valores de biomassa do planejamento experimental foram analisados com o auxílio do software STATISTICA, somente para os tempos de 4 e 8 horas, devido ao fato do pH estar muito longe do pH ótimo, após 12 horas. A concentração de P(3HB) obtida não foi analisada, pois apresentou uma área muito pequena no cromatograma, levando a obtenção de erros grandes.

Na Figura 7, é mostrada a superfície de resposta da concentração de biomassa ( $X$ ), no tempo de 4 horas, em função da concentração de sacarose e da razão carbono/nitrogênio. A Curva foi obtida no software STATISTICA. Com 95% de significância nos parâmetros, o modelo mostrou uma influência quadrática da concentração de sacarose ( $X_1$ ), linear da razão carbono/nitrogênio ( $X_2$ ) e também influência do termo cruzado, como pode ser visto na Equação 1.

$$X = 0,3275 - 0,03313 X_1^2 + 0,0202 \cdot X_2 + 0,0269 \cdot X_1 X_2 \quad (1)$$

O termo de influencia quadrática da variável  $X_2$  mostrou significância de 93%, os demais não são significativos.

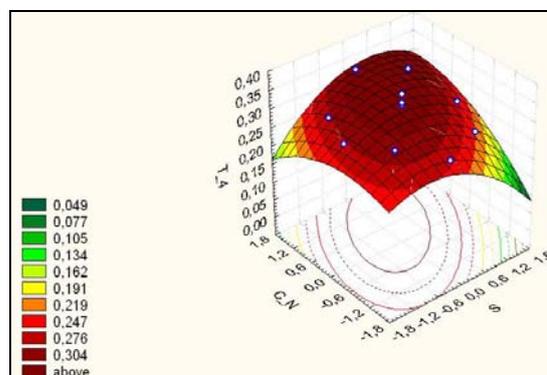


Figura 7: Superfície de resposta da concentração de biomassa no tempo de 4 horas.

A Figura 8 traz a superfície de resposta da concentração de biomassa para o tempo de 8 horas.

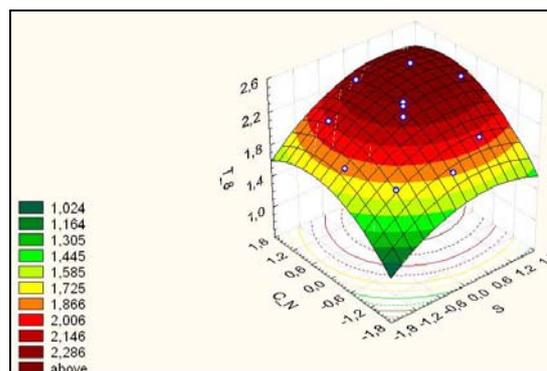


Figura 8: Superfície de resposta da concentração de biomassa no tempo de 8 horas.

Do mesmo modo, com 95% de significância nos parâmetros, o modelo mostrou influência linear e quadrática para a concentração de sacarose ( $X_1$ ) e também linear e quadrática para a variável ( $X_2$ ), como mostra a Equação 2. Os demais parâmetros não foram significativos.

$$X = 2,265 + 0,1832 X_1 - 0,1097 X_1^2 + 0,1919 X_2 - 0,1361 X_2^2 \quad (2)$$

Como pode ser observado na Figura 7 e na Figura 8, o ponto central do planejamento experimental ficou bastante próximo ao ponto de máximo. Dessa forma, decidiu-se fazer um experimento em biorreator, com controle de pH e com os valores iniciais de concentração de sacarose e razão de carbono/nitrogênio do ponto central.



#### 4 CONCLUSÕES

Foi possível obter um acúmulo considerável de biomassa, ocorrendo, contudo, uma significativa queda por volta de 24 horas. É necessário analisar as concentrações de nitrogênio para verificar em que tempo inicia a limitação desse nutriente. O pH parece ser o grande responsável por não se conseguir uma produção considerável de P(3HB), o que deverá ser esclarecido à medida que os cultivos forem realizados em biorreator.

Além disso, foi possível verificar a influência da concentração de sacarose e da razão carbono/nitrogênio sobre o crescimento celular. Pela análise da superfície de resposta, para os dois casos mostrados, tanto o aumento de sacarose, como o aumento da razão carbono/nitrogênio, aumentam o acúmulo de biomassa.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq.

#### REFERÊNCIAS

1. STEINBÜCHEL, Alexander. Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. **Macromolecular Bioscience**, v.1, n.1, p.1-23.2001
2. STEINBÜCHEL, Alexander; EVERSLOH, Tina L. Metabolic engineering ad pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, n.16, p.81-96.2003
3. LEE, Sang Yup. Plastic Bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate productions in bactéria. **Tibtech**, v.14, p.431-438. 1996
4. ANDERSON, Alistar J. and DAWES, Edwin A. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**, v.54, n.4, p.450-472. 1990
5. DHANASEKAR, R; VIRUTHAGIRI, T. and SABARATHINAM, P.L. Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis from a mutant strain *Azotobacter vinelandii* utilizing glucose in a batch reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 1-8. 2003.
6. WANG, Fulai and LEE, Sang Yup. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.63, n. 9, p. 3703-3706. 1997.
7. RIIS, V. and MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. **Journal of Chromatography**, v.445, p. 285-289. 1988.
8. DUBOIS, N.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. and SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
9. GREENBERG, ARNOLD E.; CLESCERI, LENORE S.; EATON, ANDREW D. Standard methods for examination of water and wastewater. 19th ed. Washington: American Public Health Association, 1995.