

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO BIOPOLÍMERO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)

Débora Jung Luvizetto Faccin¹, Ivana Martins¹, Nilo Sérgio Medeiros Cardozo¹, Rosane Rech², Marco Antônio Záchia Ayub², Tito Lívio Moitinho Alves³, Rossano Gambetta⁴, Argimiro Resende Secchi¹

¹Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - Brasil, E-mail: {debora, iva, nilo, arge}@enq.ufrgs.br

²Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS - Brasil, E-mail: {rrech, mazayub}@ufrgs.br

³Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE/UFRJ) - Programa de Engenharia Química, Rio de Janeiro - RJ - Brasil, E-mail: tito@peq.coppe.ufrj.br.

⁴Suzano Petroquímica S/A, Mauá - SP, E-mail: rossano.gambetta@suzano.com.br

RESUMO – Este trabalho visa à otimização da produção do Poli(3-hidroxitirato) – P(3HB) – obtido pelo cultivo submerso da bactéria *Bacillus megaterium* em meio mineral, utilizando sacarose como fonte de carbono e o nitrogênio como substrato limitante. Um biorreator em escala laboratorial foi utilizado para se obter dados experimentais para a modelagem matemática da produção do P(3HB), crescimento microbiano e consumo de substrato. A partir de um planejamento experimental realizado em estufa incubadora rotatória 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 e a produção do biopolímero. Nestes experimentos, observou-se o acúmulo de P(3HB) nas bactérias sem a necessidade de limitação de nitrogênio e uma forte correlação entre o acúmulo de P(3HB) e o pH, evidenciando a importância de uma estratégia de controle programado nesta variável.

PALAVRAS-CHAVE: Poli(3-hidroxitirato), biopolímeros, otimização, *Bacillus megaterium*.

ABSTRACT – The aim of this research was the optimization of poly(3-hydroxybutyrate) – P(3HB) – production obtained in submerged cultures of *Bacillus megaterium* in a mineral medium, using sucrose as carbon source and the nitrogen as the limiting substrate. A bench-scale bioreactor was used in order to obtain experimental data for phenomenological modeling of the biopolymer production, microbial growth, and substrate consumption. From an experimental design, which was carried out in shaker at 30°C and 160 rpm, it was evaluated the best initial sucrose concentration and carbon-to-nitrogen ratio in order to maximize the biomass accumulation and biopolymer production. It was observed the P(3HB) accumulation in bacteria without the need of nitrogen limitation and a strong correlation between accumulated P(3HB) and pH, showing the importance of a control strategy using this variable.

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 (Reddy et al., 2003). Neste contexto, a utilização de biopolímeros torna-se uma alternativa promissora, tendo em vista que uma de suas principais características é a biodegradabilidade gerando como produtos somente H₂O e CO₂. Além disso, os biopolímeros são obtidos a partir de fontes renováveis, podendo-se utilizar uma variedade de substratos como, por exemplo, sacarose, amido, glicerol, 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 (Madison & Huisman, 1999).

Dentre os polioxoésteres destacam-se os polihidroxicanoatos (PHAs), sintetizados por microrganismos como reserva de carbono e energia, quando há, em geral, excesso de fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial como nitrogênio, fósforo, entre outros (Lee, 1996). Os PHAs são polímeros termoplásticos ou elastômeros, atóxicos, insolúveis em água, impermeáveis ao ar, biocompatíveis e biodegradáveis (Steinbüchel & Eversloh, 2003). O poli(3-hidroxi-butirato) (P(3HB)) é o mais difundido e melhor caracterizado membro dos PHAs, altamente cristalino e com algumas propriedades semelhantes ao polipropileno.

Este trabalho visa à otimização da produção de P(3HB) em cultivo submerso da bactéria *Bacillus megaterium* em meio mineral, utilizando sacarose como fonte de carbono e nitrogênio como substrato limitante.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismo e meio de cultura

O microrganismo utilizado foi a bactéria *Bacillus megaterium*, DSM 32^T, cedida pelo Laboratório de Bioprocessos da COPPE/UFRJ.

O meio mineral empregado foi o sugerido por Wang e Lee (1997).

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 e acúmulo de P(3HB), foram realizados experimentos em estufa incubadora rotatória, segundo um planejamento fatorial 2² composto, com três repetições no ponto central, conforme a Tabela 1. Também é mostrada a concentração inicial de sulfato de amônio (FN).

Os cultivos foram realizados a 30 °C, pH inicial 7 e 160 rpm, em frascos cônicos de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral. O tempo de cultivo para cada conjunto de experimento foi de 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas.

Tabela 1 – Planejamento de experimentos de cultivos realizado.

EXP	X1 (S)	X2 (C:N)	S (g/L-1)	C:N	FN (g/L-1)
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	$-\sqrt{2}$	30	5	6,00
6	0	$\sqrt{2}$	30	25	1,20
7	$-\sqrt{2}$	0	10	15	0,67
8	$\sqrt{2}$	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

2.3 Cultivos em biorreator

Para realização dos cultivos em escala maior, utilizou-se um biorreator experimental. Este consiste em um vaso de vidro com capacidade de quatro litros, acoplado a um sistema de controle digital integrado, sendo possível o controle de algumas variáveis de processo, tais como temperatura, agitação, pH e pO_2 .

Nos cultivos em biorreator, a concentração de sacarose e sulfato de amônio foram, respectivamente, 16 g L^{-1} e 2 g L^{-1} , escolhidas conforme o resultado dos experimentos do planejamento. O pH foi mantido em 7, utilizando-se NaOH e H_3PO_4 para a correção do mesmo (Omar et al., 2001; Wu et al., 2001). A temperatura foi mantida constante em $30 \text{ }^\circ\text{C}$, a aeração utilizada foi de 4 L/min e o percentual de oxigênio dissolvido (pO_2) foi controlado pela variação na velocidade de agitação a fim de manter o valor de $pO_2 > 40\%$. O cultivo em biorreator teve duração de 24 horas, sendo coletadas amostras a cada hora.

2.4 Métodos analíticos

A determinação da biomassa total é feita por medidas gravimétricas (peso seco), que corresponde à biomassa residual mais polímero, uma vez que o acúmulo é intracelular. Amostras (10-20 mL) em duplicata são coletadas dos cultivos, centrifugadas, lavadas e colocadas em estufa a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ até atingirem peso constante.

A quantidade de P(3HB) é obtida através do método de propanólise, segundo Riis e Mai (1988).

A sacarose do meio de cultivo foi analisada pelo método fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956) e também por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), Perkin Elmer série 200, coluna Rezex-RHM 300 mm x 7,8 mm, utilizando, como fase

móvel, água padrão HPLC, à temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$.

O nitrogênio do meio de cultivo, utilizado como substrato limitante, foi analisado pelo método indofenol (Weatherburn, 1967).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Cultivos em estufa incubadora rotatória

A Figura 1 mostra a concentração de biomassa total obtida, apresentada em escala logarítmica. Pode-se observar que para os experimentos 3 e 7, que continham valores baixos de sacarose e nitrogênio inicial, obteve-se um menor acúmulo de biomassa total, enquanto os outros alcançaram valores próximos. Contudo o ponto 4, que também contém pouca sacarose inicial, apresentou o maior valor de biomassa total, evidenciando que a limitação de nitrogênio parece ser a causa do decréscimo na biomassa.

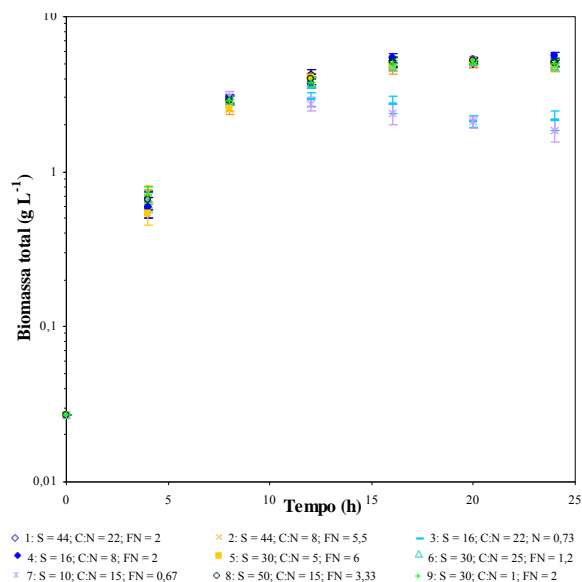


Figura 1 – Concentração de biomassa total *versus* tempo de cultivo.

A concentração de P(3HB) obtida durante o cultivo para todo o conjunto de experimentos é mostrada na Figura 2, também em escala logarítmica. Observa-se que o acúmulo de polímero ocorre juntamente com o crescimento

celular e inicia durante a fase de crescimento exponencial, indicando que a produção nessa bactéria pode ser associada ao crescimento. Resultado similar foi encontrado por Omar et al. (2001) utilizando outros substratos. Assim como na Figura 1 os experimentos 3 e 7 mostraram uma produção de P(3HB) baixa quando comparada com os outros experimentos. Observam-se também nos pontos 3 e 7 que o consumo de polímero inicia em torno de 12 horas enquanto que para os demais pontos parece haver uma tendência de consumo a partir de 20 horas, com exceção do experimento 4, o qual não apresenta queda.

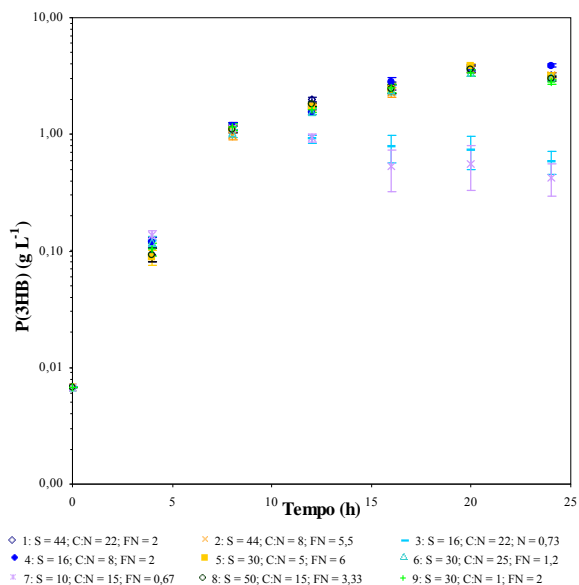


Figura 2 – Concentração de P(3HB) versus tempo de cultivo.

O percentual de acúmulo do biopolímero obtido é mostrado na Figura 3. Observa-se que em alguns experimentos se obteve um grande acúmulo, chegando próximo a 75 %, como é o caso dos experimentos com 20 horas de cultivo.

A Figura 4 mostra o consumo de sacarose ao longo dos cultivos. Observa-se que para a maioria dos experimentos não houve o consumo total da sacarose, sendo alcançados valores muito baixos para os experimentos 3, 4 e 7. Apesar de haver sacarose disponível no

meio de cultura, a partir de 16 horas não há mais crescimento celular.

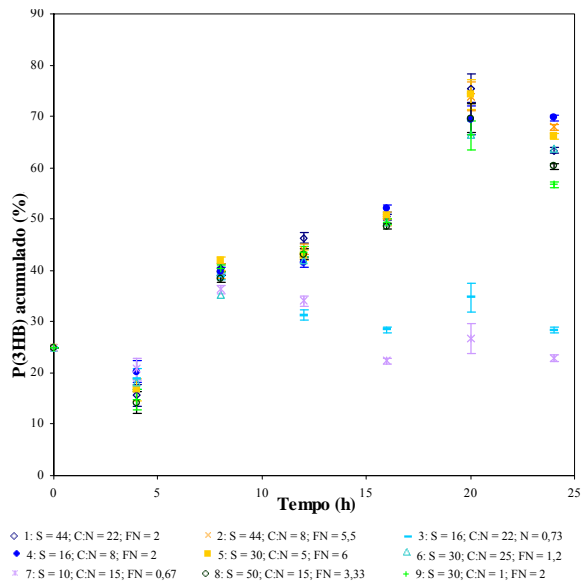


Figura 3 – Porcentagem de P(3HB) acumulado nas células versus tempo de cultivo.

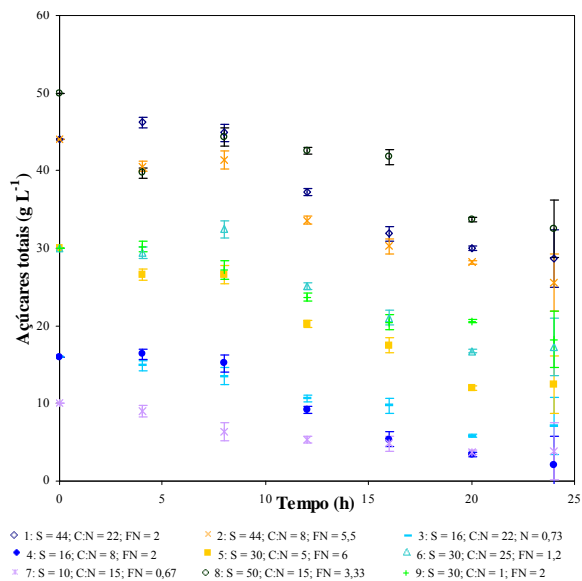


Figura 4 – Concentração de sacarose versus tempo de cultivo.

Na Figura 5 é mostrado o consumo de nitrogênio. Assim como aconteceu com a sacarose, não há consumo total de nitrogênio, com exceção dos pontos 3 e 7, onde também se obteve um acúmulo menor de biopolímero.

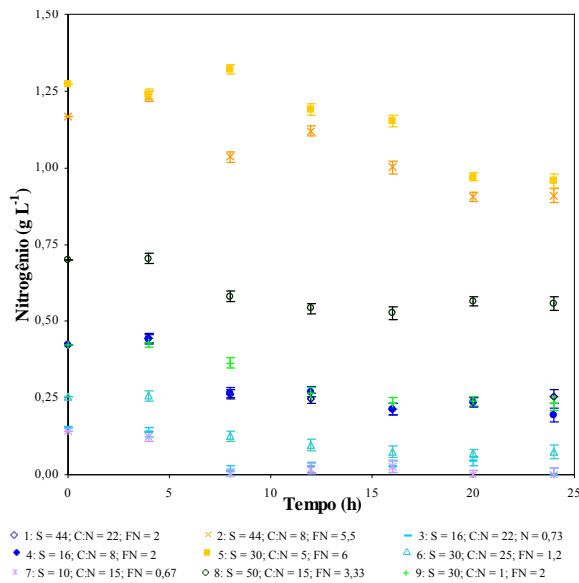


Figura 5 – Concentração de nitrogênio versus tempo de cultivo.

A variação de pH ao longo do cultivo é mostrada na Figura 6. Pode-se observar que ocorre uma acentuada queda no valor do pH chegando a valores próximos a 4, com exceção dos experimentos 3 e 7 nos quais se obteve uma menor produção de P(3HB).

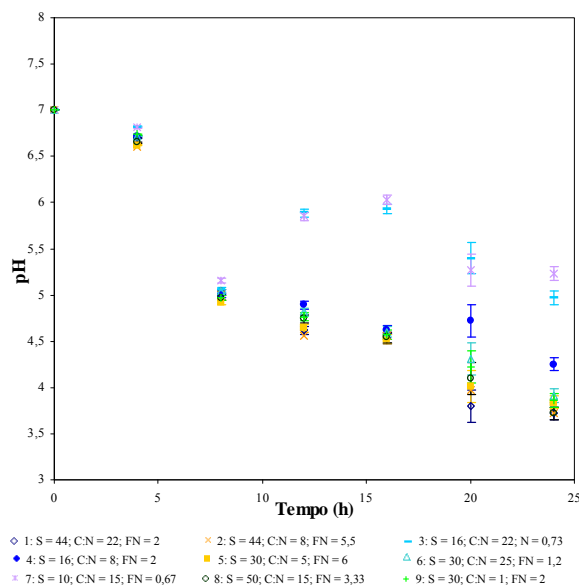


Figura 6 – Variação do pH durante o cultivo.

A Tabela 2 mostra as correlações entre os valores obtidos experimentalmente de acúmulo percentual de P(3HB), concentração

do polímero e concentração da biomassa residual e o pH do meio ao longo do cultivo. Pode-se observar que o pH está fortemente correlacionado ao P(3HB) na maioria dos pontos, pois apresentou correlações próximas a 1. Mostrando que o pH é uma variável importante para o acúmulo de polímero. Os experimentos referentes aos experimentos 3 e 7, não apresentaram uma boa correlação, porém também não foi possível um grande acúmulo nesses pontos. A biomassa residual não apresenta uma correlação significativa com o pH.

Tabela 4.1: Correlações entre valores de pH e percentual de polímero obtido, concentração de P(3HB) e Biomassa residual.

EXP	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH-P(3HB) (%)	-0,96	-0,93	-0,79	-0,86	-0,94	-0,93	-0,49	-0,95	-0,95
pH-P(3HB) (g.L ⁻¹)	-0,94	-0,94	-0,67	-0,84	-0,91	-0,90	-0,59	-0,92	-0,91
pH-X _R (g.L ⁻¹)	-0,62	0,42	-0,66	-0,80	-0,62	-0,75	-0,68	-0,72	-0,84

Analisando-se os gráficos dos experimentos realizados em estufa incubadora rotatória, nota-se que mesmo sem limitação de nitrogênio, a bactéria *B. megaterium* foi capaz de acumular grandes quantidades de biopolímero, evidenciando que a produção é associada ao crescimento e que não necessita de limitação de nutriente para iniciar a produção de P(3HB). Observa-se também que houve consumo do biopolímero, como por exemplo, nos experimentos 3 e 7, onde se alcançou menor concentração de açúcar e, portanto, na falta de fonte de carbono e nitrogênio começam a consumir as reservas. Para os demais pontos começou a haver um pequeno consumo depois de 20 horas, mas não se verificou falta de fonte de carbono. Mccool et al. (1996), trabalhando com outros substratos, também verificaram para esta bactéria um acúmulo de biopolímero durante a fase de crescimento celular e fase estacionária e consumo do P(3HB) no final da fase estacionária.

Os resultados do planejamento de experimentos realizado foram analisados utilizando as superfícies de respostas para as variáveis biomassa, acúmulo de polímero e sacarose obtidas com software STATISTICA 7.0. Levando-se em consideração que na maioria

dos casos houve sobra de sacarose, o que acarretaria em desperdício, foi montada uma função objetivo reunindo as três equações das superfícies obtidas ponderadas a fim de não haver grande desperdício de sacarose. A Função objetivo é dada pela Equação 1 e pode ser melhor visualizada na Figura 7, obtida utilizando o software MATLAB® com um peso $w = 0,2$.

$$F_{Obj}(S, C : N) = (1 - w) \cdot S_R(S, C : N) - w \cdot \left(\frac{P(S, C : N) \cdot X_T(S, C : N)}{100} \right) \quad (1)$$

Nesta função objetivo deseja-se minimizar a sobra de sacarose (S_R) e maximizar a produção de biopolímero (P), dada pelo produto da concentração da biomassa total pelo percentual de biopolímero produzido. O peso w estabelece um compromisso entre estes dois objetivos. As variáveis de decisão deste problema de otimização são: a concentração inicial de sacarose e a relação carbono/nitrogênio.

O menor valor da função objetivo, onde se consegue a maior produção de polímero e menor valor de sacarose residual, é obtido próximo ao ponto referente ao experimento 4 ($S = 16 \text{ gL}^{-1}$ e $C:N = 8$) que foi escolhido para a realização de experimentos em biorreator.

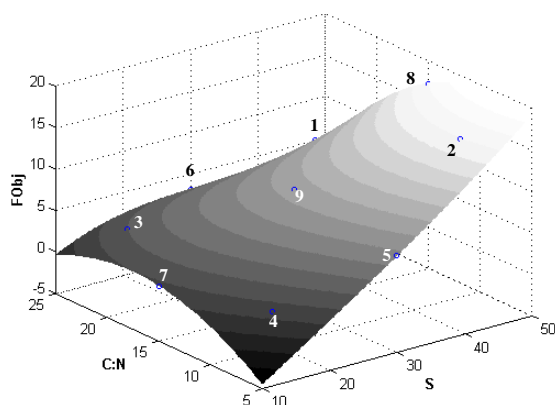


Figura 6 – Valores da Função Objetivo.

3.2 Cultivos em biorreator

Foram realizados experimentos no biorreator em duplicata. Na Figura 7, em escala

logarítmica, pode-se observar a biomassa total (X_t), biomassa residual (X_r) e P(3HB) obtidas nos cultivos. Os valores de biomassa total ficaram próximos aos obtidos em estufa incubadora rotatória. Enquanto que os valores de biopolímeros obtidos são muito inferiores. Essa diminuição de produção em biorreator em relação ao obtido em estufa incubadora rotatória também ocorreu em Omar et al. (2001), também com o pH mantido igual a 7 ao longo do cultivo.

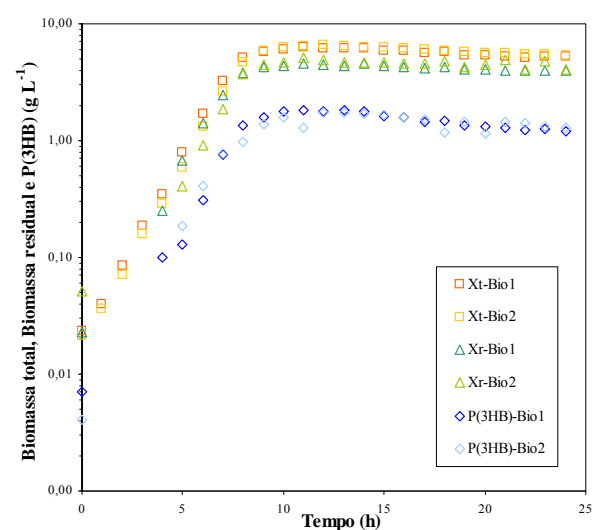


Figura 7 – Concentrações de Biomassa total, Biomassa residual e P(3HB) obtidas durante o cultivo em biorreator.

O acúmulo de P(3HB) nas células é mostrado na Figura 8, onde se pode observar que há um decréscimo na percentagem de polímero durante a fase inicial de crescimento e próximo a 5 horas começa a aumentar o acúmulo. No final da fase estacionária volta a ocorrer um decréscimo na percentagem de biopolímero. Mccool et al. (1996) também verificaram esse decréscimo de P(3HB) na *B. megaterium*.

O decréscimo inicial é atribuído à taxa de crescimento celular inicial, que é maior que a taxa de formação do polímero. O decréscimo final e o baixo acúmulo de P(3HB) podem ser evidências da formação de esporos devido à falta de algum nutriente. O mesmo comportamento foi observado em OMAR et al. (2001).

Os experimentos foram realizados com pH controlado no valor 7. Segundo Valappil et al. (2007), experimentos com *B. cereus* mostraram que o pH próximo a 5 inibe o consumo de P(3HB) bem como a formação de esporos.

Na Figura 8 também é mostrado o consumo de nitrogênio, onde se verifica limitação de nitrogênio a partir de 9 horas de cultivo, o que pode ter ocasionado formação de esporos. Wu et al. (2001) sugerem que a limitação de nutrientes parece ter efeito inverso na bactéria *B. megaterium*, pois não proporciona aumento no acúmulo como ocorre para outras bactérias produtoras de P(3HB).

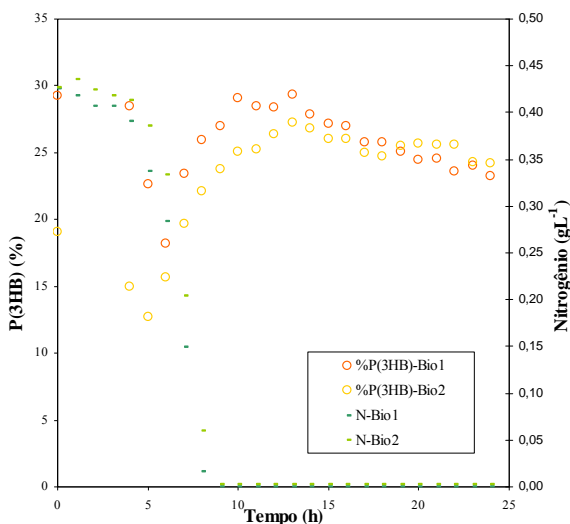


Figura 8 – Porcentagem de P(3HB) acumulado nas células durante o cultivo em biorreator.

A Figura 9 mostra o consumo de sacarose medida em HPLC pela soma da glicose e frutose. Assim como o ocorrido para o experimento 4 em estufa incubadora rotatória, teve-se um grande consumo de sacarose. Pode-se observar também que o consumo de glicose foi mais rápido que o de frutose, indicando que existe a possibilidade da bactéria hidrolisar a sacarose externamente uma vez que é a única fonte de açúcar.

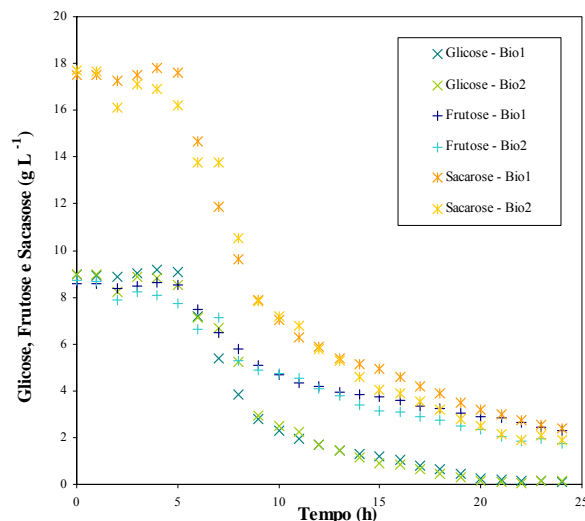


Figura 9 – Consumo de açúcar durante o cultivo em biorreator.

Com base nos dados aqui apresentados, um modelo matemático também foi proposto e implementado no software EMSO (Soares e Secchi, 2003). Apesar de que a apresentação do modelo não é o foco deste trabalho, vale mencionar que as predições com ele obtidas mostraram boa concordância com os dados experimentais (Luvizetto, 2007).

5. CONCLUSÕES

Nos experimentos realizados em estufa incubadora rotatória, apesar de não haver consumo total do açúcar e do nitrogênio, a biomassa parou de crescer e também não houve formação de polímero ou, pelo menos, ocorreu diminuição na taxa de produção, o que pode evidenciar algum tipo de inibição ou ainda limitação de outros fatores de crescimento, pois de outra forma deveria ainda ocorrer crescimento e produção. Um dos fatores a ser considerado é o pH, que atingiu valores muito baixos.

Analisando-se os resultados obtidos em biorreator, observa-se que a produção de P(3HB) foi muito inferior àquela obtida em estufa incubadora rotatória. Para melhorar a produção será necessário investigar a influência do pH, sendo talvez necessária a manutenção inicial do pH no valor 7 para crescimento celular e

posterior queda até um valor que não prejudique a célula, mas que ocorra a inibição da formação de esporos. Além disso, pretende-se realizar cultivos sem limitação de nitrogênio.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo suporte financeiro.

7. REFERÊNCIA

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.

LEE, S.Y. Plastic Bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate productions in bacteria. *Tibtech*, v.14, p.431-438, 1996.

LUVIZETTO, D. J. Cultivo da Bactéria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero poli(3-hidroxibutirato) e modelagem matemática do bioprocesso. Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, UFRGS, (2007).

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Rev.*, v.63, n.1, p.21-53, 1999.

MCCOOL, G. J.; FERNANDEZ, T.; LI, N.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiology Letters*, n. 138, p. 41-48, 1996.

OMAR, S.; RAYES, A.; EQAAB, A.; VOB, I.; STEINBÜCHEL, A. Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. *Biotechnology Letters*, n. 23, p. 1119-1123, 2001.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, v. 87, p. 137-146 (2003).

RIIS, V. and MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography*, v.445, p. 285-289, 1988.

SOARES, R.P.; SECCHI, A.R. EMSO: A New Environment for Modeling, Simulation and Optimization, Proceedings 13th European Symposium on Computer Aided Process Engineering, p. 947-952, Lappeenranta (2003)

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

VALAPPIL, S. P.; BOCCACCINI, A. R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*. N. 91, p. 1-17, 2007.

WANG, F. and LEE, S. Y. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, n. 9, p. 3703-3706, 1997.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-Hypoclorite Reaction for Determination of Ammonia. *Analytical Chemistry*, v. 39, n.8, p.971-974, 1967.

WU, Q.; HUANG, H.; HU, G.; CHEN, J. HO, K.P.; CHEN, G.Q. Production of Poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek*, n. 80, p. 111-118, 2001.