

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS E TECNOLOGIAS

PRODUÇÃO BACTERIANA DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) A PARTIR DE
LACTOSE E SORO DE LEITE

Karina Hammel Berwig

Caxias do Sul, 2016

Karina Hammel Berwig

**PRODUÇÃO BACTERIANA DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) A PARTIR DE
LACTOSE E SORO DE LEITE**

Dissertação apresentada no Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias (PGEPROTEC) da Universidade de Caxias do Sul (UCS), visando a obtenção de grau de mestre em Engenharia de Processos, orientado por Dr^a. Aline Dettmer e Dr^a. Camila Baldasso.

Caxias do Sul, 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

B553p Berwig, Karina Hammel, 1990-
Produção bacteriana de poli(3-hidroxi-butirato) a partir de lactose e
soro de leite / Karina Hammel Berwig. – 2016.
168 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.
Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologia, 2016.
Orientadoras: Profa. Dra. Aline Dettmer, Profa. Dra. Camila Baldasso.

1. Biopolímeros. 2. Bactérias. 3. Lactose. I. Título.

CDU 2. ed.: 577.11

Índice para o catálogo sistemático:

1. Biopolímeros	577.11
2. Bactérias	561.23
3. Lactose	637.345

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Roberta da Silva Freitas – CRB 10/1730



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

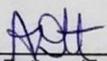
“PRODUÇÃO BACTERIANA DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) A PARTIR DE LACTOSE E SORO DE LEITE.”

Karina Hammel Berwig

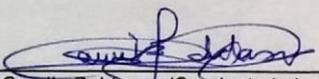
Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos e Produtos Industriais.

Caxias do Sul, 08 de Abril de 2016.

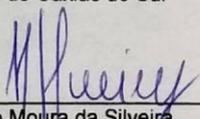
Banca Examinadora:



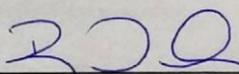
Dra. Aline Dettmer (Orientadora)
Universidade de Caxias do Sul



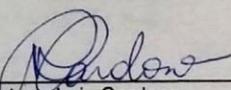
Dra. Camila Baldasso (Coorientador)
Universidade de Caxias do Sul



Dra. Maurício Moura da Silveira
Universidade de Caxias do Sul



Dra. Rosmary Nichele Brandalise
Universidade de Caxias do Sul



Dr. Vicelma Luiz Cardoso
Universidade Federal de Uberlândia

CIDADE UNIVERSITÁRIA

Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 – B. Petrópolis – CEP 95070-560 – Caxias do Sul – RS – Brasil

Ou: Caixa Postal 1352 – CEP 95020-972 – Caxias do Sul – RS – Brasil

Telefone / Telefax (54) 3218 2100 – www.ucs.br

Entidade Mantenedora: Fundação Universidade de Caxias do Sul – CNPJ 88 648 761/0001-03 – CGCTE 029/0089530

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Neusa Maria Hammel Berwig, por ser a primeira pessoa da minha vida a acreditar em mim e confiar em meu potencial sempre, antes que eu mesma fosse capaz de fazê-lo.

Ao meu pai, Wanderlei João Berwig, por permitir e tornar possíveis absolutamente todas as realizações da minha vida até hoje.

Ao meu irmão, Pablo Hammel Berwig, por muitas vezes se mostrar mais otimista em relação aos meus feitos do que eu mesma.

À minha orientadora, Aline Dettmer, por, desde a minha iniciação científica, me acompanhar e incentivar. Você é a grande responsável pelo meu amadurecimento como profissional.

À minha coorientadora, Camila Baldasso, pelas valiosas sugestões e principalmente seu constante bom humor.

Ao Prof. Maurício Moura da Silveira e à técnica do LBio Sabrina Carra, por me auxiliarem sobremaneira na execução de ensaios no biorreator de bancada. Pessoas como vocês renovam minhas esperanças no meio acadêmico.

Aos professores da banca, que dedicam seu tempo para contribuir com a evolução do trabalho realizado.

À minha bolsista de iniciação científica Júlia Cesa Pagnusati, por ter me ajudado imensamente em seu pouco tempo no laboratório.

À técnica dos Laboratórios de Engenharia Química, Julcimára Santos Rossi, por todo o empréstimo de equipamentos, vidrarias, reagentes, e longas conversas.

Às minhas amigas que durante estes dois anos sempre estiveram junto comigo, Bianca Nega (APBM) Santinon Scopel, Marielen Longhi, Bibiana Vebber. O crescimento que tivemos juntas vai ficar sempre marcado em mim.

Aos amigos Glaiton Tuzzin (Glaitinho) e Luis Bonetto, pelas inúmeras conversas de corredor que sempre renovaram meu ânimo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias (PGEPROTEC) e seu coordenador Ademir José Zattera, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela estrutura cedida, bolsa de estudos e também apoio financeiro à pesquisa realizada.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 SORO DE LEITE.....	21
3.1.2 Lactose	23
3.2 BIOPOLÍMEROS	24
3.2.1 Polihidroxialcanoatos	24
3.2.2 Produção de polihidroxialcanoatos	26
3.2.3 Microrganismos produtores de polihidroxialcanoatos	27
3.2.3.1 Bacillus megaterium.....	28
3.2.3.2 Alcaligenes latus	30
3.2.4 Extração e purificação dos polihidroxialcanoatos	31
3.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O REFERENCIAL TEÓRICO.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 MATERIAL.....	35
4.2 MÉTODOS.....	36
4.2.1 Preparação dos inóculos	39
4.2.2 Determinação das condições iniciais para a produção de PHB	39
4.2.3 Planejamentos experimentais	40
4.2.3.1 Etapa 1 - determinação da concentração inicial de substrato e microrganismo .	40
4.2.3.2 Etapa 2 - neutralização do pH do soro de leite após a precipitação das proteínas.....	42
4.2.3.3 Etapa 3 - definição do meio com melhores resultados.....	43
4.2.4 Avaliação da produção de PHB em biorreator de bancada	45
4.2.5 Extração do polímero produzido	48
4.2.6 Métodos Analíticos	48
4.2.6.1 Quantificação de sólidos dissolvidos	48
4.2.6.2 Quantificação de açúcares	48
4.2.6.3 Quantificação de proteínas.....	49
4.2.6.4 Quantificação da concentração de células secas	50

4.2.6.5 <i>Quantificação da concentração de PHB produzido</i>	50
4.2.6.6 <i>Análise de propriedades térmicas</i>	51
4.2.6.7 <i>Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO	53
5.2 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES INICIAIS PARA A PRODUÇÃO DE PHB	55
5.3 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS	59
5.3.1 Etapa 1 - determinação da concentração inicial de substrato e microrganismo	59
5.3.2 Etapa 2 - neutralização do pH do soro de leite, após a precipitação das proteínas	63
5.3.3 Etapa 3 - definição do meio com melhor desempenho	66
5.4 AVALIAÇÃO CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE PHB	71
5.5 CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO OBTIDO	74
6 CONCLUSÕES	82
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	84
REFERÊNCIAS	85
APÊNDICE A - Marca dos reagentes utilizados no trabalho	91
APÊNDICE B - Gráficos das condições monitoradas durante os ensaios em biorreator de bancada	93
APÊNDICE C - Ajustes realizados nas curvas de concentração de lactose, células secas e PHB obtidos no ensaio em biorreator de bancada	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição aproximada do soro de leite	22
Tabela 2 - Proteínas em maior concentração no soro de leite, seus respectivos pontos isoelétricos e temperaturas de desnaturação térmica	22
Tabela 3 - Propriedades do poli(3-hidroxibutirato) em comparação às propriedades de polipropileno e polietileno de baixa densidade	26
Tabela 4 - Condições de cultivo de <i>Bacillus megaterium</i> apresentadas na literatura....	29
Tabela 5 - Experimentos realizados por outros autores utilizando <i>Bacillus megaterium</i> para a produção de PHB.....	30
Tabela 6 - Condições de cultivo de <i>Alcaligenes latus</i> apresentadas na literatura	30
Tabela 7 - Experimentos realizados por outros autores utilizando <i>Alcaligenes latus</i> para a produção de PHB	31
Tabela 8 - Composição do meio de cultivo utilizado para os ensaios	35
Tabela 9 - Composição da solução de metais traço utilizada para ambos os meios de cultivo.....	36
Tabela 10 - Parâmetros utilizados para os ensaios de determinação da concentração inicial de lactose	40
Tabela 11 - Fatores da Etapa 1 - determinação da concentração inicial de substrato e microrganismo - dos ensaios com planejamento experimental.....	41
Tabela 12 - Níveis alto e baixo de cada fator na Etapa 1 - determinação da concentração inicial de substrato e microrganismo - dos ensaios com planejamento experimental	41
Tabela 13 - Fatores mantidos constantes na Etapa 2 dos ensaios com planejamento experimental	43
Tabela 14 - Fatores mantidos constantes na Etapa 3 dos ensaios com planejamento experimental	44
Tabela 15 - Parâmetros utilizados nos ensaios realizados em biorreator de bancada....	45
Tabela 16 - Parâmetros utilizados para a cromatografia gasosa no equipamento modelo Master GC, marca Dani.....	51
Tabela 17 - Caracterização do soro de leite utilizado neste estudo em comparação a outros resultados obtidos da literatura	53

Tabela 18 - Caracterização do soro de leite após o processo de precipitação ácida de proteínas e neutralização com hidróxido e amônio e da lactose extraída por processos de separação por membranas	54
Tabela 19 - Consumo de lactose e massa seca produzida no ensaio de determinação da concentração inicial de lactose com as bactérias <i>Alcaligenes latus</i> e <i>Bacillus megaterium</i>	56
Tabela 20 - Resultados de consumo de substrato, concentração de células secas e de PHB obtidos para a Etapa 1 - determinação da concentração inicial de substrato e microrganismo - do planejamento experimental	60
Tabela 21 - Resultado da análise de variância (valor p) para as variáveis resposta avaliadas na Etapa 2 - neutralização do pH do soro de leite, após a precipitação das proteínas - do planejamento experimental	65
Tabela 22 - Fator de rendimento em células e produto e produtividade volumétrica obtidos para a Etapa 2 - neutralização do pH do soro de leite, após a precipitação das proteínas - do planejamento experimental	66
Tabela 23 - Resultado da análise de variância (valor p) para as variáveis resposta avaliadas na Etapa 3 - definição do meio com melhor desempenho - do planejamento experimental	66
Tabela 24 - Fator de rendimento em células e produto e produtividade volumétrica obtidos para na Etapa 3 - definição do meio com melhor desempenho - do planejamento experimental	70
Tabela 25 - Parâmetros cinéticos da bactéria <i>Alcaligenes latus</i> obtidos pela avaliação dos resultados do ensaio realizado em biorreator de bancada.....	73
Tabela 26 - Temperatura de fusão e cristalinidade do PHB extraído da bactéria <i>Alcaligenes latus</i> e do PHB padrão em comparação com resultados de outros autores .	78
Tabela 27 - Dados do evento de perda de massa identificado para o polímero produzido por <i>Alcaligenes latus</i> e para o PHB padrão em comparação a dados obtidos na literatura	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Monômeros de PHAs produzidos por bactérias a partir de diferentes substratos.....	28
Quadro 2 - Procedimentos utilizados para extração de PHAs descritos na literatura ...	34
Quadro 3 - Métodos utilizados no trabalho.....	38
Quadro 4 - Codificação e composição dos meios testados na Etapa 3 dos ensaios com planejamento experimental.....	44
Quadro 5 - Resultados obtidos para a comparação múltipla de médias de Duncan para a variável resposta concentração de PHB na Etapa 2 do planejamento experimental	65
Quadro 6 - Resultados obtidos para a comparação múltipla de médias de Duncan para a variável resposta concentração de células na Etapa 3 - definição do meio com melhor desempenho - do planejamento experimental	68
Quadro 7 - Resultados obtidos para a comparação múltipla de médias de Duncan para a variável resposta concentração de PHB na Etapa 3 - definição do meio com melhor desempenho - do planejamento experimental	69
Quadro 8 - Números de onda e banda correspondente identificados no PHB padrão e PHB produzido pela bactéria <i>A. latus</i>	76
Quadro A - 1 - Marca dos reagentes utilizados na execução do trabalho	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da molécula de lactose.....	23
Figura 2 - Estrutura química geral dos polihidroxicanoatos	24
Figura 3 - Estrutura química simplificada do ácido 3-hidroxi-butírico	25
Figura 4 - Fases metabólicas da biossíntese de polihidroxicanoatos.....	27
Figura 5 - Representação das etapas do processo de extração de PHAs	32
Figura 6 - Fluxograma das etapas realizadas no trabalho	37
Figura 7 - Esquematização do biorreator de bancada utilizado para o experimento de produção de PHB empregando <i>Alcaligenes latus</i>	45
Figura 8 - Concentração de lactose, PHB e células em função do tempo no ensaio com a bactéria <i>Alcaligenes latus</i>	57
Figura 9 - Concentração de lactose, PHB e células em função do tempo no ensaio com a bactéria <i>Bacillus megaterium</i>	58
Figura 10 - Diagrama de Pareto para a concentração de PHB na Etapa 1	61
Figura 11 - Diagrama de Pareto para a concentração de células secas na Etapa 1.....	62
Figura 12 - Consumo de lactose pela bactéria <i>Alcaligenes latus</i> com a utilização de diferentes hidróxidos para a neutralização do pH do meio de cultivo preparado com o sobrenadante obtido após a precipitação ácida das proteínas do soro de leite	63
Figura 13 - Concentração de células secas da bactéria <i>Alcaligenes latus</i> com a utilização de diferentes hidróxidos para a neutralização de pH do meio de cultivo preparado com o sobrenadante obtido após a precipitação ácida das proteínas do soro de leite.....	64
Figura 14 - Concentração de PHB da bactéria <i>Alcaligenes latus</i> com a utilização de diferentes hidróxidos para a neutralização de pH do meio de cultivo preparado com o sobrenadante obtido após a precipitação ácida das proteínas do soro de leite	64
Figura 15 - Consumo de lactose pela bactéria <i>Alcaligenes latus</i> com a utilização de diferentes meios de cultivo.....	67
Figura 16 - Valores de concentração de células secas da bactéria <i>Alcaligenes latus</i> com a utilização de diferentes meios de cultivo.....	67
Figura 17 - Valores de concentração de PHB da bactéria <i>Alcaligenes latus</i> com a utilização de diferentes meios de cultivo	69

Figura 18 - Curvas de concentração de substrato, células e PHB versus tempo no ensaio em biorreator de bancada com <i>Alcaligenes latus</i>	71
Figura 19 - Curvas de velocidade específica de crescimento, consumo de substrato e formação de produto em função do tempo em biorreator de bancada com <i>Alcaligenes latus</i>	72
Figura 20 - Espectros de FTIR obtidos para o polímero extraído da bactéria <i>Alcaligenes latus</i> em comparação ao PHB padrão	74
Figura 21 - Ampliação dos espectros de FTIR obtidos para o polímero extraído da bactéria <i>Alcaligenes latus</i> em comparação ao PHB padrão na região de número de onda entre 1200 e 1800 cm^{-1}	75
Figura 22 - Curvas DSC para o polímero extraído com diversas condições de produção em comparação ao PHB padrão.....	77
Figura 23 - Curvas TG para o polímero extraído com diversas condições de produção em comparação ao PHB padrão.....	79
Figura 24 - Curvas DTG para o polímero extraído com diversas condições de produção em comparação ao PHB padrão.....	80
Figura B - 1 - Variações de temperatura durante o ensaio de crescimento em biorreator de bancada	93
Figura B - 2 - Variações de pH obtidas durante o ensaio no biorreator de bancada	93
Figura B - 3 - Frequências do agitador ajustadas durante o ensaio em biorreator de bancada.....	94
Figura B - 4 - Vazões de ar ajustadas durante o ensaio em biorreator de bancada	94
Figura B - 5 - Concentrações de oxigênio dissolvido registradas durante o ensaio em biorreator de bancada.....	95
Figura C - 1 - Ajuste de dados aplicado à curva de concentração de lactose obtida no ensaio em biorreator de bancada.....	96
Figura C - 2 - Ajuste de dados aplicado à curva de concentração de células secas obtida no ensaio em biorreator de bancada.....	96
Figura C - 3 - Ajuste de dados aplicado à curva de concentração de PHB obtida no ensaio em biorreator de bancada.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIPLAST	Associação Brasileira da Indústria do Plástico
ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijo
ATR	Refletância Total Atenuada
CCT	Coleção de Culturas Tropical
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DO	Densidade Ótica
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DSMZ	Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares
FID	Detector por Ionização de Chama
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IEA	Instituto de Economia Agrícola
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LA	Meio de cultivo com Lactose Apenas
LBio	Laboratório de Bioprocessos
LEBio	Laboratório de Energia e Bioprocessos
LPol	Laboratório de Polímeros
LPSM	Meio de cultivo com lactose extraída por processos de separação por membranas
NPN	Nitrogênio Não-Protéico
OD	Oxigênio Dissolvido
PEBD	Polietileno de Baixa Densidade
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Poli(3-hidroxiacetato)
PP	Polipropileno
PSM	Processos de Separação por Membranas
SA	Meio de cultivo com soro de leite apenas
SPPN	Meio de cultivo com soro de leite após precipitação ácida de proteínas neutralizado com hidróxido de amônio
ST	Sólidos Totais

STA

Análise Térmica Simultânea

TG

Termogravimetria

LISTA DE SÍMBOLOS

M_{P0}	Massa de produto inicial (g)
M_{Pf}	Massa de produto final (g)
$M_{S,cons}$	Massa de substrato consumido (g)
M_{X0}	Massa de células inicial (g)
M_{Xf}	Massa de células final (g)
p	Produtividade volumétrica ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
P	Concentração de produto (g.L^{-1})
P_0	Concentração de produto inicial (g.L^{-1})
P_f	Concentração de produto final (g.L^{-1})
S	Concentração de substrato (g.L^{-1})
t	Tempo (h)
X	Concentração de células (g.L^{-1})
$Y_{P/S}$	Fator de rendimento em produto (g.g^{-1})
$Y_{X/S}$	Fator de rendimento em células (g.g^{-1})
ΔH_m	Calor de fusão experimental (J.g^{-1})
ΔH_0	Entalpia teórica do PHB (J.g^{-1})
μ_x	Velocidade específica de crescimento (h^{-1})
μ_s	Velocidade específica de consumo de substrato ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
μ_p	Velocidade específica de formação de produto ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
χ	Grau de cristalinidade (%)

RESUMO

Polihidroxicanoatos são polímeros 100% biodegradáveis produzidos intracelularmente por bactérias, que possuem características semelhantes às de polímeros de origem petrolífera e configuram uma alternativa a estes polímeros, os quais devido ao seu crescente acúmulo na natureza vêm se tornando um grave problema ambiental. O poli(3-hidroxi-butirato) (PHB) é um poliéster que faz parte deste grupo, sendo o mais amplamente estudado. Visando o aproveitamento do soro de leite, que é gerado em volumes elevados na produção de queijo, e ainda uma possível redução de custos do processo de produção de PHB, este trabalho avaliou a produção deste polímero por meio das bactérias *Alcaligenes latus* e *Bacillus megaterium*. Inicialmente investigou-se o efeito de diferentes concentrações iniciais de lactose e de diferentes tempos de processo, em ensaio realizado em agitador orbital a 35 °C e 200 rpm. Definiu-se também qual das bactérias apresentou melhor desempenho e a concentração inicial de lactose por meio de ensaio em agitador orbital com as mesmas condições mencionadas anteriormente. Estes resultados foram avaliados por meio de planejamento experimental fatorial 2³ sem ponto central. Avaliou-se o efeito da neutralização do meio de cultivo preparado com o sobrenadante obtido após a precipitação ácida das proteínas do soro de leite com hidróxido de amônio (NH₄OH), hidróxido de potássio (KOH) e hidróxido de sódio (NaOH) (soluções 10% m/v) por meio de análise estatística de um fator a vários níveis (ANOVA). Ainda, foram comparados (por meio de ANOVA) quatro meios de cultivo (produzidos com lactose, soro de leite, sobrenadante obtido após a precipitação ácida das proteínas do soro de leite, lactose extraída por processos de separação por membranas) por meio de ensaio em agitador orbital nas mesmas condições previamente mencionadas. O meio que proporcionou maior concentração final de PHB foi utilizado em ensaio em biorreator de bancada, a 35 °C e pH controlado em 6,5. Na primeira fase, identificou-se que para a bactéria *A. latus* a concentração inicial de lactose mais adequada foi a de 20 g.L⁻¹, com produção máxima de PHB de 0,55 g.L⁻¹ em 12 horas, enquanto que para a bactéria *B. megaterium* foi de 16 g.L⁻¹, com produção máxima de PHB de 0,095 g.L⁻¹ também em 12 horas. Com a posterior análise estatística, verificou-se que não houve diferença significativa na geração de produto com as concentrações iniciais de lactose de 16 e 20 g.L⁻¹. A bactéria que proporcionou maior produção de polímero foi a *A. latus*, enquanto o meio foi o composto pelo sobrenadante obtido após a precipitação ácida das proteínas do soro de leite (neutralizado com hidróxido de amônio - melhor resultado na neutralização). No ensaio em biorreator de bancada (TecBio 7,5, Tecnal, Brasil), constatou-se que o tempo total de processo foi de 11,6 horas, com máxima velocidade específica de crescimento de 0,428 h⁻¹, máxima velocidade específica de formação de produto de 0,026 g.L⁻¹.h⁻¹, máxima velocidade específica de consumo de substrato de 1,036 g.L⁻¹.h⁻¹, fator de rendimento em células de 0,211 g.g⁻¹, fator de rendimento em produto de 0,024 g.g⁻¹ e produtividade volumétrica de 0,014 g.L⁻¹.h⁻¹. Ainda, por meio de caracterização do PHB extraído e do PHB padrão por calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, verificou-se que o polímero produzido possui propriedades semelhantes às do padrão, demonstrando que a produção de PHB por *A. latus* e *B. megaterium* utilizando soro de leite é factível.

Palavras-chave: soro de leite, poli(3-hidroxi-butirato), *Alcaligenes latus*, *Bacillus megaterium*, análise estatística.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates are 100% biodegradable polymers produced intracellularly by bacteria, and have characteristics similar to petroleum-based polymers. They emerge as an alternative to recalcitrant polymers, that because of its growing accumulation in nature are becoming a serious environmental problem. Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) is a polyester which is part of this group, being the most studied. In order to utilize whey, which is generated in large volumes in cheese production, and also to enable a possible cost reduction of the PHB production process, this study evaluated the production of this polymer by *Alcaligenes latus* e *Bacillus megaterium*. First of all, the effect of different initial lactose concentrations and different process times were investigated in an orbital shaker at 35 °C and 200 rpm. In addition, it was defined which bacteria showed best results and also the appropriate initial lactose concentration in an orbital shaker in the same conditions mentioned. The results were evaluated by a factorial 2³ (without central point) experimental design. The neutralization of the medium (prepared with the supernatant obtained after the acid protein precipitation of whey) with ammonium hydroxide (NH₄OH), potassium hydroxide (KOH) and sodium hydroxide (NaOH) (10% w/v solutions) was evaluated by a one factor statistical analysis (ANOVA). Also, four culture mediums (lactose, whey, supernatant obtained after acid protein precipitation of whey, lactose obtained by membrane filtration of whey) were compared through an experiment in orbital shaker in the same conditions used before. The results were also evaluated by a one factor statistical analysis. The medium with the best results was used in a bioreactor experiment, at 35 °C and pH controlled at 6.5. For *A. latus* the most appropriate initial lactose concentration was 20 g.L⁻¹, with a maximum PHB concentration of 0.55 g.L⁻¹ in 12 hours. For *B. megaterium*, the initial lactose concentration was 16 g.L⁻¹, and a maximum PHB concentration of 0.095 g.L⁻¹ also in 12 hours. With the posterior statistical analysis it was seen that there was no significant difference in PHB production with initial lactose concentrations of 16 and 20 g.L⁻¹. *A. latus* showed better results for PHB production, while the best medium was the one produced with the supernatant obtained after acid protein precipitation of whey (neutralized with ammonium hydroxide - best neutralization results). In the bioreactor experiment was observed that the total process time was 11.6 hours, with a maximum specific growth rate of 0.428 h⁻¹, maximum specific product formation rate of 0.026 g.L⁻¹.h⁻¹, maximum specific substrate consumption rate of 1.036 g.L⁻¹.h⁻¹, cell yield of 0.211 g.g⁻¹, PHB yield of 0.024 g.g⁻¹ and volumetric productivity of 0.014 g.L⁻¹.h⁻¹. Finally, it was seen, through the polymer characterization by differential scanning calorimetry, thermogravimetry and Infrared Spectroscopy with Fourier transform, that the produced polymer has similar characteristics to those of the standard PHB, showing that the production of PHB by *A. latus* and *B. megaterium* using milk whey is feasible.

Keywords: milk whey, poly(3-hydroxybutyrate), *Alcaligenes latus*, *Bacillus megaterium*, statistical analysis.

1 INTRODUÇÃO

Os polímeros são amplamente utilizados para múltiplas aplicações devido às suas propriedades. Por apresentarem variadas possibilidades de processamento e otimização de propriedades mecânicas e térmicas, estes vêm substituindo outros materiais como papel, vidro e até ligas metálicas em funções como embalagens, partes automotivas e revestimentos, entre outras.

A conveniência dos polímeros resultou em uma elevada propagação de seu uso e, conseqüentemente, no acúmulo de resíduos que são, em sua grande maioria, não biodegradáveis, caracterizando um grave problema ambiental. Dados da Associação Brasileira da Indústria do Plástico (ABIPLAST, 2014) mostram que no ano de 2014 o Brasil foi responsável pela geração de aproximadamente 7 milhões de toneladas de resíduos plásticos. Destes, apenas 15% correspondem a resíduos recolhidos em cidades que possuem coleta seletiva. Ainda, estima-se que foram retirados do meio ambiente em torno de 805 mil toneladas de resíduos pós-consumo (ABIPLAST, 2014).

O gerenciamento destes resíduos pode ser realizado por meio de reciclagem primária, secundária, terciária ou quaternária (SPINACÉ; DE PAOLI, 2005). As reciclagens primária e secundária se tornam limitadas pela quantidade de aditivos e cargas utilizados no polímero, além da perda de propriedades a cada reprocessamento realizado. As reciclagens terciária e quaternária são processos geralmente onerosos e potencialmente poluidores se realizados sem os devidos controles.

Assim, tornam-se necessários estudos relacionados não só à biodegradação de polímeros, mas também à produção de polímeros biodegradáveis. Os polihidroxicanoatos (PHAs) são polímeros 100% biodegradáveis que surgem como uma alternativa ao uso dos polímeros de origem petrolífera. Estes são produzidos por microrganismos que utilizam os mesmos como uma fonte reserva de carbono, empregando substratos orgânicos. Um dos PHAs mais estudados é o poli(3-hidroxiбутирато) (PHB), que é produzido por várias espécies bacterianas e possui características que se assemelham às de polímeros de origem petrolífera. Porém, os PHAs, atualmente, apresentam preço elevado quando comparados aos polímeros petroquímicos, pois seu processo de produção demanda mais investimentos. Este é um dos principais fatores que limitam o uso dos PHAs (GARCIA-GONZALEZ et al., 2015). Melhorias que levem à redução de custos são uma alternativa para a popularização destes (NATH et al., 2008).

Comumente, utiliza-se glicose como fonte de carbono para a produção de PHB, mas outras fontes podem ser utilizadas nestes processos, como sacarose e lactose. A lactose, por exemplo, pode ser encontrada em grandes quantidades no soro de leite (MATTILA-SANDHOLM; SAARELA, 2003, BALDASSO, 2011).

O soro de leite é um subproduto obtido indiretamente e em volumes elevados na produção de queijo nas indústrias brasileiras, ainda é tratado como um resíduo. De acordo com o Instituto de Economia Agrícola (IEA, 2013), os dados referentes à produção de soro de leite no Brasil são altamente imprecisos. Contudo, dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ, 2014) apontam que no Brasil, em 2011, foram produzidas aproximadamente 870 mil toneladas de queijo, o que fornece uma perspectiva da geração de soro de leite.

Este efluente líquido, quando não tratado, pode ser o causador de sérios problemas ambientais. Isto ocorre devido à alta carga de matéria orgânica, que induz a proliferação de microrganismos e algas e, conseqüentemente, reduz a concentração de oxigênio dissolvido (OD), o que torna sua degradação mais lenta e prejudica o ecossistema local (SOUZA et al., 2010). Contudo, este subproduto possui altos teores de lactose, um dissacarídeo que pode ser utilizado como fonte de carbono para os microrganismos produtores de PHAs.

A bactéria *Bacillus megaterium* apresenta a capacidade de consumir diversos carboidratos complexos, o que pode favorecer o metabolismo deste microrganismo para a produção de PHAs (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005). Com relação à bactéria *Alcaligenes latus*, também capaz de produzir PHAs, ressalta-se que não foram encontrados experimentos utilizando este microrganismo e lactose em sua forma integral como fonte de carbono na literatura.

Tendo em vista as considerações relatadas, verifica-se que a utilização da lactose extraída do soro de leite, ou até mesmo o próprio soro como fonte de carbono para a produção de PHAs por meio de bactérias, pode resultar em um produto com preço mais acessível, popularizando o uso destes polímeros biodegradáveis, além de auxiliar na destinação do efluente líquido.

Neste contexto, o presente trabalho visou estudar a utilização do soro de leite como substrato para a produção de PHB empregando *A. latus* e *B. megaterium*, buscando uma alternativa para a destinação deste subproduto da produção de queijo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é definir condições adequadas para a produção de PHB utilizando lactose e soro de leite como substrato e também caracterizar o PHB produzido empregando *A. latus* e *B. megaterium*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Verificar a viabilidade de produção de PHB utilizando *A. latus* e *B. megaterium* e empregando lactose e soro de leite como substratos.

b) Definir o tempo e teor de lactose inicial adequados para a otimização da produção de polímero.

c) Distinguir entre *A. latus* e *B. megaterium*, qual microrganismo possui melhor desempenho na produção de polímero utilizando lactose como fonte de carbono.

d) Definir dentre hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e hidróxido de amônio, qual é o composto mais adequado para a neutralização de soro de leite após precipitação ácida de proteínas.

d) Determinar dentre os meios definidos para teste, qual proporciona maior produção de polímero.

e) Avaliar a cinética de produção de PHB por *A. latus*.

f) Comparar o polímero produzido em laboratório em diferentes condições com PHB padrão quanto às propriedades térmicas e químicas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Neste capítulo, são descritos os aspectos teóricos básicos para o desenvolvimento deste trabalho, incluindo a matéria-prima (soro de leite e lactose), produto de interesse (PHB), aspectos relevantes quanto aos microrganismos produtores e técnicas de produção.

3.1 SORO DE LEITE

O soro de leite é a fração aquosa que se separa do coágulo no processo de produção de queijos. É um líquido de cor amarelo-esverdeada e que detém quase metade dos sólidos contidos no leite (ZADOW, 1992). Esse subproduto é gerado na produção de queijo durante as etapas de corte, agitação, aquecimento, enformagem e prensagem (NEVES, 2001). Para cada quilograma de queijo produzido, 8 - 9 kg de soro são gerados (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011).

De acordo com dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ) (2014), o Brasil é um dos maiores produtores de leite e queijo do mundo, com uma produção de aproximadamente 35 bilhões de litros de leite em 2013 e 870 mil toneladas de queijo em 2011. Estes dados demonstram a elevada geração de soro de leite anualmente. De acordo com Baldasso, Barros e Tessaro (2011), deste volume, apenas 50% é processado no Brasil.

O soro de leite gerado apresenta alto teor de matéria orgânica, porém, ainda assim é comumente tratado como efluente líquido, sendo disposto diretamente na rede de esgotos ou rios, ou utilizado na alimentação de animais (SOUZA et al., 2010). A carga poluente de um efluente é representada pela DBO (demanda biológica de oxigênio), que no soro pode chegar a 60.000 mg O₂.L⁻¹, valor muito superior ao de um esgoto doméstico, o que torna seu descarte de alto custo (NATH et al., 2008; BALDASSO, 2011). O descarte deste resíduo sem o tratamento correto constitui tanto um problema ambiental como também um desperdício de matéria-prima que pode ser utilizada na fabricação de produtos com valor agregado (SOUZA et al., 2010).

Os componentes mais importantes do soro de leite são a lactose, proteínas solúveis e a gordura. A Tabela 1 apresenta os valores aproximados da composição do soro de leite.

Tabela 1 - Composição aproximada do soro de leite

Componente	Concentração mássica em base seca (%)
Água	93-95
Sólidos totais (ST)	5,5-6,5
Proteína	0,7-1,2
Gordura	0,04-0,05
Lactose	3,8-5,0
Cinzas	0,5-0,8
Nitrogênio não-protéico (NPN)	0,15-0,18

Fonte: adaptado de Bylund (1995), Miller; Jarvis; Mcbean, (2000), Yada (2004).

O soro é amplamente utilizado como fonte de proteína, pois possui aproximadamente 20% do total proteico do leite (SOUZA et al., 2010; BALDASSO 2011). Processos com altas temperaturas, como autoclavagem, alteram as propriedades das proteínas, geralmente transformando-as em insolúveis, o que torna importante o conhecimento de suas temperaturas de desnaturação térmica. A Tabela 2 apresenta as proteínas que se encontram em maior concentração no soro de leite, seu ponto isoelétrico e temperatura de desnaturação térmica.

Tabela 2 - Proteínas em maior concentração no soro de leite, seus respectivos pontos isoelétricos e temperaturas de desnaturação térmica

Proteína	Concentração ^{a,b} (g.L ⁻¹)	Ponto isoelétrico ^{a,b} (pH)	Temperatura de desnaturação térmica (°C)
β-Lactoglobulina	2,70	5,2	83 ^c
α-Lactoalbumina	1,20	4,5 - 4,8	83 ^c
Imunoglobulinas	0,65	5,5 - 8,3	61 - 71 ^d
Albumina sérica bovina	0,40	4,7 - 4,9	65 ^c
Lactoferrina	0,10	9,0	70 - 90 ^e
Lactoperoxidase	0,02	9,5	68 - 76 ^f

Fonte: adaptado de ^a Zydney (1998); ^b Baldasso (2011); ^c Damodaran, Parkin e Fennema (2010); ^d Vermeer e Norde (2000); ^e Indyk et al. (2007); ^f Marín et al. (2003).

De acordo com Yada (2004), a β -Lactoglobulina é a proteína mais abundante no soro, que representa 50% do total proteico. Ainda, a α -Lactoalbumina é a segunda mais abundante, representando 25% do total de proteínas no soro de leite.

3.1.2 Lactose

A lactose é um dissacarídeo formado de galactose e glicose, sendo o carboidrato característico do leite. No leite, é responsável por 40% do total de sólidos, enquanto que no soro este açúcar corresponde a aproximadamente 70% em base seca (MATTILASANDHOLM; SAARELA, 2003, BALDASSO, 2011).

Este dissacarídeo se encontra no leite dos mamíferos, é produzido a partir da glicose no sangue e confere ao leite sabor adocicado (FOX; MCSWEENEY, 1998; BALDASSO, 2011). Por ser uma fonte de carbono, alguns microrganismos são capazes de utilizá-la como substrato para a formação de polímero ou outros produtos. A Figura 1 apresenta a estrutura química da molécula de lactose.

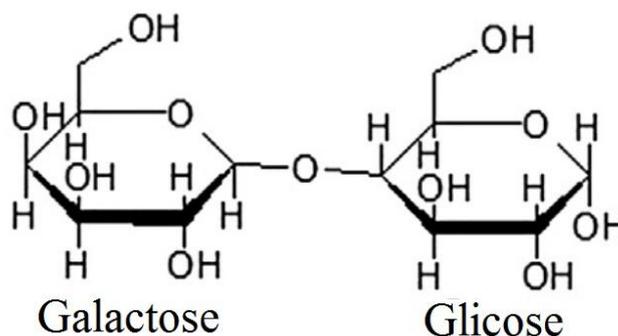


Figura 1 - Estrutura química da molécula de lactose
Fonte: adaptado de Ihli; Paterson (2015)

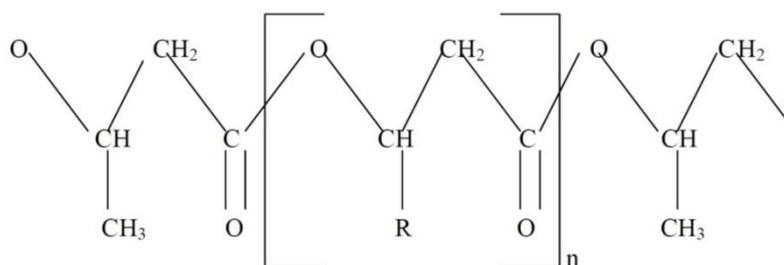
A lactose pode ser separada do soro de leite por meio de concentração e resfriamento para a cristalização da lactose, que é obtida posteriormente por meio de centrifugação (MIZUBUTI, 1994). A ultrafiltração pode ser utilizada para a separação das proteínas do soro, permitindo que componentes de baixa massa molar como lactose e sais permeiem através da membrana (FOX; MCSWEENEY, 1998). Outros processos que podem separar as proteínas do soro de leite resultando em um líquido com maiores concentrações de lactose são: desnaturação térmica e coagulação, precipitação por meio de ajuste de pH, filtração por colunas cromatográficas, entre outros (FOX; MCSWEENEY, 1998; YADA, 2004).

3.2 BIOPOLÍMEROS

Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC, 1997), biopolímeros são macromoléculas formadas por organismos vivos. Alguns exemplos são as proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e poliésteres como os PHAs. Estes últimos possuem algumas vantagens sobre os polímeros derivados de petróleo como, por exemplo, sua natureza biodegradável, o que os torna mais atrativos para evitar a utilização dos polímeros de origem petrolífera, que por serem recalcitrantes acabam por acumular no meio ambiente (SIVAKUMAR; AL-BAHRY; AL-BATTASHI, 2013).

3.2.1 Polihidroxialcanoatos

Os PHAs são poliésteres produzidos e acumulados naturalmente como grânulos intracelulares por um grande número de bactérias em resposta a condições de crescimento desfavoráveis ou desbalanceamento nutricional (NATH et al., 2008; GARCIA-GONZALEZ et al., 2015). O desbalanceamento nutricional pode ser a limitação de um macronutriente como nitrogênio ou fósforo, ou ainda o excesso de carbono (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995; KHANNA; SRIVASTAVA, 2005). Estes poliésteres são metabólitos secundários armazenados como reserva intracelular de energia e de carbono. Inoue e colaboradores (2016) destacam que até o momento, aproximadamente 150 diferentes tipos de monômeros de PHAs foram identificados. A Figura 2 apresenta a estrutura química geral dos PHAs e algumas variações conforme o radical presente.



- n = entre 600 e 3500
 R = hidrogênio, poli(3-hidroxiopropionato)
 R = metil, poli(3-hidroxi butirato)
 R = etil, poli(3-hidroxi valerato)
 R = propil, poli(3-hidroxi hexanoato)
 R = pentil, poli(3-hidroxi octanoato)

Figura 2 - Estrutura química geral dos polihidroxialcanoatos
 Fonte: Khanna e Srivastava, 2005

Por serem biodegradáveis e poderem ser produzidos a partir de fontes renováveis de carbono, estes polímeros têm sido intensamente estudados. Compartilham muitas propriedades com polímeros sintéticos, e, portanto, são considerados alternativas para os derivados de petróleo e chamados de “termoplásticos biodegradáveis”. O alto custo de produção é um dos principais fatores que limitam o uso mais amplo dos PHAs (GARCIA-GONZALEZ et al., 2015). Melhorias nas estratégias de produção, que levem à redução de custos, são uma alternativa para a popularização destes (NATH et al., 2008).

O polímero formado por monômeros de ácido 3-hidroxi-butírico é nomeado poli(3-hidroxi-butirato), comumente conhecido por sua abreviação, PHB. É um dos PHAs mais amplamente estudados e caracterizados (NATH et al., 2008; FACCIN et al., 2013; DOMÍNGUEZ-DÍAZ et al., 2015). O PHB pode ser produzido utilizando matérias-primas de origem renovável, como a lactose, proveniente do soro de leite, ou sacarose, da cana-de-açúcar (LIMA et al., 2001). Este polímero é acumulado dentro das bactérias produtoras, podendo chegar a 80% da massa seca da célula (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

A Figura 3 apresenta a estrutura química do ácido 3-hidroxi-butírico.

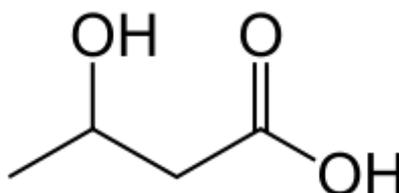


Figura 3 - Estrutura química simplificada do ácido 3-hidroxi-butírico
Fonte: o autor

Em termos de massa molar, fragilidade, rigidez, temperatura de transição vítrea, entre outras propriedades, o PHB é comparável a alguns termoplásticos derivados de petróleo mais comuns, como o polipropileno (PP) (MORENO et al., 2015; MOZUMDER et al., 2015). Para algumas aplicações, é possível utilizar o PHB em substituição a alguns polímeros mais tradicionais e não biodegradáveis (GROTHER; MOO-YOUNG; CHISTI, 1999; SIVAKUMAR; AL-BAHRY; AL-BATASHI, 2013). A Tabela 3 apresenta algumas propriedades do PHB em comparação ao polipropileno e polietileno de baixa densidade (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

Tabela 3 - Propriedades do poli(3-hidroxiбутирато) em comparação às propriedades de polipropileno e polietileno de baixa densidade

Propriedade	Poli(3-hidroxiбутирато)	Polipropileno	Polietileno de baixa densidade
Temperatura de fusão (°C)	179,0	170,0	130,0
Resistência à tração (MPa)	40,0	34,5,0	10,0
Temperatura de transição vítrea (°C)	4,0	45,0	-30,0
Alongamento na ruptura (%)	5,0	400,0	620,0
Módulo de elasticidade (GPa)	3,5	1,7	0,2

Fonte: adaptado de Khanna e Srivastava (2005)

3.2.2 Produção de polihidroxiácido

Para a produção de PHAs, dois principais métodos podem ser utilizados, sendo dependentes do tipo de microrganismo utilizado. O primeiro tipo de microrganismo necessita de limitação de um nutriente essencial como nitrogênio, fósforo, potássio, oxigênio ou enxofre para que realize a síntese do polímero (LEE, 1996). Dentre este grupo, estão consideradas as bactérias *Alcaligenes eutrophus*, *Protomonas extorquens* e *Pseudomonas oleovorans* (LEE, 1996; FACCIN, 2012). O segundo tipo apresenta uma produção associada a seu crescimento, não dependendo da limitação de nutrientes essenciais. Entre as bactérias pertencentes a este grupo destacam-se *A. latus* e *B. megaterium* (LEE, 1996; FACCIN, 2012).

O processo de produção utilizando microrganismos do primeiro tipo geralmente é realizado em dois estágios. O primeiro estágio tem a função de multiplicação celular e é realizada pelo cultivo da bactéria em uma solução contendo macronutrientes, metais traço, carbono e demais nutrientes. O segundo estágio consiste na limitação de um nutriente essencial como nitrogênio, fósforo ou oxigênio, provocando assim o acúmulo do polímero (LIMA et al., 2001).

O processo utilizando microrganismos do segundo tipo é mais simples e não necessita de um estágio para a multiplicação celular, já que o acúmulo de PHAs ocorre de maneira associada ao crescimento. A produção industrial de PHAs é realizada com

culturas puras de bactérias capazes de acumular polímero intracelularmente (INOUE et al., 2016).

As propriedades do polímero produzido dependem do tipo de fontes de carbono utilizadas durante o cultivo, dos caminhos metabólicos que a bactéria usa para conversão dos precursores e da especificidade das enzimas envolvidas na conversão (LIMA et al., 2001; LAYCOCK et al., 2013).

Quanto à biossíntese de PHAs, Steinbüchel e Valentin (1995) indicam que, de modo geral, este processo pode ser dividido em três fases (Figura 4).

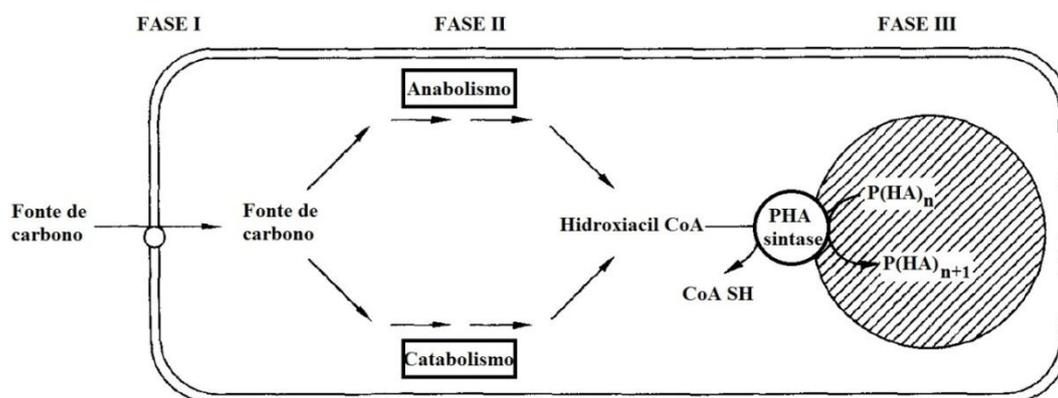


Figura 4 - Fases metabólicas da biossíntese de polihidroxicanoatos
Fonte: adaptado de Steinbüchel e Valentin (1995)

Na Fase I, uma fonte de carbono adequada deve permear a parede celular. Isto pode ocorrer por processos de transporte específicos localizados na parede celular ou ainda por difusão. Na Fase II, reações anabólicas e/ou catabólicas convertem a fonte de carbono em hidroxiacil coenzima A (Hidroxiacil-CoA), um tioéster que é substrato para a PHA sintase, ou PHA polimerase. Na Fase III, a PHA sintase utiliza os tioésteres como substrato e catalisa a formação de ligações ésteres liberando a coenzima A e formando o respectivo PHA (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995; FACCIN, 2012).

3.2.3 Microrganismos produtores de polihidroxicanoatos

Mais de 300 bactérias com capacidade de produção de PHAs já foram identificadas (INOUE et al., 2016). Ainda, alguns membros da família das Halobacteriaceae do domínio Archaea também produzem PHAs (REHM; STEINBÜCHEL, 1999). O Quadro 1 apresenta algumas das bactérias com capacidade

de produção de PHAs e os diferentes meros sintetizados a partir de diferentes substratos.

Bactéria	Substrato/Matéria-prima	Monômero
<i>Alcaligenes latus</i> ^a	Caldo de cana-de-açúcar (sacarose)	
<i>Alcaligenes latus</i> ^b	Soro de leite hidrolisado (glicose e galactose)	3-hidroxi-3-butirato
<i>Alcaligenes latus</i> ^c	Suco de beterraba sacarina (sacarose)	
<i>Alcaligenes eutrophus</i> ^d	Ácido propiônico	3-hidroxi-3-butirato e 3-hidroxi-valerato
<i>Alcaligenes eutrophus</i> ^d	5-clorovalerato	3-hidroxi-3-butirato, 3-hidroxi-valerato e 5-hidroxi-valerato
<i>Alcaligenes eutrophus</i> ^d	1,4-butanodiol	3-hidroxi-3-butirato e 4-hidroxi-3-butirato
<i>Bacillus megaterium</i> ^e	Glicerol	
<i>Halomonas i4786</i> ^f	Resíduos agroindustriais*	3-hidroxi-3-butirato
<i>Pseudomonas oleovorans</i> ^d	Ácido nonanóico	3-hidroxi-hexanoato, 3-hidroxi-heptanoato, 3-hidroxi-octanoato, 3-hidroxi-nonanoato, 3-hidroxi-decanoato e 3-hidroxi-undecanoato
<i>Pseudomonas putida</i> ^d	Ácido 4-hidroxi-hexanóico	3-hidroxi-3-butirato, 3-hidroxi-valerato e 4-hidroxi-hexanoato
<i>Rhodospirillum rubrum</i> ^d	Ácido 4-pentenóico	3-hidroxi-3-butirato, 3-hidroxi-valerato e 3-hidroxi-4-pentenoato
<i>Haloferax mediterranei</i> ^d	Amido	3-hidroxi-3-butirato e 3-hidroxi-valerato
<i>Burkholderia</i> sp. ^d	Ácido glicônico	3-hidroxi-3-butirato e 3-hidroxi-4-pentenoato

Quadro 1 - Monômeros de PHAs produzidos por bactérias a partir de diferentes substratos
 Fonte: adaptado de ^a Wisuthiphaet e Napathorn (2016); ^b Baei et al. (2010); ^c Wang et al. (2013); ^d Lima et al. (2001); ^e Moreno et al. (2015); ^f Elain et al. (2016);

* Resíduos de leguminosas e frutas, constituindo uma fonte de variados açúcares.

3.2.3.1 *Bacillus megaterium*

A bactéria *B. megaterium* é Gram positiva, não móvel, com forma de bacilo, formadora de esporos, e, dependendo de sua linhagem, aeróbia. De acordo com Naranjo

e colaboradores (2013), este microrganismo possui a habilidade de produzir PHB utilizando glicose ou glicerol como fontes de carbono. A Tabela 4 apresenta condições de cultivo utilizadas por outros autores com a bactéria *B. megaterium*.

Tabela 4 - Condições de cultivo de *Bacillus megaterium* apresentadas na literatura

Condições				
Equipamento	Temperatura (°C)	Frequência do agitador (rpm)	pH	Referência
	30	200	7,4	Shahid et al. (2013)
Agitador orbital	30	200	7,0	Faccin (2012)
	37	200	7,0	Moreno et al. (2015)
Biorreator	33	200 - 300	5,0 - 9,0	Naranjo et al. (2013)
N.i.	37	N.i.	7,0	Pandian et al. (2010)

Fonte: adaptado de Pandian et al. (2010), Faccin (2012), Naranjo et al. (2013), Shahid et al. (2013), Moreno et al. (2015).

Nota: N.i. não informado pelos autores.

Com a bactéria *B. megaterium*, foi identificada a primeira variedade de PHAs por Lemoigne, em 1962 (JACQUEL et al., 2008). Desde então, esta vem sendo amplamente estudada e é distinta por metabolizar inclusive dissacarídeos para a produção de PHAs. Khanna e Srivastava (2005) afirmam que a bactéria *B. megaterium* é capaz de crescer utilizando diferentes fontes de carbono como melão de beterraba, frutose, sacarose, glicose e também lactose.

Ainda, de acordo com Omar et al. (2001), esta bactéria produz polímero de modo associado ao crescimento. A Tabela 5 apresenta experimentos realizados por outros autores utilizando este microrganismo.

Tabela 5 - Experimentos realizados por outros autores utilizando *Bacillus megaterium* para a produção de PHB

Matéria-prima	Concentração máxima obtida	Referência
Melaço de cana	2,2 g.L ⁻¹ com 48 h de cultivo	Gouda; Swellam; Omar, 2001
Resíduos de laticínios, farelo de arroz e água do mar	11,32 g.L ⁻¹ com 36 h de cultivo	Pandian et al., 2010
Fibra de fruta da palma de óleo vazia hidrolisada	12,48 g.L ⁻¹ com 48 h de cultivo	Zhang et al., 2013

Fonte: adaptado de Gouda; Swellam; Omar (2001), Pandian et al. (2010), Zhang et al. (2013)

3.2.3.2 *Alcaligenes latus*

A bactéria *A. latus* é Gram negativa, aeróbia, com forma de bacilos ou cocos, não formadora de esporos. Suas colônias são opacas, amareladas a cinza rosado e redondas (WANG et al., 2013). De acordo com Faccin (2012) esta bactéria é uma das mais utilizadas em estudos de produção de PHAs. A Tabela 6 apresenta condições de cultivo utilizadas por outros autores com a bactéria *A. latus*.

Tabela 6 - Condições de cultivo de *Alcaligenes latus* apresentadas na literatura

Equipamento	Condições			Referência
	Temperatura (°C)	Frequência do agitador (rpm)	pH	
Banho termostático	35	N.i.	7,0	Pinkwart; Schneider; Schlegel (1983)
Agitador orbital	33	200	N.i.	Grothe; Moo-Young; Chisti (1999)
	30	180	7,0	Zafar et al. (2012)
	33	200	7,0	Wang et al. (2013)

Fonte: adaptado de Pinkwart; Schneider; Schlegel (1983), Grothe; Moo-Young; Chisti (1999), Zafar et al. (2012), Wang et al. (2013).

Nota: N.i. não informado pelos autores.

A. latus produz PHB de maneira associada ao crescimento, sendo assim, uma fermentação de um único estágio é suficiente. Pode acumular até 80% em massa de células secas como PHB (GROTHER; MOO-YOUNG; CHISTI, 1999). A Tabela 7 apresenta outros experimentos utilizando a mesma bactéria e os principais resultados obtidos.

Tabela 7 - Experimentos realizados por outros autores utilizando *Alcaligenes latus* para a produção de PHB

Matéria-prima	Concentração máxima obtida	Referência
Sacarose	4,7 g.L ⁻¹ com 42 h de cultivo	Wang; Inoue, 2001
Suco de beterraba sacarina	4,01 g.L ⁻¹ com 30 h de cultivo	Wang et al., 2013
Melaço de cana	7,20 g.L ⁻¹ com 72 h de cultivo	Zafar et al., 2012
Soro de leite hidrolisado	1,66 g.L ⁻¹ com 72 h de cultivo	Baei et al., 2010

Fonte: adaptado de Wang; Inoue (2001); Baei et al. (2010); Wang et al. (2013); Zafar et al. (2012)

3.2.4 Extração e purificação dos polihidroxicanoatos

Os PHAs são acumulados intracelularmente, sendo assim, a primeira etapa para a obtenção do produto final, após o término do processo de produção, é a sua extração. Existe uma grande diversidade de métodos e estágios passíveis de aplicação, que diferem de acordo com o polímero e a porcentagem de extração e purificação desejada. A Figura 5 apresenta as etapas do processo de extração dos PHAs.

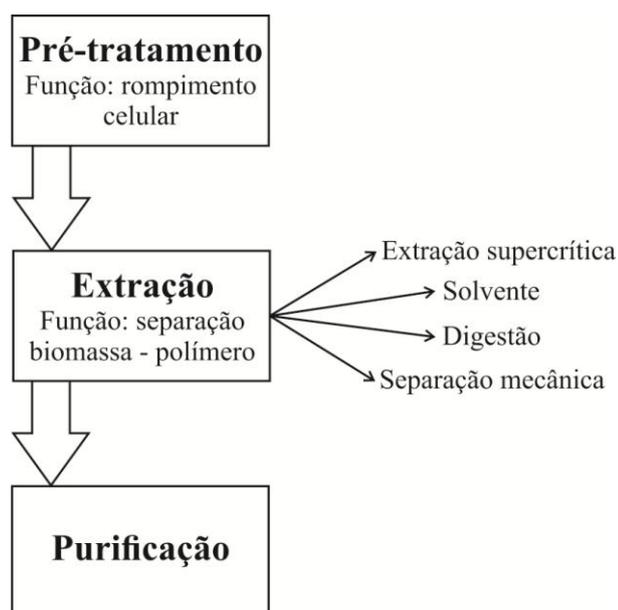


Figura 5 - Representação das etapas do processo de extração de PHAs
Fonte: adaptado de Posada et al. (2011).

O processo consiste basicamente na extração do polímero do citoplasma da célula por meio do rompimento da membrana celular e posterior separação do polímero da biomassa residual. A primeira etapa, pré-tratamento, consiste no rompimento celular, que pode ser realizado utilizando calor, adição de sal, alcalinidade e congelamento, entre outros. A segunda etapa, que corresponde à extração, pode ser realizada utilizando solventes, digestões, separação mecânica, extração com fluido supercrítico (POSADA et al., 2011).

O emprego de solventes altera a permeabilidade da membrana celular, dissolvendo o polímero. Alguns dos solventes utilizados são hidrocarbonetos clorados (clorofórmio), carbonatos cíclicos (carbonato de etileno e propileno), solventes halogenados (cloroetano, cloropropano), solventes não-halogenados (com cadeias entre 4 e 10 carbonos), álcoois, ésteres, amidas e cetonas (JIANG; RAMSAY; RAMSAY, 2006; VALAPPIL et al., 2007; POSADA et al., 2011).

Para a digestão, podem ser utilizados compostos químicos ou também enzimas. A digestão química emprega os compostos para desfazer os lipídeos, carboidratos, proteínas e enzimas da célula original. Os agentes químicos utilizados são surfactantes, hipoclorito de sódio, quelatos e também combinações entre estes. A digestão enzimática utiliza enzimas que degradam a membrana celular e exercem mínimos efeitos de degradação do polímero (POSADA et al., 2011).

A separação mecânica tem sido extensivamente utilizada para a recuperação de compostos intracelulares. Alguns métodos utilizados são extração com moinho de bolas, homogeneização de alta pressão, extração por ultrassonicação e centrifugação (POSADA et al., 2011).

Ainda, há o método que se utiliza da fragilidade apresentada nas células de algumas bactérias após acúmulo de grandes quantidades de PHB para facilitar a extração. A etapa de purificação envolve tratamentos utilizando peróxido de hidrogênio combinado com a ação de enzimas ou de agentes quelantes (POSADA et al., 2011).

Sun et al. (2012) afirmam que os PHAs extraídos por métodos físicos apresentam uma distribuição mais ampla de massa molar do que os métodos químicos, porém, procedimentos químicos geram rendimentos maiores de PHAs do que os físicos. Entretanto, os reagentes químicos utilizados na extração podem contaminar os PHAs extraídos e influenciar suas propriedades bioquímicas.

O Quadro 2 apresenta alguns procedimentos utilizados para a extração de PHAs descritos na literatura. Segundo Jacquel et al. (2008), grande parte dos autores utiliza o método de extração por solventes, sendo este o processo mais antigo e consolidado.

Tipo de extração	Método	Referência
Por solvente	Lavagem com metanol e posterior extração em Soxhlet com acetona, precipitação em metanol	Jiang, Ramsay e Ramsay (2006)
Por solvente	Extração em Soxhlet com clorofórmio, precipitação em etanol	Gouda, Swellam e Omar (2001)
Por solvente	Lavagem com diclorometano e precipitação em metanol	Elain et al. (2016)
Por solvente	Rompimento com hipoclorito de sódio, extração com clorofórmio e evaporação do solvente	Ocampo-López, Colorado-Arias e Ramírez-Carmona (2015)
Digestão da biomassa residual	Rompimento de células com dodecilsulfato de sódio, lavagem com solução de hidróxido de sódio	Grothe, Moo-Young e Chisti (1999)

Quadro 2 - Procedimentos utilizados para extração de PHAs descritos na literatura

Fonte: adaptado de Grothe; Moo-Young; Chisti, 1999, Gouda; Swellam; Omar, 2001, Jiang; Ramsay; Ramsay, 2006, Ocampo-López; Colorado-Arias; Ramírez-Carmona, 2015, Elain et al., 2016

3.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O REFERENCIAL TEÓRICO

Verificou-se, por meio do referencial teórico, que o soro de leite, apesar de ser um subproduto obtido na fabricação do queijo, no Brasil ainda é percebido como um resíduo e desmedidamente disposto como tal, configurando um elevado desperdício de matéria-prima com alto valor nutritivo.

Observou-se que o PHB é um dos PHAs mais estudados, e que este possui propriedades semelhantes às de outros polímeros de uso amplamente difundido de origem petrolífera (tais como polipropileno e polietileno de baixa densidade), possibilitando sua aplicação em áreas distintas, com a vantagem da biodegradabilidade.

Ainda, constatou-se que a produção de PHAs pode se dar por meio de diversos microrganismos e fontes de carbono e nutrientes variadas, incluindo soro de leite, e consequentemente, lactose, permitindo a aplicação de subprodutos como o soro de leite para o cultivo de bactérias e produção de PHB.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, são descritos os materiais utilizados e métodos experimentais de produção de polímero, planejamentos experimentais e também métodos analíticos para a caracterização do polímero produzido e avaliação do crescimento bacteriano.

4.1 MATERIAL

As fontes de carbono utilizadas foram soro de leite, soro de leite após precipitação de proteínas, lactose extraída do mesmo por processo de separação por membranas (PSM) e lactose comercial. O soro de leite em pó foi adquirido da empresa Laticínios Renner S.A., localizada no município de Estação, RS (Brasil).

As bactérias foram conservadas em placas de Petri contendo ágar-ágar (15 g.L^{-1}), extrato de carne (3 g.L^{-1}), peptona (5 g.L^{-1}) e água destilada.

A bactéria *B. megaterium* CCT 2482 foi adquirida da Fundação André Tosello (Coleção de Culturas Tropical). A bactéria *A. latus* foi adquirida da Fundação Oswaldo Cruz, sendo a linhagem utilizada a número DSMZ 1123. Todos os reagentes utilizados e sua procedência encontram-se listados no Apêndice 1.

A composição do meio de cultivo foi definida por meio de pesquisa bibliográfica e foi então adaptada das utilizadas por Zafar et al. (2012) e de Faccin et al. (2013) e consta na Tabela 8.

Tabela 8 - Composição do meio de cultivo utilizado para os ensaios

Reagente	<i>Alcaligenes latus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
Lactose (g.L^{-1})	16	16
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g.L^{-1})	1	2
KH_2HPO_4 (g.L^{-1})	1,5	1,5
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (g.L^{-1})	3,6	0,9
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g.L^{-1})	1	0,2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (g.L^{-1})	0,01	0,01
Ácido cítrico anidro (g.L^{-1})	0,1	0,1
Solução de metais traço (mL.L^{-1})	3	1

Fonte: adaptado de Zafar et al., (2012) e Faccin et al. (2013)

A composição da solução de metais traço foi adaptada de Zafar et al. (2012) e de Faccin et al. (2013). A composição encontra-se apresentada na Tabela 9. Esta solução foi empregada para os meios utilizados no cultivo dos microrganismos, diferenciando-se apenas o volume adicionado para cada bactéria, como verificado na Tabela 9.

Tabela 9 - Composição da solução de metais traço utilizada para ambos os meios de cultivo

Reagente	Concentração (g.L ⁻¹)
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,20
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03
H ₃ BO ₄	0,30
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,20
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,03
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,03
NiSO ₄ .7H ₂ O	0,03

Fonte: adaptado de Zafar et al., (2012) e Faccin et al., (2013)

4.2 MÉTODOS

A Figura 6 apresenta um fluxograma das etapas realizadas neste trabalho. Os ensaios de determinação das condições iniciais, planejamento experimental e caracterização do polímero por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) foram realizados no Laboratório de Energia e Bioprocessos (LEBio - UCS). O ensaio realizado em biorreator de bancada para a avaliação da cinética bacteriana foi realizado no Laboratório de Bioprocessos (LBio - UCS).

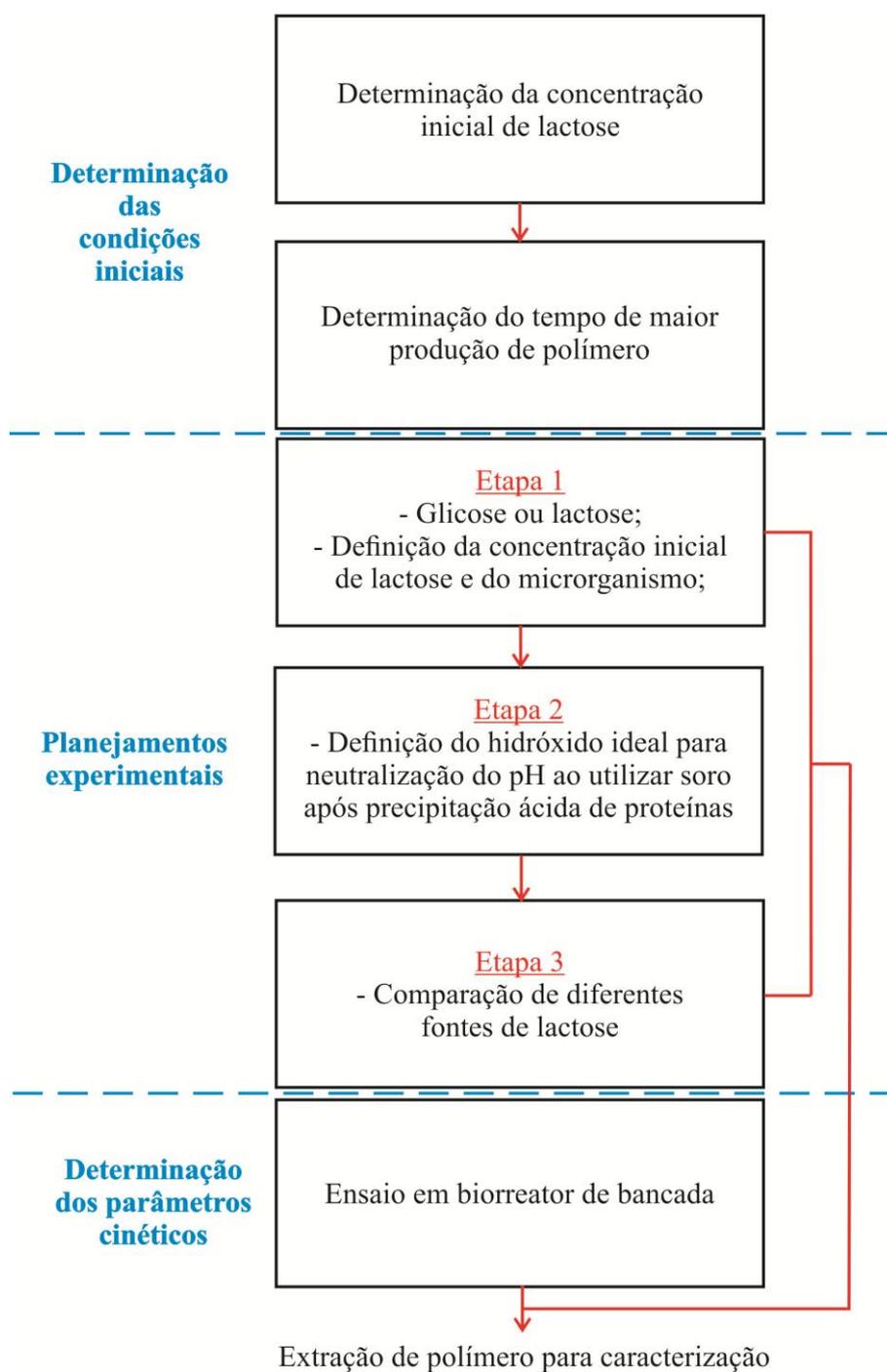


Figura 6 - Fluxograma das etapas realizadas no trabalho
Fonte: o autor.

O Quadro 3 apresenta todas as técnicas utilizadas no trabalho para a análise dos resultados obtidos.

Método	Aplicação
Quantificação de sólidos dissolvidos	Caracterização do soro de leite e dos meios de cultivo utilizados
Quantificação de açúcar redutor por DNS (método do ácido 3,5-dinitrosalicílico)	Caracterização do soro de leite e todos meios de cultivo utilizados
Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)	Caracterização do meio de cultivo utilizado no ensaio em biorreator de bancada
Quantificação de proteínas pelo método de Lowry	Caracterização do soro de leite, soro de leite após precipitação ácida de proteínas e neutralização
Quantificação de massa seca total	Avaliação de resultados no ensaio para determinação da concentração inicial de lactose
Quantificação da concentração de células secas	Avaliação de resultados no ensaio para determinação do tempo total, planejamentos experimentais e ensaio em biorreator de bancada
Quantificação da concentração de polímero	
Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	
Termogravimetria (TG)	Caracterização do polímero extraído
Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	

Quadro 3 - Métodos utilizados no trabalho

4.2.1 Preparação dos inóculos

Para a inoculação das amostras foram preparados pré-inóculos utilizando o mesmo meio de cultivo empregado nos ensaios. Em um frasco Erlenmeyer (volume total de 500 mL), contendo 200 mL de meio, adicionou-se uma alçada da cultura desejada. Acondicionou-se então em agitador orbital de bancada (MA832, Marconi, Brasil), à temperatura de 35 °C e frequência do agitador de 200 rpm por 24 horas.

Com o objetivo de manter padronizada a massa de células inicial, mediu-se a densidade ótica (DO) do pré-inóculo preparado em espectrofotômetro (SP 22 Biospectro, Brasil) utilizando o comprimento de onda de 600 nm e, quando necessário, as amostras foram diluídas até que a DO lida chegasse ao valor aproximado de 1. A proporção pré-inóculo/meio de cultivo utilizada para a inoculação foi de 10% v/v.

4.2.2 Determinação das condições iniciais para a produção de PHB

A fim de determinar o tempo de cultivo correspondente à maior concentração de polímero, foram realizados dois ensaios. Primeiramente, estimou-se a concentração ideal inicial de lactose nos meios de cultivo, com base no consumo de substrato (determinado por meio da análise de DNS - item 4.2.6.2) e massa seca total. Após, realizou-se um ensaio utilizando a concentração de lactose determinada retirando-se amostras com intervalos de tempo predeterminados, avaliando-se então o consumo de substrato, concentração de células secas e concentração de PHB.

A determinação da concentração inicial ideal de lactose deu-se por meio da realização de ensaios utilizando diferentes concentrações da fonte de carbono para ambas as bactérias. Esses ensaios foram realizados em duplicata em agitador orbital de bancada, utilizando frascos Erlenmeyer de 500 mL. Os parâmetros utilizados no ensaio estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Parâmetros utilizados para os ensaios de determinação da concentração inicial de lactose

Parâmetro	
Temperatura (°C)	35
Frequência do agitador (rpm)	200
Tempo (h)	24
Concentrações de lactose (g.L ⁻¹)	4, 8, 12, 16, 20 e 24
Volume de cultivo (mL)	200

Após a definição da melhor concentração inicial de lactose, realizou-se o ensaio em agitador orbital de bancada em que amostras destrutivas, em duplicata, foram retiradas com intervalos de 3 horas, até um tempo total de ensaio de 72 horas. Com exceção da concentração de lactose e tempo, os parâmetros utilizados foram os mesmos definidos para o ensaio anterior.

A partir das amostras retiradas, foram realizadas análises para determinação da concentração de lactose pelo método de DNS, concentração de células e concentração do polímero produzido por cromatografia gasosa.

4.2.3 Planejamentos experimentais

Após a definição da concentração inicial de lactose e a determinação do tempo de cultivo, foram realizados novos ensaios. A geração e análise dos planejamentos experimentais foi realizada utilizando o *software* Statistica 12.0 (StatSoft Inc., Estados Unidos), com o objetivo de definir e otimizar o processo de produção do PHB utilizando o soro de leite como substrato.

4.2.3.1 Etapa 1 - determinação da concentração inicial de substrato e microrganismo

A primeira etapa dos ensaios realizados com planejamento experimental teve como objetivo definir qual das bactérias possui melhor desempenho na produção de PHB e a concentração inicial de lactose a ser utilizada. A concentração da fonte de carbono foi novamente testada a fim de ter-se maior confiança no resultado obtido anteriormente, para o qual não foi realizada análise estatística dos valores obtidos.

Ainda, esta etapa permitiu a comparação do rendimento obtido utilizando glicose ou lactose como fontes de carbono.

Um planejamento fatorial 2^3 sem ponto central foi utilizado (três níveis com dois fatores qualitativos cada). Foram realizados vinte e quatro ensaios. Considerando-se que o agitador rotatório de bancada utilizado contém espaço para apenas doze amostras, realizou-se uma blocagem no *software* estatístico, a fim de distribuir o erro presente de modo aleatório nas duas bateladas do ensaio.

A Tabela 11 apresenta os fatores utilizados no ensaio. Os fatores controláveis a níveis fixos utilizados no ensaio foram as bactérias *A. latus* ou *B. megaterium*, glicose ou lactose como fonte de carbono e concentração de substrato de 16 ou 20 g.L⁻¹.

Tabela 11 - Fatores da Etapa 1 - determinação da concentração inicial de substrato e microrganismo - dos ensaios com planejamento experimental

Parâmetro	
Temperatura (°C)	35
Frequência do agitador (rpm)	200
Tempo (h)	12
Volume de cultivo (mL)	200
Número de repetições	triplicata
Bactéria	<i>Alcaligenes latus</i> ou <i>Bacillus megaterium</i>
Fonte de carbono	glicose ou lactose
Concentração da fonte de carbono (g.L ⁻¹)	16 ou 20

A Tabela 12 apresenta os níveis alto e baixo de cada fator controlado a níveis fixos na Etapa 1 dos ensaios com planejamento experimental.

Tabela 12 - Níveis alto e baixo de cada fator na Etapa 1 - determinação da concentração inicial de substrato e microrganismo - dos ensaios com planejamento experimental

Fator	Nível alto (+1)	Nível baixo (-1)
Bactéria	<i>Alcaligenes latus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
Fonte de carbono	glicose	lactose
Concentração	20 g.L ⁻¹	16 g.L ⁻¹

As variáveis resposta avaliadas foram o consumo de substrato (g.L^{-1}), concentração de células (g.L^{-1}) e concentração de polímero (g.L^{-1}).

4.2.3.2 Etapa 2 - neutralização do pH do soro de leite após a precipitação das proteínas

A segunda etapa dos ensaios com planejamento experimental contemplou a utilização de diferentes reagentes para a neutralização do pH do meio de cultivo preparado com soro de leite, que passou pelo processo de precipitação das proteínas com ácido cítrico.

Visando utilizar diretamente o soro de leite como substrato para a produção de polímero, efetuou-se a precipitação das proteínas do soro de leite para a realização de testes. Este tratamento foi executado devido ao fato de que, como citado no referencial teórico (Tabela 2), ao proceder-se a autoclavagem (autoclave vertical CS, Primatec, Brasil) de meio de cultivo preparado com soro de leite, ocorre a precipitação de proteínas, o que dificulta a separação das células bacterianas por meio da centrifugação.

Preparou-se uma solução de soro de leite a 12% m/v. A precipitação das proteínas foi realizada utilizando uma solução de ácido cítrico 40%, reduzindo o pH do meio até aproximadamente 3,3 (para cada 50 mL de soro de leite 12% utilizou-se em torno de 4 mL da solução de ácido), procedendo-se então a centrifugação a $3250 \times g$ e -4°C por 30 minutos. Apenas o líquido sobrenadante foi utilizado para a produção dos meios de cultivo.

O meio de cultivo foi produzido com uma solução do sobrenadante (obtido a partir da precipitação das proteínas do soro de leite) diluída até concentração de lactose aproximada de 16 g.L^{-1} , 3 mL.L^{-1} de solução mineral (composição indicada na Tabela 9) e um dos hidróxidos para a neutralização do pH.

Os hidróxidos utilizados foram NaOH 10% m/v, KOH 10% m/v e NH_4OH 10% m/v. No processo de neutralização, para cada 100 mL de soro precipitado com pH 3,3, foram utilizados aproximadamente 8,3 mL de solução de hidróxido de sódio, 9,5 mL de solução de hidróxido de potássio, e 4 mL de solução de hidróxido de amônio.

A Tabela 13 apresenta os fatores mantidos constantes neste ensaio.

Tabela 13 - Fatores mantidos constantes na Etapa 2 dos ensaios com planejamento experimental

Parâmetro	
Temperatura (°C)	35
Frequência do agitador (rpm)	200
Tempo (h)	12
Volume de cultivo (mL)	200
Número de repetições	quadruplicata
Bactéria	<i>A. latus</i>
Fonte de carbono	lactose
Concentração da fonte de carbono (g.L ⁻¹)	16
pH inicial	6,5

Neste planejamento, realizou-se a análise de variância (*ANOVA ONE WAY* - um fator a vários níveis). Assim como na Etapa 2, as variáveis resposta avaliadas foram o consumo de substrato (g.L⁻¹), concentração de células secas (g.L⁻¹) e concentração de PHB (g.L⁻¹).

4.2.3.3 Etapa 3 - definição do meio com melhores resultados

A terceira etapa dos ensaios com planejamento experimental teve como objetivo comparar o desempenho dos meios apresentados no Quadro 4. Para fins de simplificação, foram designadas siglas correspondentes a cada meio utilizado, que também constam no mesmo quadro.

Codificação	Composição
LA	Lactose (16 g.L ⁻¹), solução de metais traço (3 mL.L ⁻¹)
LPSM	Solução de lactose extraída por processos de separação por membranas* diluída à concentração de lactose de 16 g.L ⁻¹ , solução de metais traço (3 mL.L ⁻¹)
SPPN	Solução de soro após precipitação ácida de proteínas diluída à concentração de lactose de 16 g.L ⁻¹ , solução de metais traço (3 mL.L ⁻¹)
SA	Soro de leite diluído à concentração de lactose de 16 g.L ⁻¹ , solução de metais traço (3 mL.L ⁻¹)

Quadro 4 - Codificação e composição dos meios testados na Etapa 3 dos ensaios com planejamento experimental

Nota: * no PSM utilizou-se membrana de polietersulfona de ultrafiltração (UF) (modelo 6001 - Kock membrane systems, espiral, massa molar de corte de 10 kDa, área de 0,28 m²). A pressão transmembrana foi mantida em 2 bar, vazão da corrente de alimentação do soro de leite de aproximadamente 840 L.h⁻¹, temperatura do soro de leite constante em 50 °C, processo operado em modo semi-batelada com escoamento tangencial. Processo realizado de acordo com a metodologia de Baldasso, Barros e Tessaro (2011).

A Tabela 14 apresenta os fatores mantidos constantes no ensaio. Os resultados de consumo de substrato (g.L⁻¹), concentração de células (g.L⁻¹) e concentração de polímero (g.L⁻¹) foram avaliados por meio de uma análise de variância (*ANOVA ONE WAY* - um fator a vários níveis).

Tabela 14 - Fatores mantidos constantes na Etapa 3 dos ensaios com planejamento experimental

Parâmetro	
Temperatura (°C)	35
Frequência do agitador (rpm)	200
Tempo (h)	12
Volume de cultivo (mL)	200
Número de repetições	triplicata
Bactéria	<i>A. latus</i>
pH inicial	6,5

4.2.4 Avaliação da produção de PHB em biorreator de bancada

A fim de determinar os parâmetros cinéticos da bactéria *A. latus* utilizando lactose como fonte de carbono e, também, a cinética de produção de polímero, realizou-se um ensaio em biorreator de bancada (TecBio 7,5, Tecnal, Brasil). A Figura 7 apresenta uma esquematização do biorreator utilizado para a realização do experimento.

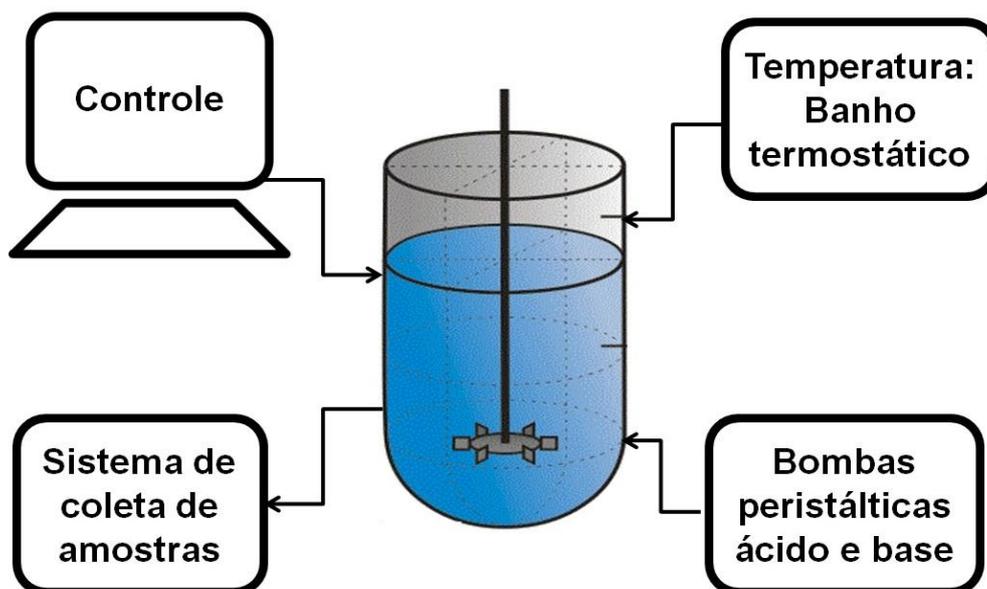


Figura 7 - Esquematização do biorreator de bancada utilizado para o experimento de produção de PHB empregando *Alcaligenes latus*

O meio de cultivo utilizado foi o definido como de melhor desempenho na Etapa 3 do planejamento experimental, sendo este o meio SPPN. Os parâmetros utilizados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Parâmetros utilizados nos ensaios realizados em biorreator de bancada

Parâmetro	Valor
Temperatura (°C)	35
Frequência do agitador (rpm)	Modificados durante o ensaio
Vazão de ar (L.min ⁻¹)	
Volume total do cultivo (L)	4,0
Volume de inóculo (mL)	400
pH	6,5
Tempo (h)	12

O pH foi controlado automaticamente em 6,5 com soluções de ácido clorídrico (5 mol.L^{-1}) e hidróxido de sódio (2 mol.L^{-1}). Frequência do agitador e vazão de ar foram sendo alteradas para valores mais elevados durante o cultivo buscando manter a concentração de oxigênio dissolvido acima de 30% (concentração de oxigênio dissolvido crítica para o crescimento de microrganismos aeróbios). Os gráficos de pH, frequência do agitador, vazão de ar, temperatura e concentração de oxigênio encontram-se no Apêndice B. Aproximadamente dez gotas de antiespumante foram adicionadas ao meio de cultivo antes do processo de autoclavagem. Amostras para a determinação da concentração de massa seca e lactose foram retiradas com intervalos de uma hora, enquanto que para a preparação de amostras de cromatografia foram retiradas alíquotas de 50 mL com intervalos de duas horas.

Para a determinação dos parâmetros cinéticos da bactéria *A. latus* ao utilizar como substrato a lactose proveniente do sobrenadante obtido na precipitação das proteínas do soro de leite na produção de PHB, foi necessário o levantamento das curvas de concentração de substrato pelo tempo ($S \times t$), concentração de células pelo tempo ($X \times t$) e concentração de produto pelo tempo ($P \times t$). Ainda, foram calculados o rendimento em células ($Y_{X/S}$), rendimento em produto ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica (p) e as velocidades específicas de crescimento (μ_X), consumo de substrato (μ_S), e formação de produto (μ_P).

A Equação (1) apresenta o cálculo do rendimento em células.

$$Y_{X/S} = \frac{M_{Xf} - M_{X0}}{M_{S,cons}} \quad (1)$$

Sendo $Y_{X/S}$ o fator de rendimento em células (g.g^{-1}), M_{Xf} a massa celular final (g), M_{X0} a massa celular inicial (g) e $M_{S,cons}$ a massa de substrato consumido no processo.

A Equação (2) apresenta o cálculo do rendimento em produto.

$$Y_{P/S} = \frac{M_{Pf} - M_{P0}}{M_{S,cons}} \quad (2)$$

Sendo $Y_{P/S}$ o fator de rendimento em produto (g.g^{-1}), M_{Pf} é massa final de produto (g) e M_{P0} a massa inicial de produto (g).

Levando-se em conta que não houve variação considerável no volume de cultivo, tornou-se possível o cálculo da produtividade volumétrica, Equação (3).

$$p = \frac{P_f - P_0}{t} \quad (3)$$

Sendo p a produtividade volumétrica ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), P_f a concentração final de produto (g.L^{-1}), P_0 a concentração inicial de produto (g.L^{-1}) e t o tempo de processo (h).

Por meio da Equação (4) foram calculadas as velocidades específicas de crescimento.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt} \quad (4)$$

Sendo μ_x a velocidade específica de crescimento (h^{-1}) e X a concentração de células (g.L^{-1}).

As velocidades específicas de consumo de substrato foram calculadas por meio da Equação (5).

$$\mu_s = -\frac{1}{X} \times \frac{dS}{dt} \quad (5)$$

Sendo μ_s a velocidade específica de consumo de substrato ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e S a concentração de substrato (g.L^{-1}).

As velocidades específicas de formação de produto foram calculadas por meio da Equação (6).

$$\mu_p = \frac{1}{X} \times \frac{dP}{dt} \quad (6)$$

Sendo μ_p a velocidade específica de formação de produto ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e P a concentração de produto (g.L^{-1}).

4.2.5 Extração do polímero produzido

A extração do polímero deu-se por meio de uma adaptação do método patenteado de Baptist (1962). Adicionou-se cerca de 50 mL de acetona pura a aproximadamente 2 g de massa de células centrifugadas (centrífuga refrigerada NT825, Novatecnica, Brasil) e lavadas ainda úmidas. Após 30 minutos, a mistura foi filtrada (filtração simples) e adicionou-se novamente acetona às células, que permaneceu por 24 horas. Procedeu-se então nova filtração das células e adição de 15 mL de solução de diclorometano-etanol 5:1 (v/v). As amostras foram então acondicionadas em agitador orbital de bancada por 1 hora 35 °C e frequência do agitador orbital de 200 rpm. Filtrou-se novamente a mistura e ao filtrado foram adicionados 50 mL de éter etílico. O polímero foi obtido por meio da evaporação natural dos solventes adicionados.

4.2.6 Métodos Analíticos

4.2.6.1 *Quantificação de sólidos dissolvidos*

A determinação da concentração de sólidos dissolvidos totais, voláteis e fixos foi realizada de acordo com uma adaptação da norma ABNT NBR 14550 (ABNT, 2000). Primeiramente, preparou-se areia tratada por meio de fervura com ácido nítrico e posterior colocação em mufla (1963, Fornitec, Brasil) a 700 °C. 20 g da areia foram adicionados a cadinhos previamente tarados em mufla. O conjunto foi calcinado e a este foram adicionados 25 mL de cada amostra, procedendo-se secagem em estufa a 105 °C até estabilização da massa (sólidos dissolvidos totais - SDT). O cadinho com a massa seca foi então colocado em mufla a 600 °C por 2 horas, e a massa novamente registrada (sólidos dissolvidos fixos - SDF). A concentração de sólidos dissolvidos voláteis (SDV) foi obtida por meio da subtração da concentração de SDT menos SDF.

4.2.6.2 *Quantificação de açúcares*

A quantidade de lactose foi determinada por meio do método de Miller (1959) com a utilização do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A análise foi realizada adicionando 0,75 mL de reagente DNS a 0,25 mL de cada amostra previamente diluída. A mistura (amostra e DNS) foi então mantida em banho-maria a 100 °C por 5 minutos e

depois resfriada até temperatura ambiente ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4$). Após, 4 mL de água destilada foram adicionados e então procedeu-se a leitura da absorbância no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm. Para a realização da correspondência entre valores de absorbância obtidos e a concentração real de lactose elaborou-se uma curva de calibração com soluções de lactose de 0,2 a 1 g.L⁻¹ seguindo o mesmo procedimento utilizado para as amostras. Este ensaio foi realizado para a caracterização do soro de leite, soro de leite após precipitação ácida de proteínas (e também posterior à neutralização), solução de lactose extraída por PSM e também para determinar as concentrações iniciais e finais de lactose nos ensaios realizados.

Análises de cromatografia líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) foram realizadas em equipamento modelo 9100, Agilent Technologies, Estados Unidos, no LBio da UCS no meio de cultivo SPPN antes e após o processo de autoclavagem para comparação com os resultados obtidos pelo método de DNS. A coluna utilizada foi Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm, 9 μm), com fase móvel de H₂SO₄ 0,05 mM, previamente filtrada (filtro de poliamida, 0,2 μm). Realizou-se o carregamento das amostras no volume do loop de injeção (5 μL) e sua eluição a 0,4 mL.min⁻¹, a 60 °C.

4.2.6.3 *Quantificação de proteínas*

A quantificação das proteínas deu-se por meio do método de Lowry (1951), que consiste na interação das proteínas com um reagente fenólico e cobre em condições alcalinas. Este método foi utilizado para caracterizar o soro de leite antes e após a precipitação ácida de proteínas e também a solução de lactose obtida por meio de processos de separação por membranas. A 1 mL de amostra previamente diluída foram adicionados 5 mL de um reagente de sulfato de cobre e após agitação, a mistura foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionou-se então 0,5 mL do reagente *Folin Ciocalteu* diluído, novamente manteve-se a mistura a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Após, procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 750 nm. Para isto foi necessária a elaboração de uma curva de calibração com concentrações de 0,1 a 0,5 g.L⁻¹ de albumina sérica bovina (BSA) seguindo o mesmo procedimento utilizado para as amostras.

4.2.6.4 *Quantificação da concentração de células secas*

A concentração de células secas foi determinada pelo método gravimétrico. Alíquotas de 10 mL do cultivo foram colocadas em falcons de 15 mL, centrifugadas a $3250 \times g$ e $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos, então, foi retirada a solução sobrenadante e adicionada água destilada para a realização da lavagem das células, posteriormente realizou-se nova centrifugação por 30 minutos e procedeu-se a secagem em estufa (84CBE, De Leo, Brasil) a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ até massa constante. O processo de secagem levou em torno de 96 horas e o valor da massa seca foi monitorado utilizando balança analítica (AUY220, Shimadzu, Japão).

Após a quantificação do polímero extraído, subtraiu-se o valor da concentração de polímero da concentração de massa seca total obtida anteriormente, determinando assim a concentração de células secas.

4.2.6.5 *Quantificação da concentração de PHB produzido*

A quantificação do polímero obtido deu-se por cromatografia gasosa. O primeiro estágio foi a realização de propanólise do PHB, utilizando dicloroetano, n-propanol, ácido clorídrico e ácido benzóico. A mistura foi então colocada em agitador orbital de bancada a $70 \text{ }^\circ\text{C}$, com frequência do agitador constante, a 200 rpm, por 4 horas. Após o resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 4 mL de água DI e procedeu-se vigorosa agitação por 30 segundos. Após 1 hora de decantação, coletou-se a fase orgânica líquida resultante (fase inferior), injetando-a no cromatógrafo gasoso (Master GC, Dani, Itália), com detector de ionização de chama (FID) utilizando a metodologia de Riis e Mai (1988).

A coluna capilar utilizada é do modelo Agilent DB-WAX com comprimento de 30 m e filme de 0,25 mm de espessura com espessura de filme de $0,25 \text{ }\mu\text{m}$. Hélio (He) foi o gás de arraste utilizado. Os parâmetros utilizados encontram-se listados na Tabela 16.

Tabela 16 - Parâmetros utilizados para a cromatografia gasosa no equipamento modelo Master GC, marca Dani

Parâmetro	
Isoterma (°C)	180
Fluxo de gás hélio (mL.min ⁻¹)	6
Taxa de diluição	1:50
Volume de injeção (µL)	1
Temperatura do injetor (°C)	260
Temperatura do detector (°C)	250

Para o cálculo da concentração de PHB, foram preparadas amostras com concentrações conhecidas de PHB padrão. Os valores foram determinados baseados na realização da divisão da área do pico correspondente ao éster propílico do ácido hidroxibutírico pela área do pico correspondente ao éster propílico do ácido benzóico (padrão interno) (RIIS; MAI, 1988).

4.2.6.6 Análise de propriedades térmicas

Os ensaios de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) foram realizados em instrumento de análise térmica simultânea (*Simultaneous Thermal Analysis Instrument* - STA, modelo Jupiter 449, Netzsch, Alemanha). Dentro das possibilidades do equipamento utilizado, os parâmetros utilizados para os ensaios foram determinados de acordo com os utilizados por Arrieta et al. (2014). A taxa de aquecimento utilizada foi de 10 °C.min⁻¹, da temperatura ambiente até a temperatura de 600 °C com fluxo de N₂ de 50 mL.min⁻¹, utilizando 10 mg de amostra seca em estufa a 60 °C por 5 horas.

Levando em conta que o equipamento realiza as análises de DSC e TG de modo concomitante, os dados da curva DSC foram obtidos com a mesma amostra, considerando que a taxa de aquecimento utilizada na termogravimetria também é a mesma utilizada por outros autores na análise de DSC (WELLEN et al., 2013; KURUSU et al., 2015; REDDY et al., 2015).

O grau de cristalinidade foi calculado por meio da Equação (7), a partir do calor de fusão obtido para o polímero extraído e do valor da entalpia teórica de PHB com 100% de cristalinidade, que de acordo com Barham et al. (1984) é 146 J.g⁻¹.

$$\chi = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_0} \times 100\% \quad (7)$$

Sendo χ a cristalinidade (%), ΔH_m o calor de fusão experimental (J.g^{-1}) e ΔH_0 o valor da entalpia teórica do PHB (J.g^{-1}).

4.2.6.7 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os ensaios de FTIR foram realizados segundo os parâmetros indicados por Furukawa et al. (2007), Arrieta et al. (2014) e Domínguez-Díaz et al. (2015), por meio de refletância total atenuada (ATR) em equipamento marca Thermo Scientific (Estados Unidos), modelo Nicolet™ iS™ 10, no Laboratório de Polímeros (LPOL) da UCS, com número de onda de 500 a 4000 cm^{-1} e resolução de 1 cm^{-1} .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO

Na Tabela 17, são apresentados os resultados obtidos na caracterização do soro de leite 6,5 % m/v, que é a concentração aproximada de sólidos contida no soro de leite geralmente obtido diretamente na produção do queijo. Os resultados obtidos estão de acordo com valores da literatura (BYLUND, 1995; LUCENA et al., 2007; BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011).

Tabela 17 - Caracterização do soro de leite utilizado neste estudo em comparação a outros resultados obtidos da literatura

Parâmetro	Resultado (o autor)	Bylund (1995)	Lucena et al. (2007)	Baldasso; Barros; Tessaro (2011)
pH	6,2	N.i.	6,2	6,3
Concentração de lactose (g.L ⁻¹)	44,2	48,0	49,0	42,0
Concentração de proteínas (g.L ⁻¹)	9,7	5,5	6,2	9,0
Sólidos dissolvidos totais (g.L ⁻¹)	54,0	N.i.	62,0	60,0
Sólidos dissolvidos voláteis (g.L ⁻¹)	51,7	N.i.	N.i.	52,0
Sólidos dissolvidos fixos (g.L ⁻¹)	2,3	8,0	N.i.	7,0
Condutividade elétrica (mS.cm ⁻¹)	2,6	N.i.	N.i.	6,2

Fonte: adaptado de Bylund, 1995; Lucena et al., 2007; Baldasso; Barros; Tessaro, 2011.

Nota: N.i. não informado pelo autor.

Foram observadas diferenças nos resultados de sólidos dissolvidos fixos e conseqüentemente na condutividade elétrica. Alterações nestes valores podem ocorrer de acordo com a procedência do soro de leite utilizado, que varia de acordo com a época e processo de produção do queijo, e também com a qualidade do mesmo.

A Tabela 18 apresenta os resultados obtidos para a caracterização do sobrenadante obtido após o processo de precipitação ácida de proteínas do soro de leite e neutralização com hidróxido de amônio e da lactose extraída por processos de separação por membranas.

Tabela 18 - Caracterização do soro de leite após o processo de precipitação ácida de proteínas e neutralização com hidróxido e amônio e da lactose extraída por processos de separação por membranas

Parâmetro	Soro após precipitação ácida de proteínas*	Soro após precipitação ácida de proteínas e neutralização com NH₄OH*	Lactose extraída por processos de separação por membranas
pH	3,3	6,5	7,9
Concentração de lactose (g.L ⁻¹)	87,7	86,1	62,7
Concentração de proteínas (g.L ⁻¹)	12,06	12,20	0,18
Sólidos dissolvidos totais (g.L ⁻¹)	113,7	98,2	53,2
Sólidos dissolvidos voláteis (g.L ⁻¹)	108,9	94,8	53,0
Sólidos dissolvidos fixos (g.L ⁻¹)	4,8	4,0	0,13
Condutividade elétrica (mS.cm ⁻¹)	4,95	14,98	0,15

Nota: * Sobrenadante obtido após precipitação ácida de proteínas do soro de leite

Para o sobrenadante, após precipitação ácida de proteínas do soro de leite (e após neutralização com hidróxido de amônio), foram observadas concentrações de lactose e de sólidos dissolvidos totais, voláteis e fixos maiores, devido ao fato de que a concentração do soro de leite utilizada para este processo foi de 12% m/v, tornando os resultados aproximadamente duas vezes maiores. Como esperado, observou-se uma redução na concentração de proteínas, causada pelo processo de precipitação realizado.

Na solução de lactose extraída por PSM observou-se elevada concentração de lactose e reduzida concentração de proteínas, atestando a eficácia do processo aplicado. A reduzida quantidade de sólidos dissolvidos fixos e também a baixa condutividade elétrica podem indicar que esta solução possui baixa quantidade de sais.

Realizaram-se análises de HPLC e DNS para uma amostra de meio de cultivo preparado com o sobrenadante obtido após a precipitação ácida de proteínas do soro de leite neutralizado com hidróxido de amônio. De acordo com a análise de DNS a amostra enviada para análise possuía $8,0 \text{ g.L}^{-1}$, e de acordo com a análise de HPLC esta amostra apresentou concentração de lactose de $7,98 \text{ g.L}^{-1}$. Dado que não houve qualquer diferença entre os valores obtidos, utilizou-se a análise de DNS para as quantificações de lactose.

5.2 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES INICIAIS PARA A PRODUÇÃO DE PHB

Com o objetivo de estimar a concentração de lactose inicial para a realização de ensaios de determinação do tempo de cultivo, realizou-se este ensaio conforme a metodologia descrita no item 4.2.2. A Tabela 19 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 19 - Consumo de lactose e massa seca produzida no ensaio de determinação da concentração inicial de lactose com as bactérias *Alcaligenes latus* e *Bacillus megaterium*

Concentração inicial de lactose (g.L ⁻¹)	<i>Alcaligenes latus</i>		<i>Bacillus megaterium</i>	
	Lactose consumida (g.L ⁻¹)*	Concentração de massa seca (g.L ⁻¹)*	Lactose consumida (g.L ⁻¹)*	Concentração de massa seca (g.L ⁻¹)*
4	2,94	1,29	0,48	0,26
8	3,39	1,24	0,60	0,35
12	3,24	1,35	0,71	0,21
16	4,93	1,32	1,97	0,53
20	6,08	1,47	0,62	0,41
24	5,80	1,42	0,79	0,44

Nota: * Resultado obtido em 24 horas de cultivo

Verificou-se que para a bactéria *A. latus*, a concentração inicial de 20 g.L⁻¹ proporcionou o maior consumo de substrato e, também, o maior valor de massa seca. Para a bactéria *B. megaterium*, a concentração inicial que propiciou maior consumo de substrato e concentração de massa seca foi 16 g.L⁻¹ de lactose. Concentrações maiores de substrato proporcionariam consumo de lactose e concentração de massa seca mais elevados. Porém, concentrações mais elevadas podem ocasionar inibição por substrato, prejudicando o desempenho bacteriano. Reddy et al. (2016), em experimentos com produção de PHAs utilizando a bactéria *Hydrogenophaga palleronii*, identificou que concentrações mais elevadas de substrato, resultaram em menores consumos, e ainda, que, no caso de seus experimentos, a mais alta concentração de polímero foi obtida com concentrações de substrato de 20 g.L⁻¹ de efluente líquido sintético (ácidos graxos voláteis).

Após a determinação da concentração de lactose inicial, determinou-se o tempo em que ocorre a maior produção de PHB, o produto de interesse. A Figura 8 apresenta as curvas obtidas para a bactéria *A. latus*.

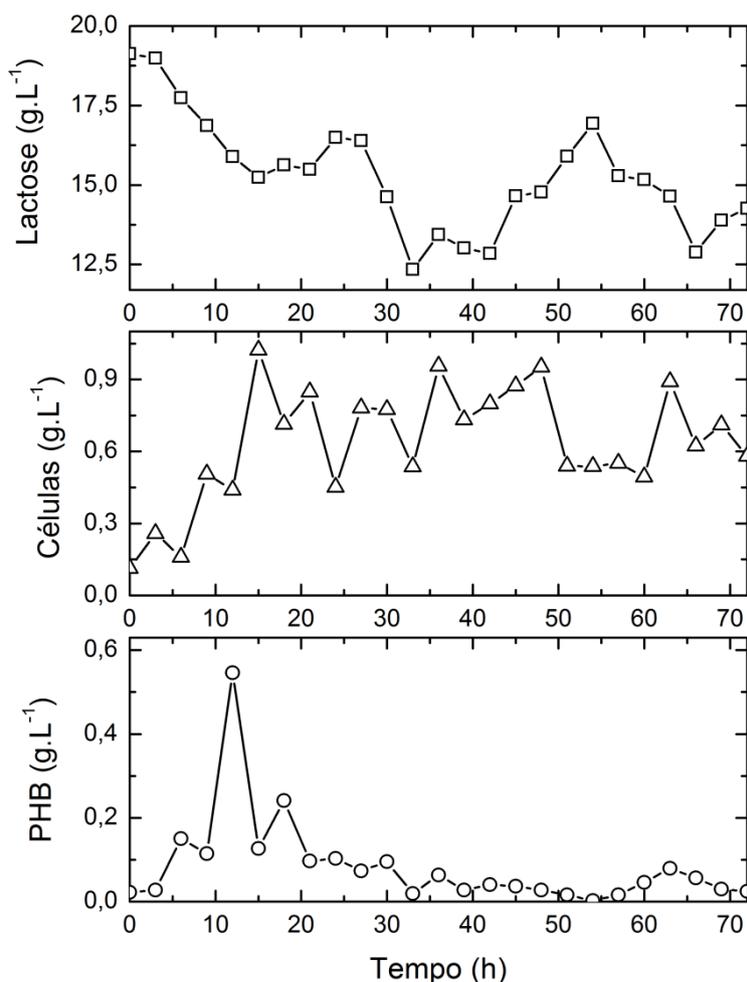


Figura 8 - Concentração de lactose, PHB e células em função do tempo no ensaio com a bactéria *Alcaligenes latus*

Verificou-se que, após um período inicial de aproximadamente 15 horas, as concentrações de células secas e de PHB seguiram tendências constantes. Wang et al. (2013), em seus estudos com sacarose, também observaram que esta bactéria atinge um estágio estacionário de crescimento em aproximadamente 16 horas.

Ainda, observou-se que a concentração de lactose sofreu redução máxima para $12,3 \text{ g.L}^{-1}$ em 33 horas. Atribuiu-se a ressaltada variação nas concentrações de lactose ao fato de que todas as amostras utilizadas para cada ponto da curva foram destrutivas, aumentando a possibilidade de erros associados à concentração de lactose no meio e concentração de células inoculadas a cada repetição, por exemplo.

No ponto correspondente a 12 horas de ensaio, verificou-se a maior concentração de PHB obtida, $0,55 \text{ g.L}^{-1}$. Assim, a partir deste ensaio, definiu-se como 12 horas o tempo de cultivo ideal para a produção de PHB nas condições testadas.

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos para a bactéria *B. megaterium*.

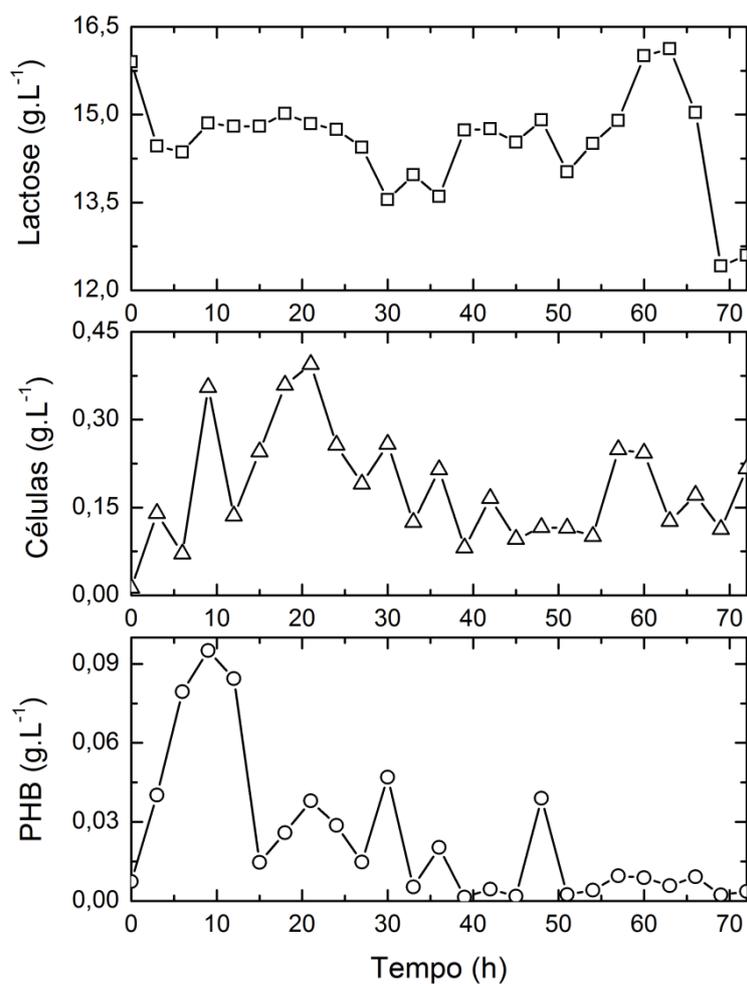


Figura 9 - Concentração de lactose, PHB e células em função do tempo no ensaio com a bactéria *Bacillus megaterium*

De modo semelhante à bactéria *A. latus*, verificou-se que após as 18 horas iniciais, as concentrações de células secas e de PHB seguem tendência constante. A mínima concentração de lactose obtida foi $12,4 \text{ g.L}^{-1}$. Assim como anteriormente, observaram-se elevadas variações nas concentrações de lactose, também atribuídas aos fatores previamente discutidos. No ponto correspondente a 9 horas de ensaio observou-se a maior concentração de PHB obtida, $0,095 \text{ g.L}^{-1}$. Considerando o erro associado à quantificação de PHB, o tempo ideal para a produção de PHB foi considerado de 12 horas também para esta bactéria.

5.3 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS

5.3.1 Etapa 1 - determinação da concentração inicial de substrato e microrganismo

A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos na Etapa 1 dos ensaios com planejamento experimental.

Tabela 20 - Resultados de consumo de substrato, concentração de células secas e de PHB obtidos para a Etapa 1 - determinação da concentração inicial de substrato e microrganismo - do planejamento experimental

Repetição	Bloco	Bactéria	Fonte de carbono	Concentração	Consumo de substrato (g.L ⁻¹)	Concentração de células secas (g.L ⁻¹)	Concentração de PHB (g.L ⁻¹)
1	1	-1	-1	+1	1,174	0,307	0,233
1	2	-1	-1	-1	2,213	0,296	0,415
1	2	+1	-1	+1	2,787	1,192	0,43
1	1	+1	-1	-1	4,485	1,426	0,934
1	2	-1	+1	+1	1,089	0,158	0,025
1	1	-1	+1	-1	0,908	0,157	0,048
1	1	+1	+1	+1	2,201	0,454	0,239
1	2	+1	+1	-1	3,875	0,170	0,087
2	1	-1	-1	+1	1,192	0,686	0,607
2	2	-1	-1	-1	2,034	0,280	0,137
2	2	+1	-1	+1	2,535	1,755	0,147
2	1	+1	-1	-1	3,982	1,370	0,450
2	2	-1	+1	+1	1,490	0,201	0,039
2	1	-1	+1	-1	1,626	0,278	0,072
2	1	+1	+1	+1	2,268	0,322	0,131
2	2	+1	+1	-1	2,782	0,302	0,060

Nota: Bactéria +1: *Alcaligenes latus*, -1: *Bacillus megaterium*; Fonte de carbono +1: glicose, -1: lactose; Concentração +1: 16 g.L⁻¹, -1: 20 g.L⁻¹

A Figura 10 apresenta o diagrama de Pareto para a variável resposta concentração de PHB. Verificou-se que, com relação a esta variável, apenas a fonte de carbono possui efeito significativo. O valor deste efeito é negativo, o que demonstra que a lactose (indicada como nível baixo do fator, ou seja, negativo) proporcionou maior concentração de PHB do que a glicose (nível alto, positivo).

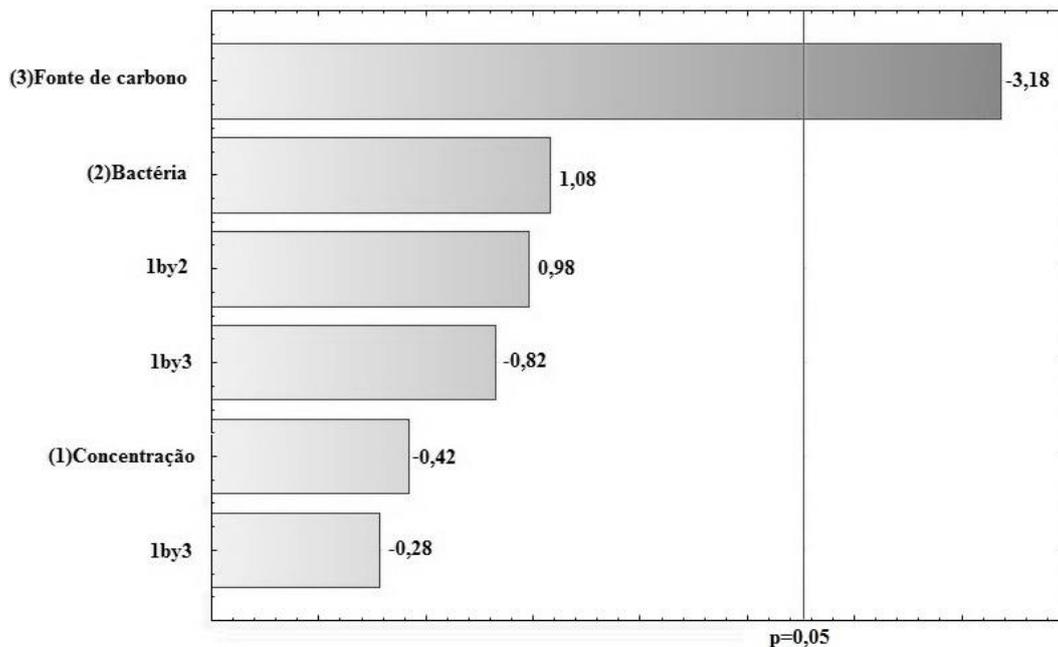


Figura 10 - Diagrama de Pareto para a concentração de PHB na Etapa 1

A Figura 11 apresenta o diagrama de Pareto para a variável resposta concentração de células secas. Verificou-se que neste caso a fonte de carbono, a bactéria e a interação entre estes dois fatores é significativa.

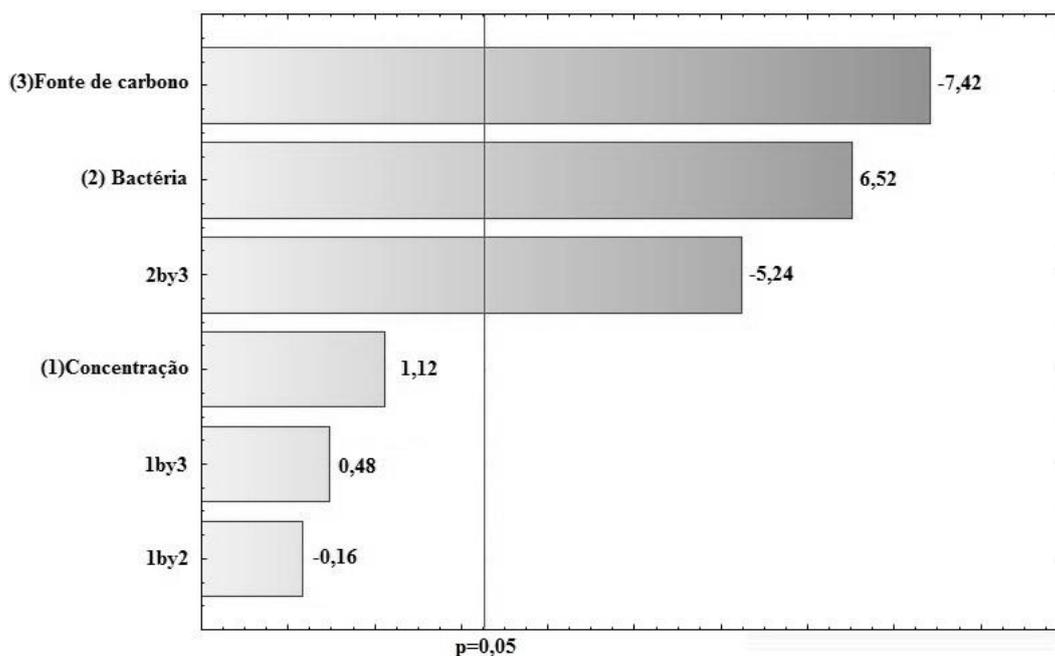


Figura 11 - Diagrama de Pareto para a concentração de células secas na Etapa 1

O valor negativo do efeito da fonte de carbono demonstra, assim como anteriormente, que o uso de lactose proporcionou melhores resultados do que a glicose. O valor positivo do efeito da bactéria demonstra que a *A. latus* (indicada como nível alto do fator, positivo) apresentou melhor desempenho do que a *B. megaterium* (nível baixo, negativo).

Baei et al. (2010) obtiveram, para *A. latus* DSMZ 1123, utilizando soro de leite hidrolisado em agitador orbital a 30 °C, 250 rpm e 72 horas de cultivo, concentrações máximas de PHB de 1,66 g.L⁻¹, valor superior ao obtido neste planejamento experimental. Isto pode ter ocorrido porque o soro de leite apresenta aminoácidos e proteínas que favorecem o crescimento bacteriano e, também, a produção de polímero. Destaca-se que o meio de cultivo utilizado nesta etapa não foi preparado com soro de leite, e sim com lactose comercial.

Pandian et al. (2010) para *B. megaterium* (linhagem denominada SRKP-3), utilizando resíduos de laticínios em agitador orbital de bancada a 37 °C e 220 rpm, obtiveram concentrações máximas de PHB de 11,32 g.L⁻¹, contrariando os resultados obtidos para esta bactéria neste planejamento experimental. Assim, verificou-se que é possível que o meio de cultivo utilizado não tenha sido o mais adequado para a maximização da concentração de polímero final, podendo inclusive haver ocorrido o esgotamento de algum nutriente essencial.

Verificou-se que para as variáveis resposta analisadas a concentração da fonte de carbono não apresentou efeito significativo. Assim, definiu-se que os ensaios seguintes seriam realizados utilizando como fonte de carbono a lactose, apenas a bactéria *A. latus* e ainda, a menor concentração da fonte de carbono, 16 g.L^{-1} .

5.3.2 Etapa 2 - neutralização do pH do soro de leite, após a precipitação das proteínas

A Figura 12 apresenta os valores obtidos para o consumo de lactose (g.L^{-1}) em 12 horas de ensaio e desvios padrão para cada hidróxido utilizado como neutralizador de pH. Foram observados valores e desvios semelhantes para todas as bases.

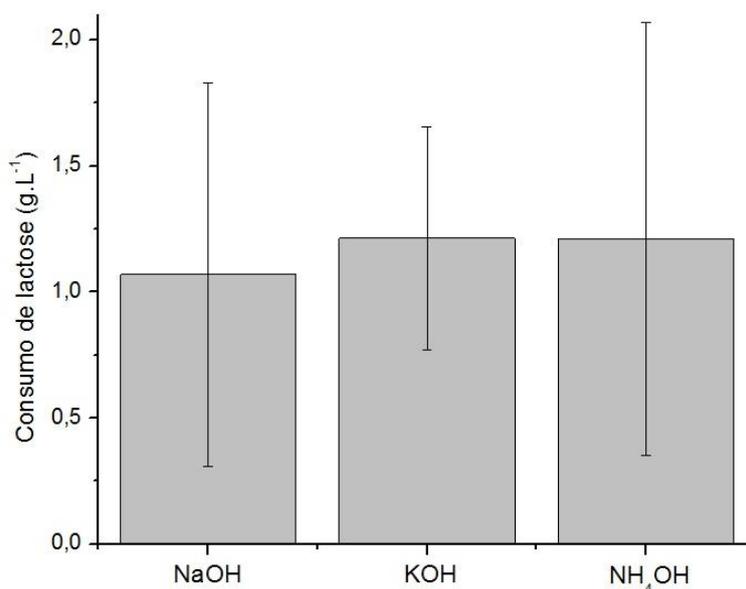


Figura 12 - Consumo de lactose pela bactéria *Alcaligenes latus* com a utilização de diferentes hidróxidos para a neutralização do pH do meio de cultivo preparado com o sobrenadante obtido após a precipitação ácida das proteínas do soro de leite

A Figura 13 apresenta os valores obtidos para a concentração de células secas (g.L^{-1}) em 12 horas de ensaio e desvios padrão para cada hidróxido testado. Observou-se aumento da concentração de células secas ao utilizar hidróxido de potássio ou amônio em comparação ao resultado obtido utilizando hidróxido de sódio.

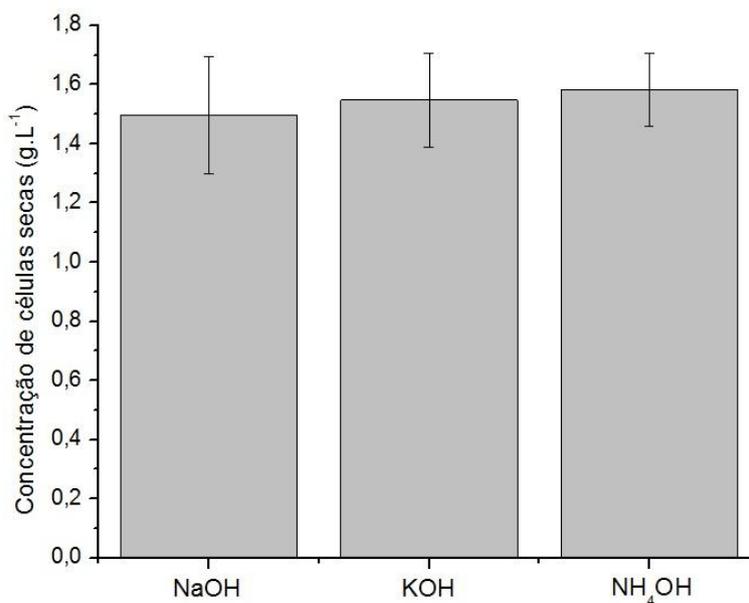


Figura 13 - Concentração de células secas da bactéria *Alcaligenes latus* com a utilização de diferentes hidróxidos para a neutralização de pH do meio de cultivo preparado com o sobrenadante obtido após a precipitação ácida das proteínas do soro de leite

A Figura 14 apresenta os valores obtidos para a concentração de PHB (g.L⁻¹) em 12 horas de ensaio e desvios padrão para cada hidróxido testado. Observou-se concentração de polímero superior quando utilizado o hidróxido de amônio, em comparação às outras duas bases.

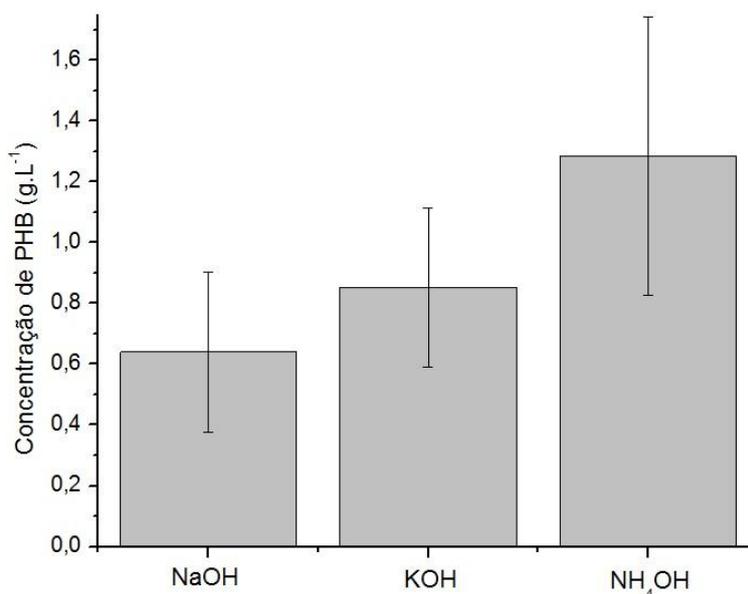


Figura 14 - Concentração de PHB da bactéria *Alcaligenes latus* com a utilização de diferentes hidróxidos para a neutralização de pH do meio de cultivo preparado com o sobrenadante obtido após a precipitação ácida das proteínas do soro de leite

A Tabela 21 apresenta o resultado (valor p) da análise de variância (ANOVA) para as variáveis resposta avaliadas.

Tabela 21 - Resultado da análise de variância (valor p) para as variáveis resposta avaliadas na Etapa 2 - neutralização do pH do soro de leite, após a precipitação das proteínas - do planejamento experimental

Variável resposta	Valor p
Consumo de lactose	0,805
Concentração de células secas	0,377
Concentração de PHB	$2,3 \cdot 10^{-5}$

Ao compararem-se os resultados para o consumo de lactose e concentração de células secas, verificou-se que nenhum fator apresentou influência significativa sobre os resultados obtidos (valor p menor do que 0,05). O Quadro 5 apresenta os resultados obtidos na comparação múltipla de médias de Duncan para cada fator para a variável resposta concentração de PHB, dado que neste caso os fatores apresentaram influência significativa sobre os resultados.

Agente de neutralização	NaOH	KOH	NH ₄ OH
NaOH		-	+
KOH	-		-
NH ₄ OH	+	+	

Quadro 5 - Resultados obtidos para a comparação múltipla de médias de Duncan para a variável resposta concentração de PHB na Etapa 2 do planejamento experimental

Notas: - Diferença não significativa;

+ Diferença significativa;

■ Mesmo fator.

Por meio da comparação múltipla de médias de Duncan, observou-se que houveram diferenças significativas entre os resultados obtidos quando se utilizou hidróxido de amônio e hidróxido de sódio ou potássio. Atribuiu-se este resultado ao fato de que o hidróxido de amônio aumenta o nitrogênio disponível para as bactérias, o que pode favorecer a produção de polímero.

A Tabela 22 apresenta os parâmetros calculados a partir dos resultados obtidos na Etapa 2 dos ensaios com planejamento experimental, ao final de 12 horas de cultivo.

Tabela 22 - Fator de rendimento em células e produto e produtividade volumétrica obtidos para a Etapa 2 - neutralização do pH do soro de leite, após a precipitação das proteínas - do planejamento experimental

Parâmetro	NaOH	KOH	NH ₄ OH
$Y_{X/S}$ (g·g ⁻¹)	1,43	1,28	1,25
$Y_{P/S}$ (g·g ⁻¹)	0,61	0,70	1,06
p (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,05	0,07	0,11

Notas: $Y_{X/S}$: Fator de rendimento em células;
 $Y_{P/S}$: Fator de rendimento em produto;
 p : Produtividade volumétrica.

Observou-se que os fatores de rendimento em células e produto e a produtividade volumétrica seguem as mesmas tendências que as concentrações de células e PHB, sendo mais elevadas para o meio neutralizado com hidróxido de amônio.

5.3.3 Etapa 3 - definição do meio com melhor desempenho

Com os resultados obtidos ao final de 12 horas de cultivo, realizou-se a análise de variância com o objetivo de verificar se os fatores foram significativos para cada variável de resposta. A Tabela 23 apresenta o resultado (valor p) obtido na análise de variância (ANOVA) para as variáveis resposta analisadas.

Tabela 23 - Resultado da análise de variância (valor p) para as variáveis resposta avaliadas na Etapa 3 - definição do meio com melhor desempenho - do planejamento experimental

Variável resposta	Valor p
Consumo de lactose	0,065
Concentração de células secas	0
Concentração de PHB	0

Observou-se que, com relação ao consumo de lactose, nenhum fator apresentou influência significativa (valor p maior do que 0,05), enquanto que com relação à concentração de células secas e concentração de PHB, os fatores apresentaram influência significativa (valor p menor do que 0,05).

A Figura 15 apresenta os valores obtidos para o consumo de lactose (g·L⁻¹) em 12 horas de ensaio e desvios padrão para cada meio de cultivo utilizado.

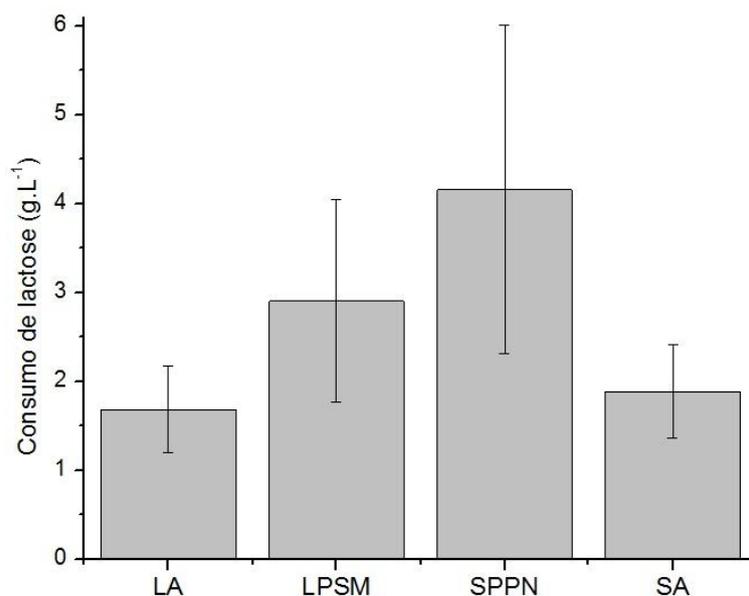


Figura 15 - Consumo de lactose pela bactéria *Alcaligenes latus* com a utilização de diferentes meios de cultivo

Notas: LA: lactose; LPSM: lactose extraída por processos de separação por membranas; SPPN: meio produzido com o sobrenadante obtido após precipitação ácida de proteínas do soro de leite neutralizado com hidróxido de amônio; SA: soro de leite.

A Figura 16 apresenta os valores obtidos para a concentração de células (g.L^{-1}) em 12 horas de ensaio e desvios padrão para cada meio de cultivo utilizado.

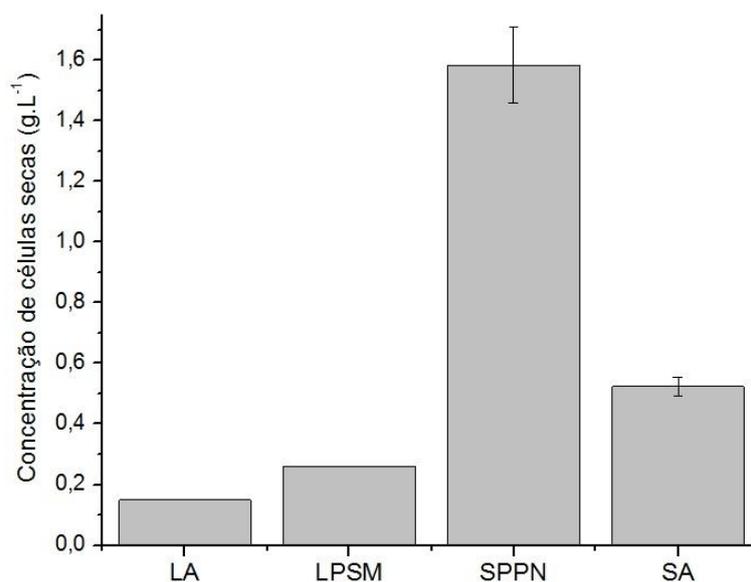


Figura 16 - Valores de concentração de células secas da bactéria *Alcaligenes latus* com a utilização de diferentes meios de cultivo

Notas: LA: lactose; LPSM: lactose extraída por processos de separação por membranas; SPPN: meio produzido com o sobrenadante obtido após precipitação ácida de proteínas do soro de leite neutralizado com hidróxido de amônio; SA: soro de leite.

O Quadro 6 apresenta os resultados obtidos na comparação múltipla de médias de Duncan para cada fator para a variável resposta concentração de células.

Meio de cultivo	LA	LPSM	SPPN	SA
LA		+	+	+
LPSM	+		+	+
SPPN	+	+		-
SA	+	+	-	

Quadro 6- Resultados obtidos para a comparação múltipla de médias de Duncan para a variável resposta concentração de células na Etapa 3 - definição do meio com melhor desempenho - do planejamento experimental

Notas: LA: lactose; LPSM: lactose extraída por processos de separação por membranas; SPPN: meio produzido com o sobrenadante obtido após precipitação ácida de proteínas do soro de leite neutralizado com hidróxido de amônio; SA: soro de leite;

- Diferença não significativa;

+ Diferença significativa;

■ Mesmo fator.

Verificou-se que os meios de cultivo LA e LPSM apresentaram concentrações de células secas significativamente menores do que o restante. O meio LA não contém proteínas, enquanto o meio LPSM possui uma quantidade reduzida de proteínas devido ao processo de separação por membranas. Ainda, ambos os meios não possuem fonte de nitrogênio. Sabendo que, para o crescimento bacteriano, além da fonte de carbono, também são essenciais proteínas, aminoácidos, nitrogênio e sais minerais, possuindo influência direta sobre a multiplicação celular, possivelmente por esta razão a bactéria apresentou desempenho reduzido nestes meios de cultivo.

Os meios de cultivo SPPN e SA proporcionaram maior concentração de células secas ao final do ensaio, e, de acordo com a comparação múltipla de médias, verificou-se que a diferença entre os resultados de ambos não é significativa. Contudo, deve-se levar em conta que parte das proteínas do meio SA são precipitadas no momento da centrifugação, o que pode levar à um erro positivo na quantificação de células secas. Ainda assim, constatou-se que ambos meios de cultivo com proteínas e adição de nitrogênio em sua composição proporcionaram maior crescimento celular.

A Figura 17 apresenta os valores obtidos para a concentração de PHB (g.L^{-1}) em 12 horas de ensaio e desvios padrão para cada meio de cultivo utilizado.

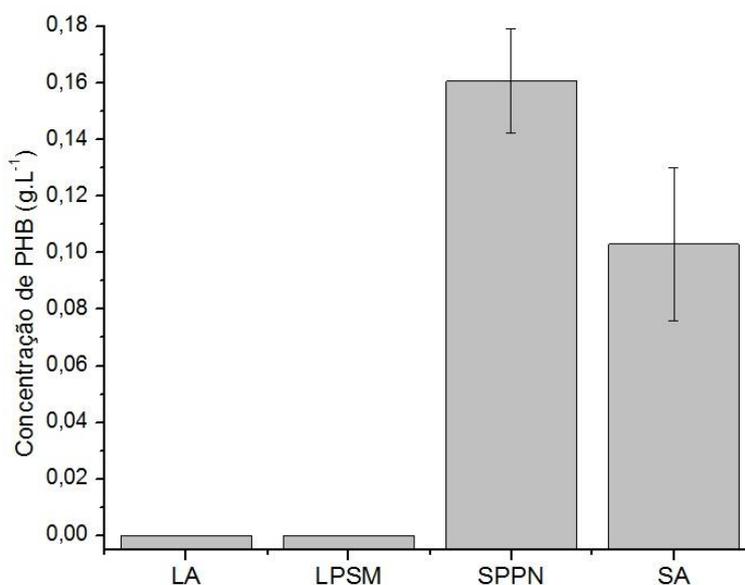


Figura 17 - Valores de concentração de PHB da bactéria *Alcaligenes latus* com a utilização de diferentes meios de cultivo

Notas: LA: lactose; LPSM: lactose extraída por processos de separação por membranas; SPPN: meio produzido com o sobrenadante obtido após precipitação ácida de proteínas do soro de leite neutralizado com hidróxido de amônio; SA: soro de leite.

O Quadro 7 apresenta os resultados obtidos na comparação múltipla de médias de Duncan para cada fator para a variável resposta concentração de PHB.

Meio de cultivo	LA	LPSM	SPPN	SA
LA	■	-	+	+
LPSM	-	■	+	+
SPPN	+	+	■	+
SA	+	+	+	■

Quadro 7- Resultados obtidos para a comparação múltipla de médias de Duncan para a variável resposta concentração de PHB na Etapa 3 - definição do meio com melhor desempenho - do planejamento experimental

Notas: LA: lactose; LPSM: lactose extraída por processos de separação por membranas; SPPN: meio produzido com o sobrenadante obtido após precipitação ácida de proteínas do soro de leite neutralizado com hidróxido de amônio; SA: soro de leite;

- Diferença não significativa;

+ Diferença significativa;

■ Mesmo fator.

Observou-se que a concentração de PHB produzido nos meios LA e LPSM foi nula, como consequência do baixo crescimento celular citado anteriormente. Ainda, verificou-se que a produção de PHB foi significativamente maior no meio SPPN, o que

pode ser verificado visualmente na Figura 17, e comprovado pela comparação múltipla de médias, que confirma que a diferença entre os meios SPPN e SA é significativa.

Assim, com base nos resultados obtidos para a concentração de PHB, estabeleceu-se que o meio de cultivo de melhor desempenho dentre os testados foi o meio SPPN, que foi então utilizado no ensaio em biorreator de bancada para a avaliação cinética da bactéria.

A Tabela 24 apresenta os parâmetros calculados a partir dos resultados obtidos na Etapa 3 dos ensaios do planejamento experimental, ao final de 12 horas de cultivo.

Tabela 24 - Fator de rendimento em células e produto e produtividade volumétrica obtidos para na Etapa 3 - definição do meio com melhor desempenho - do planejamento experimental

Parâmetros	LA	LPSM	SPPN	SA
$Y_{X/S}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,09	0,09	0,13	0,29*
$Y_{P/S}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	-	-	0,04	0,05
p ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	-	-	0,013	0,008

Notas: * A concentração de células secas contém junto proteínas do soro de leite que precipitam com o processo de centrifugação, alterando os resultados;

LA: lactose; LPSM: lactose extraída por processos de separação por membranas; SPPN: meio produzido com o sobrenadante obtido após precipitação ácida de proteínas do soro de leite neutralizado com hidróxido de amônio; SA: soro de leite;

N.d.: concentração não detectada, abaixo dos limites de medição;

$Y_{X/S}$: Fator de rendimento em células;

$Y_{P/S}$: Fator de rendimento em produto;

p : Produtividade volumétrica.

Observou-se, no resultado obtido para o rendimento em células do meio de cultivo SA, o erro associado à precipitação das proteínas do soro de leite no momento da centrifugação, destacando a importância deste tratamento antes do processo de produção de PHB. Ainda, verificou-se que os resultados obtidos neste ensaio são menores (em torno de oito vezes) do que os obtidos anteriormente. De modo geral, houve grande dificuldade na reprodução dos resultados no trabalho. Atribui-se os erros obtidos à complexidade de padronização na preparação dos meios de cultivo, ao erro no momento de diluição dos pré-inóculos e também a erros associados à centrifugação e preparação de amostras para a análise cromatográfica.

5.4 AVALIAÇÃO CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE PHB

A Figura 18 apresenta as curvas de concentração de substrato, células e PHB em função do tempo, obtidos no ensaio em biorreator de bancada utilizando a bactéria *A. latus*.

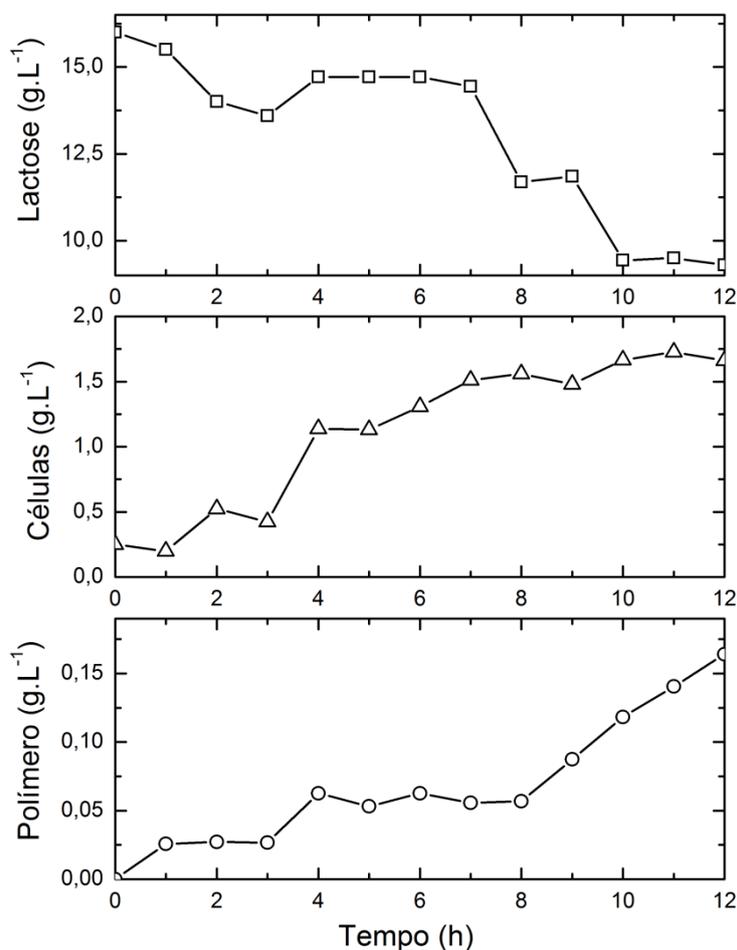


Figura 18 - Curvas de concentração de substrato, células e PHB versus tempo no ensaio em biorreator de bancada com *Alcaligenes latus*

O tempo final de processo, neste caso indicado pela estabilização da concentração de lactose, foi identificado pela análise matemática como sendo 11,6 horas. Assim sendo, para fins de determinação dos parâmetros utilizou-se o último ponto experimental (12 horas) como o final, dada a proximidade entre os dois valores. Verificou-se também neste intervalo de tempo a elevação brusca da concentração de oxigênio (Apêndice B, Figura B-5) durante o processo, indicando uma redução da intensidade de crescimento bacteriano.

A Figura 19 apresenta as curvas das velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de substrato (μ_s) e de formação de produto (μ_p) em função do tempo obtidos no ensaio em biorreator de bancada com *A. latus*.

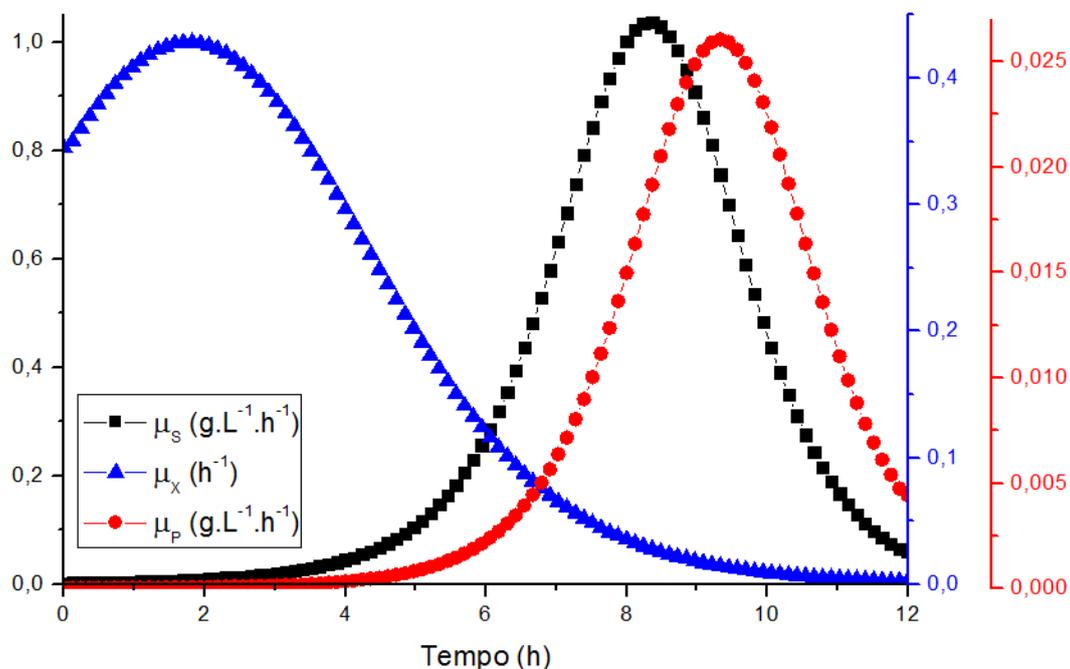


Figura 19 - Curvas de velocidade específica de crescimento, consumo de substrato e formação de produto em função do tempo em biorreator de bancada com *Alcaligenes latus*

Verificou-se que a velocidade específica de crescimento (μ_x) apresenta valores mais elevados no início do processo, enquanto as velocidades específicas de consumo de substrato (μ_s) e de formação de produto (μ_p) apresentam valores mais elevados entre 8 e 10 horas de processo. Ainda, observou-se que, de acordo com o comportamento das curvas, a produção de polímero por *A. latus* nestas condições de cultivo não ocorre de maneira associada ao crescimento.

A Tabela 25 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos para a bactéria *A. latus* no ensaio em biorreator de bancada.

Tabela 25 - Parâmetros cinéticos da bactéria *Alcaligenes latus* obtidos pela avaliação dos resultados do ensaio realizado em biorreator de bancada

Parâmetro	Resultado
$\mu_{X,m\acute{a}x}$ (h^{-1})	0,428
$\mu_{P,m\acute{a}x}$ ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	0,026
$\mu_{S,m\acute{a}x}$ ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	1,036
$Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}$)	0,211
$Y_{P/S}$ ($g.g^{-1}$)	0,024
p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	0,014
Consumo de lactose ($g.L^{-1}$)	6,701
P_f ($g.L^{-1}$)	0,164
X_f ($g.L^{-1}$)	1,661

Nota: $\mu_{X,m\acute{a}x}$: velocidade específica de crescimento máxima;
 $\mu_{P,m\acute{a}x}$: velocidade específica de formação de produto máxima;
 $\mu_{S,m\acute{a}x}$: velocidade específica de consumo de substrato máxima;
 $Y_{X/S}$: fator de rendimento em células;
 $Y_{P/S}$: fator de rendimento em produto;
 p : produtividade volumétrica;
 P_f : concentração final de produto;
 X_f : concentração final de células secas.

Verificou-se que o fator de rendimento em produto ($Y_{P/S}$) no experimento em biorreator foi menor do que o obtido nos experimentos realizados em agitador orbital de bancada. O fator de rendimento em células ($Y_{X/S}$) e a produtividade volumétrica (p) foram superiores aos obtidos para o mesmo meio de cultivo na Etapa 3 dos planejamentos experimentais.

Wang et al. (2013) obtiveram valores de produtividade volumétrica em torno de $0,22 g.L^{-1}.h^{-1}$, enquanto Tripathi et al. (2013) obtiveram valores de $0,19 g.L^{-1}.h^{-1}$, ambos utilizando substratos com sacarose como fonte de carbono. Valores muito inferiores para produtividade foram obtidos neste ensaio, contudo, não é possível compararem-se estes resultados devido à diferença nas fontes de carbono. Ainda, ressalta-se que não foram encontrados experimentos utilizando *A. latus* e lactose em sua forma integral como fonte de carbono na literatura, o que dificultou a comparação dos resultados.

Tohyama et al. (2002), utilizando a bactéria *Ralstonia eutropha* e ácido láctico como substrato para a produção de PHB, obtiveram valores de $0,734 h^{-1}$ para a velocidade específica de crescimento máxima. Shahhosseini (2004), também utilizando a bactéria *Ralstonia eutropha* e frutose como substrato para a produção de PHB, obteve valores em torno de $0,780 h^{-1}$ para o $\mu_{X,m\acute{a}x}$.

Mozumder et al. (2014), utilizando *Cupriavidus necator* e glicose como substrato para a produção de PHB, obtiveram resultados de $0,466 \text{ h}^{-1}$ para $\mu_{X,máx}$ e $0,226 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para $\mu_{P,máx}$. Utilizando glicerol como substrato os resultados obtidos foram $0,328 \text{ h}^{-1}$ e $0,232 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para $\mu_{P,máx}$.

Observaram-se alterações nos parâmetros cinéticos aos compararem-se os resultados obtidos nos ensaios em agitador orbital de bancada e biorreator. Estas podem ocorrer com o aumento de escala do cultivo, e também com a modificação de condições de cultivo, como a aeração e o controle de pH.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO OBTIDO

Visando a comparação do polímero extraído das bactérias utilizadas com o PHB padrão adquirido, foram realizadas as análises de FTIR. Esta análise permite que se avalie não só se o polímero extraído é de fato o PHB, mas também sua qualidade e nível de degradação. A Figura 20 apresenta o espectro de FTIR obtido para o polímero extraído da bactéria *A. latus* em comparação ao PHB padrão.

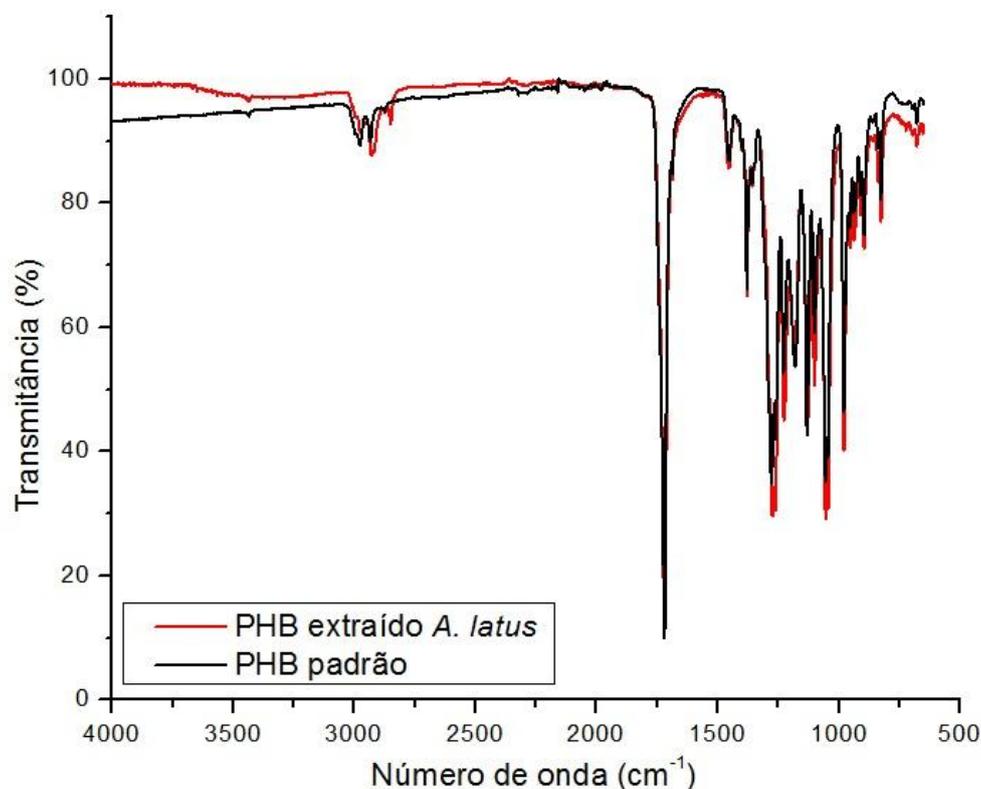


Figura 20 - Espectros de FTIR obtidos para o polímero extraído da bactéria *Alcaligenes latus* em comparação ao PHB padrão

A Figura 21 apresenta a ampliação da região de número de onda entre 1200 e 1800 cm^{-1} para os espectros do PHB extraído da bactéria *A. latus* e para o PHB padrão, com a identificação dos principais números de onda.

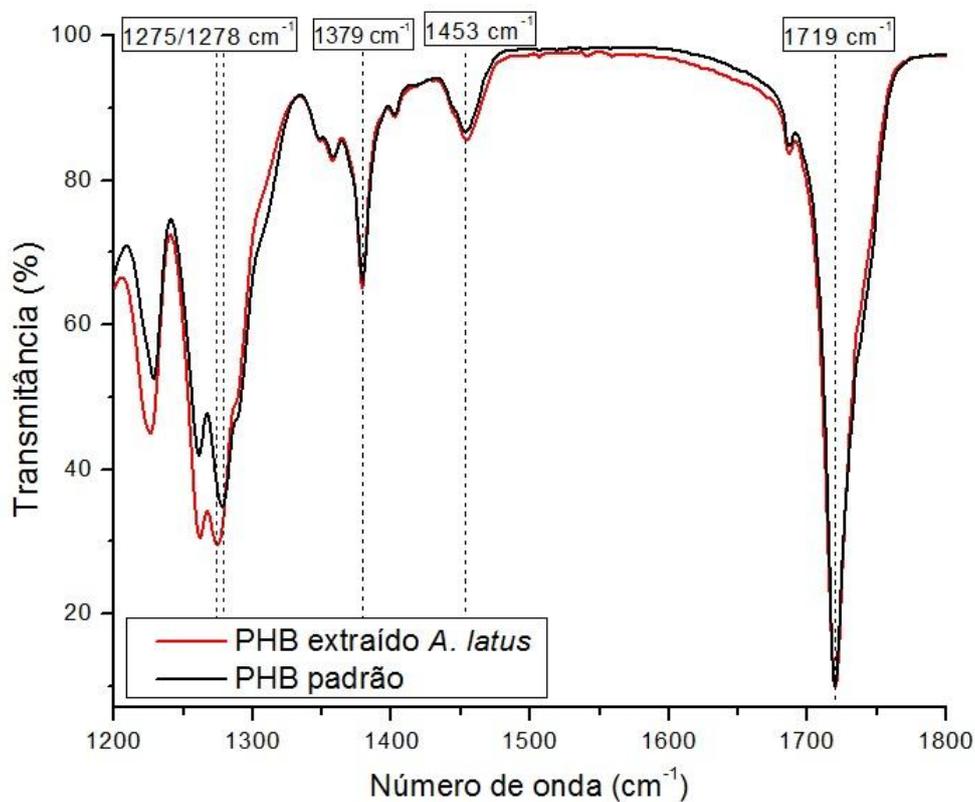


Figura 21 - Ampliação dos espectros de FTIR obtidos para o polímero extraído da bactéria *Alcaligenes latus* em comparação ao PHB padrão na região de número de onda entre 1200 e 1800 cm^{-1}

O Quadro 8 apresenta as bandas identificadas no PHB padrão e no PHB produzido pela bactéria *A. latus*, em comparação a valores obtidos por outros autores.

Número de onda	Banda correspondente	Furukawa et al. (2007)	Domínguez-Díaz et al. (2015)
1719 cm ⁻¹ *	Deformação axial da ligação C=O	1720 cm ⁻¹	1718-170 cm ⁻¹
1700 e 1800 cm ⁻¹ *	Alongamento da ligação C=O	-	-
1000 a 1300 cm ⁻¹ *	Alongamentos das ligações C-O-C e C-C	-	-
	Banda de deformação da ligação CH	-	-
1453 cm ⁻¹ *	Deformação assimétrica do grupo CH ₃	1453 cm ⁻¹	1450-1453 cm ⁻¹
1379 cm ⁻¹ *	Deformação simétrica do grupo CH ₃	1384 cm ⁻¹	1378-1380 cm ⁻¹
Padrão: 1278 cm ⁻¹ Extraído: 1275 cm ⁻¹	Alongamento da ligação C-O-C	1275 cm ⁻¹	1275-1278 cm ⁻¹

Quadro 8 - Números de onda e banda correspondente identificados no PHB padrão e PHB produzido pela bactéria *A. latus*

Notas: * Mesmo número de onda verificado para ambos polímeros.

Verificou-se que ambos os polímeros possuem as bandas características da estrutura do PHB, contendo componentes amorfos e cristalinos. A banda de alongamento da ligação C-O-C é correspondente ao componente cristalino do PHB, que apresentou pequena diferença entre os dois polímeros e foi semelhante aos resultados obtidos por outros autores (FURUKAWA et al., 2007; DOMÍNGUEZ-DÍAZ et al., 2015).

A Figura 22 apresenta as curvas DSC para o polímero extraído da bactéria *A. latus* quando cultivada em agitador orbital de bancada e em biorreator de bancada e também do polímero extraído da bactéria *B. megaterium* quando cultivada em agitador orbital de bancada em comparação ao PHB padrão.

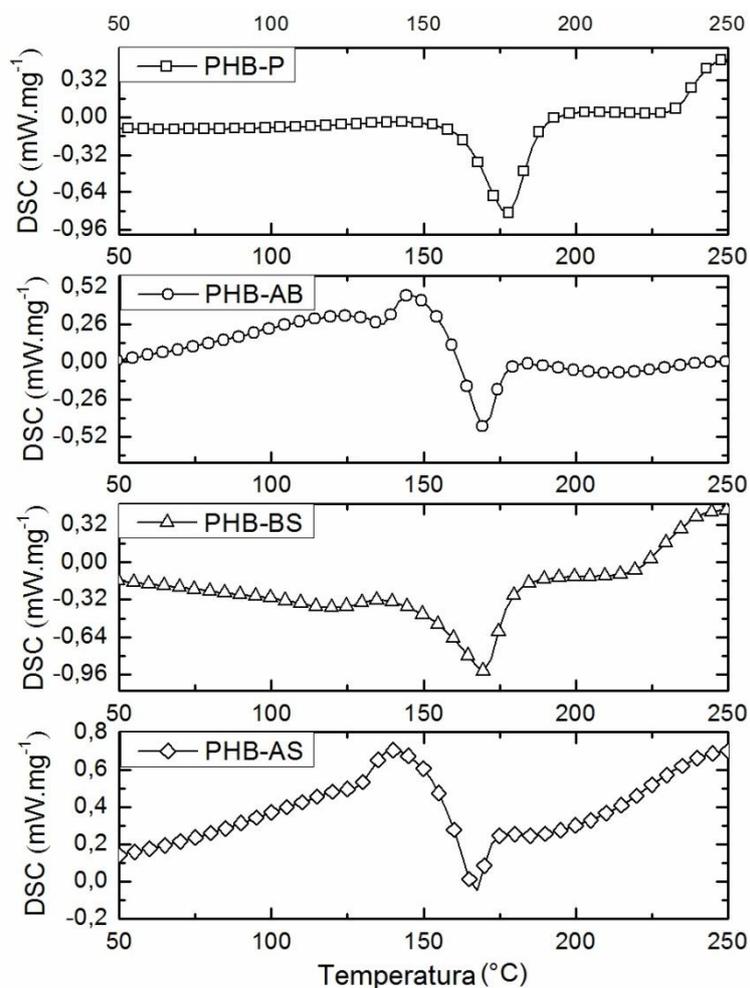


Figura 22 - Curvas DSC para o polímero extraído com diversas condições de produção em comparação ao PHB padrão

Nota: PHB-P: PHB padrão;

PHB-AB: PHB produzido por *Alcaligenes latus* em biorreator de bancada com meio de cultivo SPPN;

PHB-BS: PHB produzido por *Bacillus megaterium* em agitador orbital de bancada;

PHB-AS: PHB produzido por *Alcaligenes latus* em agitador orbital de bancada.

A Tabela 26 apresenta temperatura de fusão cristalina e grau cristalinidade dos polímeros analisados verificadas por meio das curvas DSC, em comparação com resultados obtidos na literatura para outros PHBs padrão e de origem bacteriana.

Tabela 26 - Temperatura de fusão e cristalinidade do PHB extraído da bactéria *Alcaligenes latus* e do PHB padrão em comparação com resultados de outros autores

	T_m (°C)	Grau de cristalinidade (%)
PHB-P	178,0	48
PHB-AB	169,0	26
PHB-AS	167,0	20
PHB-BS	169,0	42
Kulkarni et al. (2010)*	171,0	51
Reddy et al. (2015)*	171,0	-
Wisuthiphaet e Napathorn (2015)^a	178,5	-
Yezza et al. (2007)^a	177,0	52,9
	176,6	55,5
Kulpreecha et al. (2009)^b	174,0	-

Fonte: Yezza et al., 2007; Kulpreecha et al., 2009; Kulkarni et al., 2010; Reddy et al., 2015.

Nota: - não informado;

PHB-P: PHB padrão;

PHB-AB: PHB produzido por *Alcaligenes latus* em biorreator de bancada com meio de cultivo SPPN;

PHB-BS: PHB produzido por *Bacillus megaterium* em agitador orbital de bancada;

PHB-AS: PHB produzido por *Alcaligenes latus* em agitador orbital de bancada;

* Dado obtido para PHB padrão analisado;

^a PHB produzido por *Alcaligenes latus*;

^b PHB produzido por *Bacillus megaterium*.

De modo geral, os valores obtidos são semelhantes aos obtidos na literatura. Observou-se que o PHB-AS apresentou o menor grau de cristalinidade dentre os polímeros testados e também inferior aos obtidos por outros autores que utilizaram a mesma bactéria. Contudo em outros artigos os autores utilizaram substratos com fontes de carbono como glicose ou sacarose, o que pode possuir influência sobre as características do polímero produzido pelo microrganismo. O PHB-AB, produzido em biorreator, também apresentou grau de cristalinidade reduzido, porém, superior ao produzido em agitador orbital de bancada, indicando que a maior possibilidade de controle do processo possui influência sobre a qualidade do polímero extraído.

O polímero produzido por *B. megaterium* apresentou elevado grau de cristalinidade quando comparado aos demais. Como verificado por meio do referencial teórico, Khanna e Srivastava (2005) afirmam que esta bactéria possui capacidade de consumir diversos carboidratos complexos, o que pode favorecer o metabolismo deste microrganismo e aprimorar a qualidade do polímero produzido.

Observou-se que a temperatura de fusão cristalina foi menor para o polímero produzido pelas bactérias *A. latus* e *B. megaterium* a partir de lactose em comparação ao PHB padrão. Isto demonstra que o polímero produzido possui massa molar menor em comparação ao padrão.

A Figura 23 apresenta as curvas TG para o polímero extraído da bactéria *A. latus* quando cultivada em agitador orbital de bancada e em biorreator de bancada e também do polímero extraído da bactéria *B. megaterium* quando cultivada em agitador orbital de bancada em comparação ao PHB padrão.

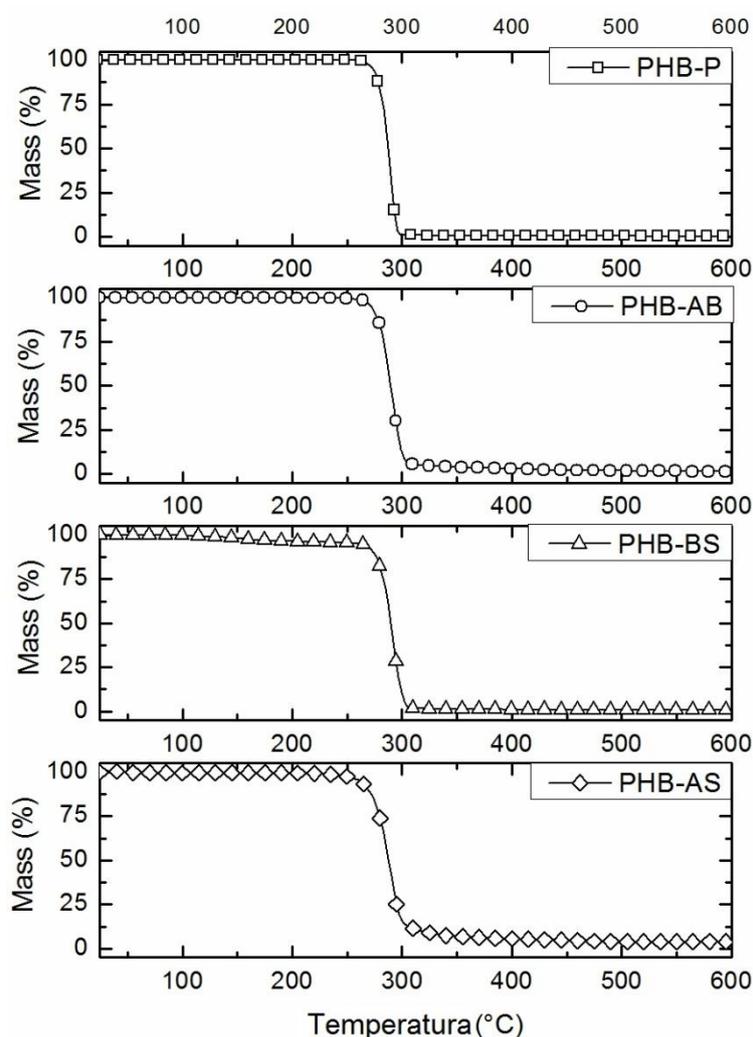


Figura 23 - Curvas TG para o polímero extraído com diversas condições de produção em comparação ao PHB padrão

Nota: PHB-P: PHB padrão;

PHB-AB: PHB produzido por *Alcaligenes latus* em biorreator de bancada com meio de cultivo SPPN;

PHB-BS: PHB produzido por *Bacillus megaterium* em agitador orbital de bancada;

PHB-AS: PHB produzido por *Alcaligenes latus* em agitador orbital de bancada.

A Figura 24 apresenta as curvas DTG para o polímero extraído da bactéria *A. latus* quando cultivada em agitador orbital de bancada e em biorreator de bancada e do polímero extraído da bactéria *B. megaterium* quando cultivada em agitador orbital de bancada em comparação ao PHB padrão.

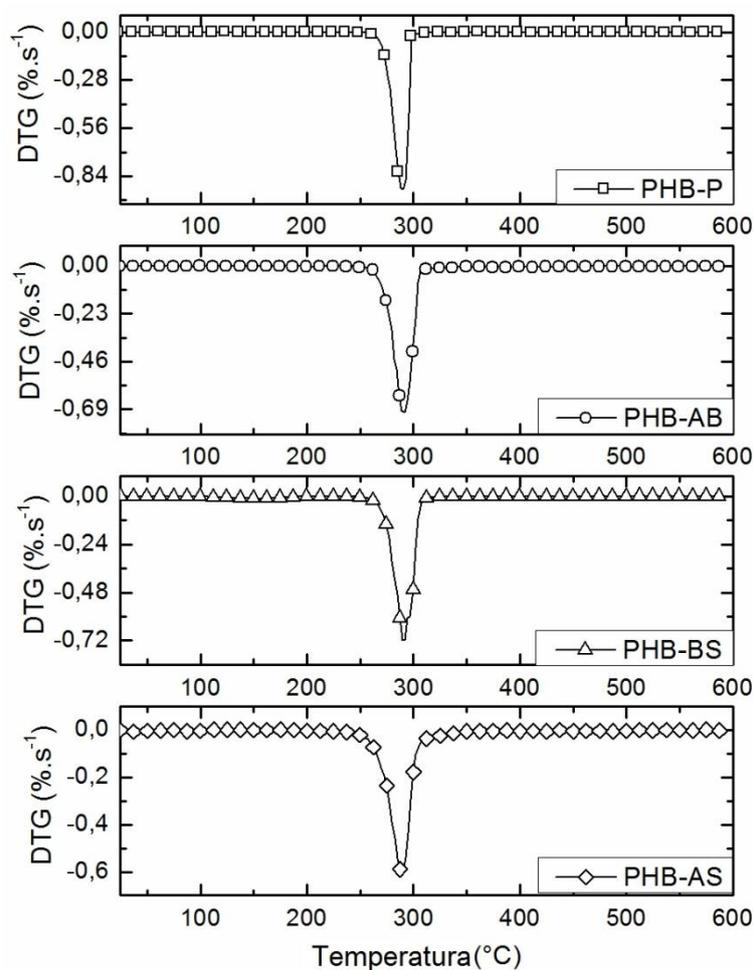


Figura 24 - Curvas DTG para o polímero extraído com diversas condições de produção em comparação ao PHB padrão

Nota: PHB-P: PHB padrão;

PHB-AB: PHB produzido por *Alcaligenes latus* em biorreator de bancada com meio de cultivo SPPN;

PHB-BS: PHB produzido por *Bacillus megaterium* em agitador orbital de bancada;

PHB-AS: PHB produzido por *Alcaligenes latus* em agitador orbital de bancada.

A Tabela 27 apresenta *onset* (temperatura de início do evento de perda de massa), temperatura na qual a velocidade de degradação é máxima e *endset* (temperatura final do evento de perda de massa) do polímero produzido pela bactéria *A. latus* e *B. megaterium* e do PHB padrão em comparação com dados obtidos na literatura.

Tabela 27 - Dados do evento de perda de massa identificado para o polímero produzido por *Alcaligenes latus* e para o PHB padrão em comparação a dados obtidos na literatura

	<i>Onset</i> (°C)	<i>T_{max}</i> (°C)	<i>Endset</i> (°C)	Massa residual (%)
PHB-P	250	290	310	0,23
PHB-AB	249	291	350	1,45
PHB-AS	220	289	355	3,91
PHB-BS	247	289	334	0,75
Melo et al. (2012)*	220	-	315	2,32
Reddy et al. (2015)	230*	274*	310*	0*
	100 ^a	Não houve degradação completa até 600 °C		
Yezza et al. (2007)^b	288	308	329	-
	286	308	317	-

Fonte: Yezza et al., 2007; Melo et al., 2012; Reddy et al., 2015.

Nota: - não informado;

PHB-P: PHB padrão;

PHB-AB: PHB produzido por *Alcaligenes latus* em biorreator de bancada com meio de cultivo SPPN;

PHB-BS: PHB produzido por *Bacillus megaterium* em agitador orbital de bancada com o meio de cultivo indicado na Tabela 8;

PHB-AS: PHB produzido por *Alcaligenes latus* em agitador orbital de bancada com o meio de cultivo indicado na Tabela 8;

* Dado obtido para PHB padrão analisado;

^a PHB produzido por *Bacillus* sp. CYR1;

^b PHB produzido por *Alcaligenes latus*.

As temperaturas máxima de degradação identificadas no evento de perda de massa mais pronunciado foram semelhantes às obtidas por outros autores. Ainda, observou-se que as temperaturas de *onset* foram inferiores no PHB produzido pelas bactérias *A. latus* e *B. megaterium*, apontando que este apresenta menor estabilidade térmica do que o PHB padrão. Verificou-se que os PHBs AB, AS e BS apresentaram *endset* do evento e massa residual relativamente superiores ao do PHB padrão, o que pode indicar a presença de outros compostos, que alteram as características térmicas do polímero. O processo de degradação térmica do polímero envolve a quebra de cadeias e hidrólise, que resulta na progressiva redução do massa molar (MELO et al., 2012).

Assim, verificou-se que se obteve êxito na produção de PHB utilizando lactose e soro de leite como fontes de carbono, proporcionando um polímero de propriedades semelhantes às do padrão.

6 CONCLUSÕES

Conclui-se, por meio das análises cromatográficas e também da caracterização do polímero extraído, que a produção de PHB por meio de *A. latus* e *B. megaterium* utilizando lactose e soro de leite como substrato é possível.

Verificou-se, por meio de ensaio em agitador orbital de bancada que em aproximadamente 12 horas de cultivo, a concentração de PHB máxima produzida por *A. latus* atinge $0,55 \text{ g.L}^{-1}$ e por *B. megaterium* $0,095 \text{ g.L}^{-1}$ com concentração inicial de lactose de 20 g.L^{-1} para *A. latus* e 16 g.L^{-1} para *B. megaterium*. Ensaio posterior com a realização de planejamento experimental demonstrou que efetivamente não há diferença significativa nos resultados com concentrações iniciais de lactose de 20 ou 16 g.L^{-1} .

Por meio de planejamento experimental, verificou-se que a bactéria *A. latus* produz maiores quantidades de polímero dentro das condições testadas, em média $0,31 \text{ g.L}^{-1}$, contra uma média de $0,19 \text{ g.L}^{-1}$ produzidos pela bactéria *B. megaterium*.

Ainda, com análise estatística observou-se que o hidróxido de amônio é a base mais adequada para a neutralização do soro de leite após o processo de precipitação ácida das proteínas, resultando em maior concentração final de produto formado, aproximadamente $1,28 \text{ g.L}^{-1}$. Com a utilização de hidróxido de sódio há a produção média de $0,64 \text{ g.L}^{-1}$ e utilizando hidróxido de potássio a média de $0,85 \text{ g.L}^{-1}$.

Comprovou-se, por meio de ensaios com planejamento experimental, que dentre os meios testados (lactose comercial, lactose extraída por processos de separação por membranas, soro de leite e sobrenadante obtido após a precipitação ácida das proteínas do soro de leite), o que proporciona maiores concentrações de polímero ao final do processo é o meio composto de soro de leite após a precipitação ácida de proteínas neutralizado com hidróxido de amônio, com média de $0,16 \text{ g.L}^{-1}$.

Por meio do ensaio em biorreator de bancada, observou-se que a bactéria *A. latus* acaba o processo em aproximadamente 12 horas (11,6 horas), com produtividade volumétrica de $0,014 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, velocidade específica de crescimento máxima de $0,428 \text{ h}^{-1}$, velocidade específica de consumo de substrato máxima de $1,036 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, velocidade específica de formação de produto máxima de $0,026 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, fator de rendimento em células de $0,211 \text{ g.g}^{-1}$, e fator de rendimento em produto de $0,024 \text{ g.g}^{-1}$. Alguns resultados apresentaram valores menores do que os obtidos nos ensaios em agitador orbital de bancada, demonstrando que alguns parâmetros para o cultivo em biorreator devem ser revistos.

Por fim, verificou-se que o PHB produzido por *A. latus* e *B. megaterium* utilizando lactose e soro de leite como substrato possui propriedades químicas e térmicas semelhantes às do PHB padrão testado, demonstrando que a utilização de substratos contendo lactose como fonte de carbono não proporciona grandes alterações físico-químicas no produto final.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Abaixo seguem algumas sugestões de trabalhos futuros para a continuação do trabalho de pesquisa:

- a) realização de testes de produção de PHB com maiores frequências em agitador orbital de bancada;
- b) realização de testes de produção de PHB com frascos de Erlenmeyer modificados com a adição de chicanas em agitador orbital de bancada;
- c) avaliar como variáveis resposta nas análises estatísticas, os fatores de rendimento em células e em produto;
- d) otimização dos parâmetros de oxigênio dissolvido, tempo do ensaio, volume de inóculo, entre outros, nos ensaios em biorreator de bancada;
- e) realização de ensaios em biorreator de bancada sem o controle de pH.

REFERÊNCIAS

- ARRIETA, M.P. et al. Disintegrability under composting conditions of plasticized PLA e PHB blends. **Polymer Degradation and Stability**, v. 108, 307-318, 2014.
- ASBHY, R.D.; SHI, F.; GROSS, R.A. Use of Poly(ethyleneglycol) to Control the End Group Structure and Molecular Weight of Poly(3-hydroxybutyrate) Formed by *Alcaligenes latus* DSM 1122. **Tetrahedron**, v. 53, p. 15209-15223, 1997.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO PLÁSTICO. **Perfil 2014 - Indústria Brasileira de Transformação de Material Plástico**. São Paulo, 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. Notícias, [S.l.], 2014. Disponível em: <http://www.abiq.com.br/noticias_interna.asp?PaginaAtual=6&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=6>. Acesso em 3 jun. 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 14550 - Couro - Banho residual e efluente líquido - Determinação do teor de sólidos dissolvidos totais, fixos e voláteis 2000**.
- BAEI, M.S. et al. Optimization PHAs Production from Dairy Industry Wastewater (Cheese Whey) by *Azohydromonas lata* DSMZ 1123. **Iranica Journal of Energy & Environment**, v. 1, p. 132-136, 2010.
- BALDASSO, C. **Fracionamento dos Componentes do Soro de Leite através da Tecnologia de Separação por Membranas**. 2011. 282 f. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, Amsterdam, v. 278, 381-386, 2011.
- BAPTIST, J.N. Process for preparing poly- β -hydroxy-butyric acid. **United States Patent Office** n. 3,044,942, 1962.
- BARHAM, P.J. et al. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. **Journal of Materials Science**, v. 19, p. 2781-2794, 1984.
- BORZANI et al. **Biotecnologia Industrial - Fundamentos**. São Paulo: Blucher, 2001, 288p.
- BYLUND, G. **Dairy Processing Handbook**. Lund: Tetra Pak Processing Systems, 1995, 427 p.
- DAMODARA, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010, 899 p.
- DETTMER et al. Environmentally friendly hide unhairing: enzymatic hide processing for the replacement of sodium sulfide and deliming. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 47, p. 11-18, 2013.

DOMÍNGUEZ-DÍAZ, M. et al. Thermo-mechanical properties, microstructure and biocompatibility in poly-b-hydroxybutyrates (PHB) produced by OP and OPN strains of *Azotobacter vinelandii*. **European Polymer Journal**, v.63, p. 101-112, 2015.

ELAIN, A. et al. Valorisation of local agro-industrial processing waters as growth media for polyhydroxyalkanoates (PHA) production. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 1-5, 2016.

FACCIN, D. J. L. **Avaliação das condições de cultivo para aumento da produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* e modelagem do bioprocesso**. 2012. 160 f. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

FACCIN, D. J. L. et al. Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 420-425, 2013.

FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London: Thomson Science, 1998, 378 p.

FURUKAWA, T. et al. Comparison of miscibility and structure of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)/poly(L-lactic acid) blends with those of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(L-lactic acid) blends studied by wide angle X-ray diffraction, differential scanning calorimetry, and FTIR microspectroscopy. **Polymer**, v. 48, p. 1749-1755, 2007.

FURUKAWA, T. Structure, dispersibility, and crystallinity of poly(hydroxybutyrate)/poly (L-lactic acid) blends studied by FT-IR microspectroscopy and differential scanning calorimetry. **Macromolecules**, v. 38, p. 6445-6454, 2005.

GARCIA-GONZALEZ, L.; et al. Sustainable autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB) from CO₂ using a two-stage cultivation system. **Catalysis Today**, v. 257, p. 237-245, 2015.

GOUDA, M. K.; SWELLAM, A. E.; OMAR, S. H. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. **Microbiological Research**, v. 156, p. 201-207, 2001.

GROTHER, E.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Fermentation optimization for the production of poly(b-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 132-141, 1999.

IHLI, J.; PATERSON, A.H.J. Effect of galacto-oligosaccharide concentration on the kinetics of lactose crystallisation. **International Dairy Journal**, v. 41, p. 26-31, 2015.

INDYK, H.E. et al. Optical biosensor analysis of the heat denaturation of bovine lactoferrin. **Food Chemistry**, v. 101, p. 838-844, 2007.

INOUE, D. et al. Polyhydroxyalkanoate production potential of heterotrophic bacteria in activated sludge. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, p. 47-51, 2016.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. Aspectos das Importações de Soro de Leite no Brasil, [S.l.], 2013. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=12703>>. Acesso em 5 mar. 2016.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Compendium of Chemical Terminology, Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org>>. Acesso em 10 jun. 2014.

JACQUEL, N. et al. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 15-27, 2008.

JIANG, X.; RAMSAY, J. A.; RAMSAY, B. A. Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 212-219, 2006.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 607-619, 2005.

KULKARNI, S.O. et al. Production and characterization of a biodegradable poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB-co-PHV) copolymer by moderately haloalkalitolerant *Halomonas campisalis* MCM B-1027 isolated from Lonar Lake, India. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9765-9771, 2010.

KULPRECHA, S. et al. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, 240–245, 2009.

KURUSU, R.S. et al. Incorporation of plasticizers in sugarcane-based poly(3-hydroxybutyrate)(PHB): Changes in microstructure and properties through ageing and annealing. **Industrial Crops and Products**, v. 72, p. 166-174, 2015.

LAYCOCK, B. et al. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 536- 583, 2013.

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

LIMA, U.A. et al. **Biotecnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Blucher, 2001, 593 p.

LUCENA, M.E. et al. α -Lactalbumin precipitation from commercial whey protein concentrates. **Separation and Purification Technology**, v. 52, 446-453, 2007.

MARÍN, E. et al. Effect of Heat Treatment on Bovine Lactoperoxidase Activity in Skim Milk: Kinetic and Thermodynamic Analysis. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 83-93, 2003

MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. **Functional Dairy Products**. England: Woodhead Publishing, 2003, 392 p.

- MELO, J.D.D. et al. A biodegradable composite material based on polyhydroxybutyrate (PHB) and carnauba fibers. **Composites: Part B**, v. 43, p. 2827-2835, 2012.
- MILLER, G.D.; JARVIS, J.K.; MCBEAN, L.D. **Handbook of Dairy Products and Nutrition**, Illinois: CRC Press LLC, 2000, 448 p.
- MIZUBUTI, I.Y. Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação. **Semana Ciências Agrárias**, v. 15, p. 80-94, 1994.
- MORENO, P. et al. Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. **New Biotechnology**, v. 32, p. 682-689, 2015.
- MOZUMDER, M.S.I. et al. Modeling pure culture heterotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB). **Bioresource Technology**, v. 155, p. 272-280, 2014.
- MOZUMDER, M.S.I. et al. Effect of sodium accumulation on heterotrophic growth and polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator*. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 213-218, 2015.
- NATH, A. et al. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, p. 5479-5755, 2008.
- NARANJO, J. M. et al. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. **Bioresource Technology**, New York, v. 133, p. 38-44, 2013.
- NEVES, B.S. Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios. **Embrapa Gado De Leite**. Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar, [S.l.], p.97-108, 2001.
- OCAMPO-LÓPEZ, C.; COLORADO-ARIAS, S.; RAMÍREZ-CARMONA, M. Modeling of microbial growth and ammonia consumption at different temperatures in the production of a polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolymer. **Journal of Applied Research and Technology**, v. 13, p. 498-503, 2015.
- PANDIAN, S. R. et al. Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and seawater as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, p. 705-711, 2010.
- PINKWART, M.; SCHNEIDER, K.; SCHLEGEL, H.G. Purification and properties of the membrane-bound hydrogenase from N₂-fixing *Alcaligenes latus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 745, p. 267-278, 1983.
- POSADA, J. H. et al. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. **Process Biochemistry**, London, v. 46, p. 310-317, 2011.

- REDDY, M.V. et al. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from alkylphenols, mono and poly-aromatic hydrocarbons using *Bacillus* sp. CYR1: A new strategy for wealth from waste. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 711-717, 2015.
- REDDY, M.V. et al. Production of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) from synthetic wastewater using *Hydrogenophaga palleronii*. **Bioresource Technology**, *in press*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.025>.
- RIIS, V.; 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.
- SHAHID, S. et al. Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 116, p. 302-308, 2013.
- SHAHHOSSEINI, S. Simulation and optimisation of PHB production in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 963-969, 2004.
- SIVAKUMAR, N.; AL-BAHRY, S.; AL-BATTASHI, H. S. Screening of Biopolymer Producing Bacteria Isolated from Some *Brassica* Plants. **APCBEE Procedia**, [S.l.], v. 5, p. 333-338, 2013.
- SOUZA, R. R. et al. Recovery and purification of lactose from whey. **Chemical Engineering and Processing**, [S.l.], v. 49, p. 1137-1143, 2010.
- SPINACÉ, M.A.S.; DE PAOLI, M.A. A tecnologia de reciclagem de polímeros. **Química Nova**, v. 28, 65-72, 2005.
- STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 128, p. 219-228. 1995.
- SUN, M. et al. Selection of effective methods for extracting extracellular polymeric substances (EPSs) from *Bacillus megaterium* TF10. **Separation and Purification Technology**, [S.l.], v. 95, p. 216-221, 2012.
- TOHYAMA, M. et al. Modeling of the mixed culture and periodic control for PHB production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, p. 157-173, 2002.
- VALAPPIL, S. P. et al., Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. **Journal of Biotechnology**, v. 132, p. 251-258, 2007.
- VERMEER, A.W.P.; NORDE, W. The Thermal Stability of Immunoglobulin: Unfolding and Aggregation of a Multi-Domain Protein. **Biophysical Journal**, v. 78, p. 394-404, 2000.
- WANG, B. et al. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using

- sugarbeet juice. **Industrial Crops and Products**, [S.l.], v. 43, p. 802-811, 2013.
- WANG, Y.; INOUE, Y. et al. Effect of dissolved oxygen concentration in the fermentation medium on transformation of the carbon sources during the biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) by *Alcaligenes latus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 28, p. 235-243, 2001.
- WELLEN, R.M.R. et al. The melting behaviour of poly(3-hydroxybutyrate) by DSC. Reproducibility study. **Polymer Testing**, v. 32, p. 215-220, 2013.
- WISUTHIPHAET, N.; NAPATHORN, S.C. Optimisation of the use of products from the cane sugar industry for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Azohydromonas lata* DSM1123 in fed-batch cultivation. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 352-361, 2016.
- YADA, R.Y. **Protein in Food Processing**. England: Woodhear Publishing, 2004, 686 p.
- YEZZA, A. et al. Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* from maple sap. **Applied Microbiology Biotechnology**, p. 269-274, 2007.
- ZADOW, J.G. **Whey and Lactose Processing**. England: Elsevier Applied Science, 1992, 600 p.
- ZAFAR, M. et al. Optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Azohydromonas lata* MTCC 2311 by using genetic algorithm based on artificial neural network and response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S.l.], v. 1, p. 70-79, 2012.
- ZANIN, M.; MANCINI, S.D. **Resíduos plásticos e reciclagem: aspectos gerais e tecnologia**. São Carlos: EdUFSCar, 2015, 138p.
- ZHANG, Y. et al. Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. **Bioresource Technology**, New York, v. 147, p. 307-314, 2013.
- ZYDNEY, A.L. Protein Separations Using Membrane Filtration: New Opportunities for Whey Fractionation. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 243-250, 1998.

APÊNDICE A - Marca dos reagentes utilizados no trabalho

Todos os reagentes utilizados no trabalho são de grau P.A., com exceção do soro de leite em pó, de grau técnico, e do PHB padrão utilizado. O Quadro A - 1 apresenta todos os reagentes e suas respectivas marcas.

Reagente	Marca
Acetona	Simoquímica, Brasil
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	Vetec, Brasil
Ácido benzóico	Dinâmica, Brasil
Ácido bórico	Dinâmica, Brasil
Ácido cítrico	Dinâmica, Brasil
Ácido clorídrico	Dinâmica, Brasil
Ácido nítrico	Dinâmica, Brasil
Ágar-ágar	Kasvi, Brasil
Albumina sérica bovina	Sigma-Aldrich, Estados Unidos
Etileno glicol (antiespumante)	Dinâmica, Brasil
Carbonato de sódio	Dinâmica, Brasil
Citrato de sódio	Dinâmica, Brasil
Cloreto de cálcio	Dinâmica, Brasil
Cloreto de cobalto	Dinâmica, Brasil
Cloreto de manganês	Dinâmica, Brasil
Dicloroetano	Dinâmica, Brasil
Etanol	Cinética, Brasil
Éter-etílico	Dinâmica, Brasil
Extrato de carne	Kasvi, Brasil
Fenol cristal	Dinâmica, Brasil
Fosfato de potássio monobásico	Neon, Brasil
Fosfato de sódio bibásico	Dinâmica, Brasil
Hidróxido de amônio	Vetec, Brasil
Hidróxido de potássio	Quimex, Brasil
Hidróxido de sódio	Vetec, Brasil
Lactose	Dinâmica, Brasil

Metabissulfito de sódio	Dinâmica, Brasil
Molibdato de amônio	Vetec, Brasil
N-propanol	Dinâmica, Brasil
Peptona	Kasvi, Brasil
PHB padrão	Sigma-Aldrich, Estados Unidos
Reagente Folin Ciocalteu	Dinâmica, Brasil
Soro de leite em pó	Laticínios Renner S.A., Brasil
Sulfato de amônio	Dinâmica, Brasil
Sulfato de cobre	Dinâmica, Brasil
Sulfato de ferro	Vetec, Brasil
Sulfato de magnésio	Dinâmica, Brasil
Sulfato de níquel	Dinâmica, Brasil
Sulfato de zinco	Dinâmica, Brasil
Tartarato de sódio e potássio	Dinâmica, Brasil

Quadro A - 1 - Marca dos reagentes utilizados na execução do trabalho

APÊNDICE B - Gráficos das condições monitoradas durante os ensaios em biorreator de bancada

A Figura B - 1 apresenta as variações de temperatura obtidas durante o ensaio em biorreator de bancada.

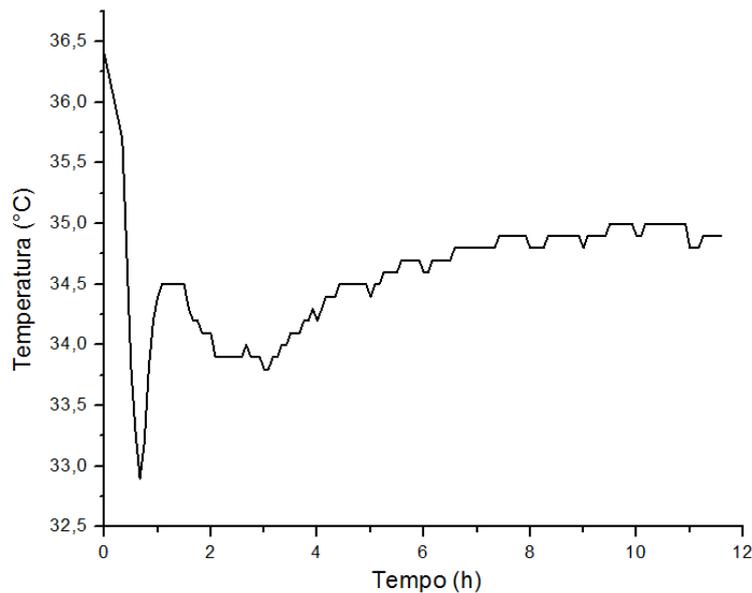


Figura B - 1 - Variações de temperatura durante o ensaio de crescimento em biorreator de bancada

A Figura B - 2 apresenta as variações de pH obtidas durante o ensaio no biorreator de bancada.

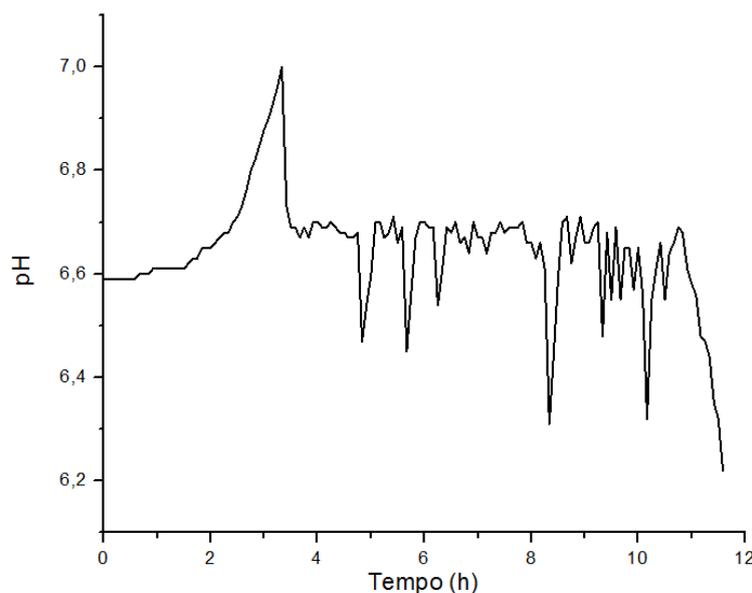


Figura B - 2 - Variações de pH obtidas durante o ensaio no biorreator de bancada

A Figura B - 3 apresenta as frequências do agitador utilizadas durante o ensaio, que foram alteradas conforme a necessidade de oxigênio no cultivo.

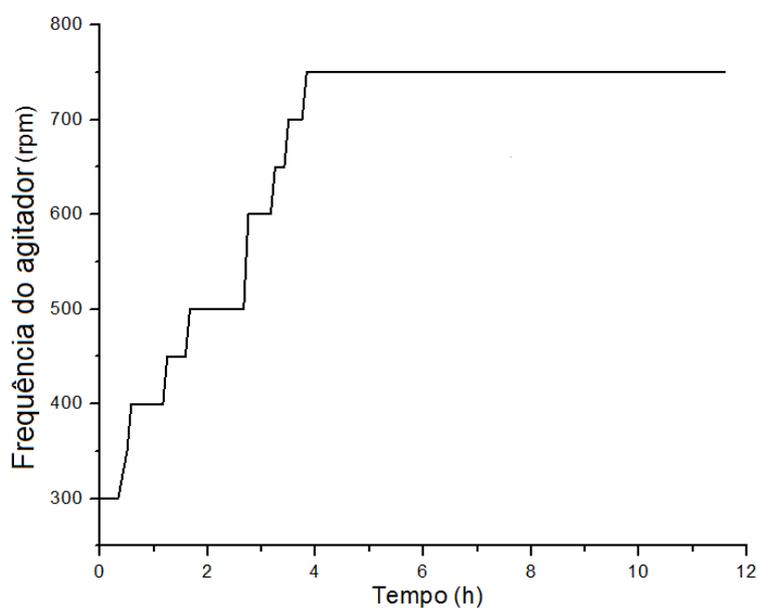


Figura B - 3 - Frequências do agitador ajustadas durante o ensaio em biorreator de bancada

A Figura B - 4 apresenta as vazões de ar ajustadas durante o ensaio, que foram alteradas conforme a necessidade de oxigênio no cultivo.

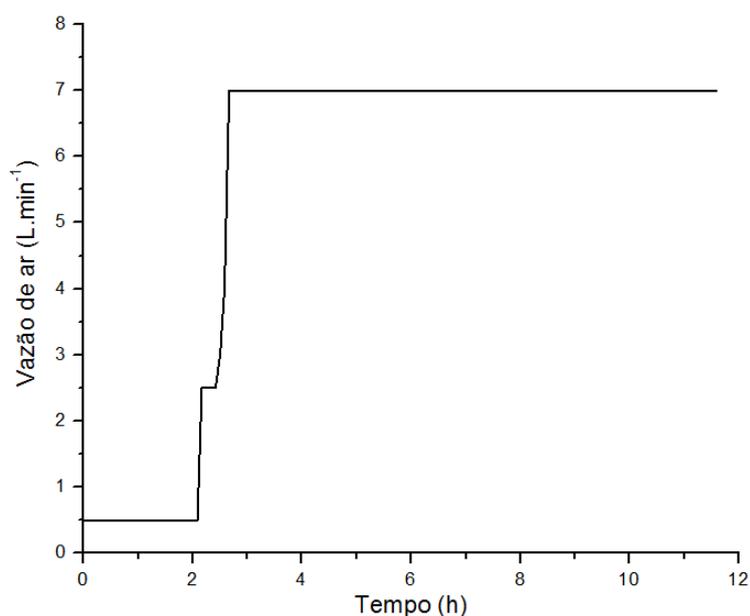


Figura B - 4 - Vazões de ar ajustadas durante o ensaio em biorreator de bancada

A Figura B - 5 apresenta as concentrações de oxigênio registradas durante o ensaio em biorreator de bancada. Destaca-se a brusca elevação desta concentração em aproximadamente 650 minutos, indicando o final do cultivo.

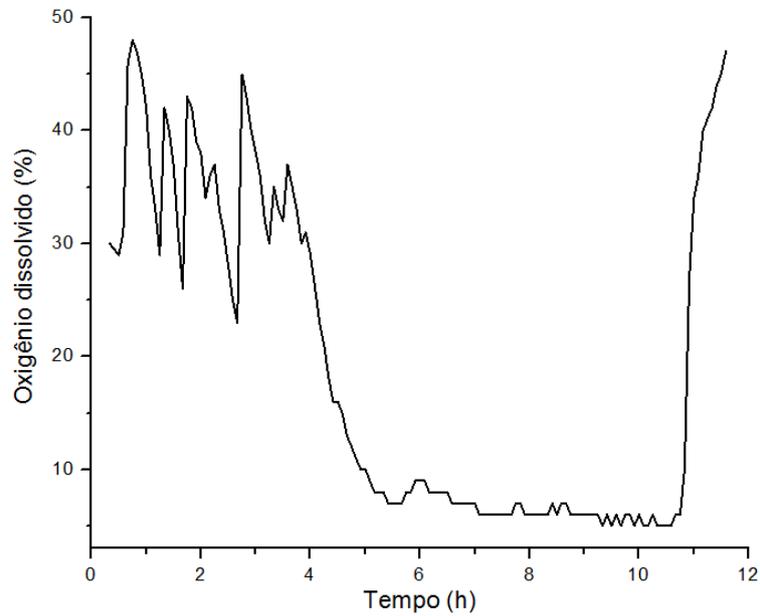


Figura B - 5 - Concentrações de oxigênio dissolvido registradas durante o ensaio em biorreator de bancada

APÊNDICE C - Ajustes realizados nas curvas de concentração de lactose, células secas e PHB obtidos no ensaio em biorreator de bancada

A Figura C-1 apresenta o ajuste de dados aplicado à curva de concentração de lactose obtida no ensaio realizado em biorreator de bancada.

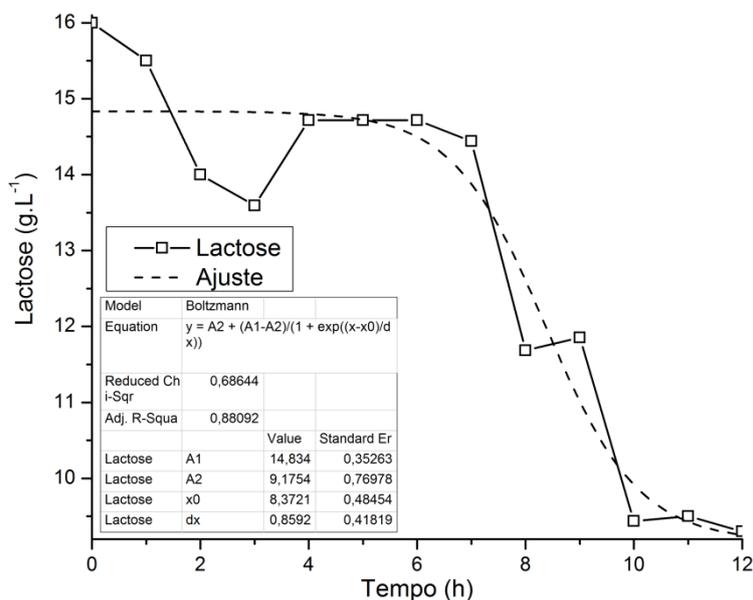


Figura C - 1 - Ajuste de dados aplicado à curva de concentração de lactose obtida no ensaio em biorreator de bancada

A Figura C-2 apresenta o ajuste de dados aplicado à curva de concentração de células secas obtida no ensaio realizado em biorreator de bancada.

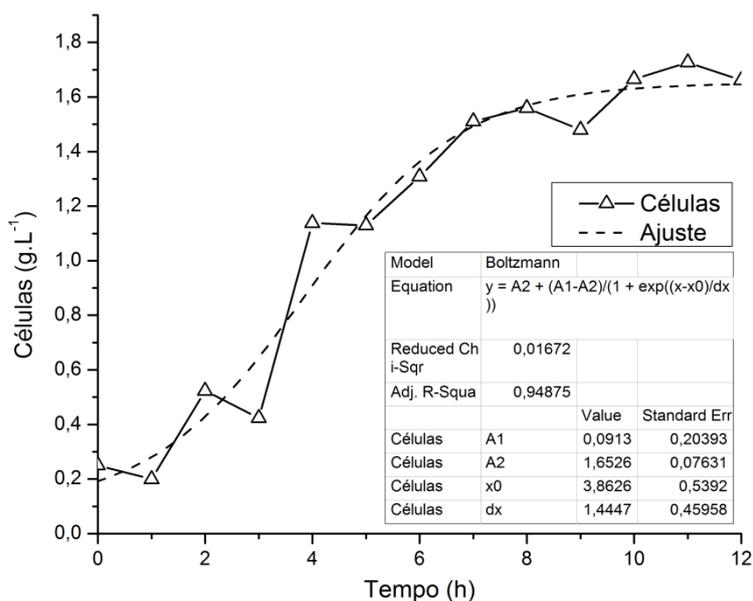


Figura C - 2 - Ajuste de dados aplicado à curva de concentração de células secas obtida no ensaio em biorreator de bancada

A Figura C-3 apresenta o ajuste de dados aplicado à curva de concentração de PHB obtida no ensaio realizado em biorreator de bancada.

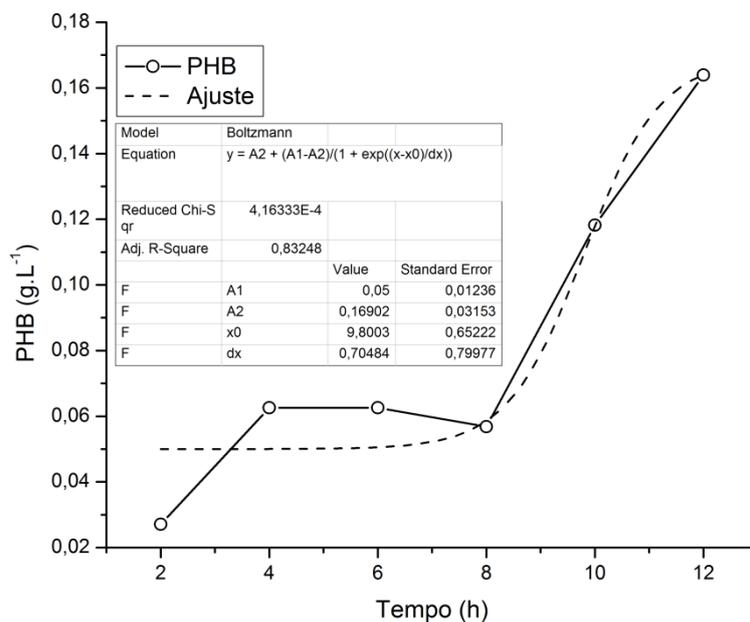


Figura C - 3 - Ajuste de dados aplicado à curva de concentração de PHB obtida no ensaio em biorreator de bancada