

ESTRATÉGIAS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DOS PLÁSTICOS BIODEGRADÁVEIS POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) E POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDROXIVALERATO) POR BACTÉRIAS

Cláudia Regina Squio e Gláucia Maria Falcão de Aragão*

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, CP 476, 80040-970 Florianópolis - SC

Recebido em 13/5/03; aceito em 12/12/03; publicado na web em 27/05/04

CULTIVATION STRATEGIES FOR PRODUCTION OF THE BIODEGRADABLE PLASTICS POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) AND POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) BY BACTERIA. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are carbon and energy storage materials that are accumulated as intracellular granules in a variety of microorganisms during unbalanced growth. PHAs have drawn attention due to their properties similar to conventional plastics and complete biodegradability. They can be used for food and cosmetics packaging, and in medicine and agriculture. However, their applicability is reduced because of their high production cost compared to conventional plastics. An overview on production strategies of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) aiming at reducing the production costs is presented.

Keywords: polyhydroxyalkanoates; biopolymer; *Ralstonia eutropha*.

INTRODUÇÃO

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

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

Os plásticos biodegradáveis são polímeros que se degradam completamente por ataque microbiano em curto espaço de tempo, sob condições apropriadas do meio ambiente. Dentre os biopolímeros em desenvolvimento estão os poli-hidroxialcanoatos (PHA's). Além da vantagem em serem biodegradáveis, ainda apresentam outras importantes características como serem biocompatíveis, serem produzidos a partir de recursos renováveis como açúcares e ácidos graxos e por terem propriedades termoplásticas e características físicas e mecânicas semelhantes às do polipropileno, polímero derivado do petróleo^{3,4}.

PHA's são poliésteres estruturalmente simples, sintetizados por muitos microorganismos como substâncias naturais de reserva de carbono e de energia. São acumulados pela célula microbiana em forma de grânulos, podendo chegar até 90% de seu peso seco⁴. O PHA é formado em condições de crescimento não balanceadas proporcionadas pela limitação de um nutriente, entre outros, como fonte de nitrogênio e fósforo e excesso da fonte de carbono^{5,6}.

Mais de 100 monômeros diferentes já foram identificados como constituintes de PHA's sintetizados por organismos naturais ou recombinantes, o que demonstra a grande diversidade de PHA's que podem ser produzidos¹. Entre os PHA's mais estudados e produzidos

industrialmente, estão o poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) e o poli(3-hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato) (P(3HB-co-3HV)), sendo que o segundo possui propriedades mecânicas superiores ao primeiro, sendo mais flexível, o que o torna mais atrativo para fins industriais⁷.

Muitos são os microorganismos produtores de PHA's, sendo que a espécie *Ralstonia eutropha* (anteriormente *Alcaligenes eutrophus*) tem sido utilizada na produção industrial, por apresentar altas taxas de produção de polímero e obter altos rendimentos. Entretanto, a cepa original (*Alcaligenes eutrophus* H16) só utiliza alguns tipos de açúcares e, embora espécies mutantes (*R. eutropha* DSM 545, *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599) possam crescer em glicose, não podem hidrolisar sacarose⁸. Outro microorganismo com grande potencial para a produção industrial é *Burkholderia sacchari* (anteriormente *Burkholderia* sp. IPT 101), isolado de solo de canaviais brasileiro⁹.

Os PHA's podem ser utilizados como matéria-prima em um amplo campo de aplicações, como embalagens para produtos de limpeza, higiene, cosméticos e alimentos. Também servem para produzir sacos descartáveis, vasos para mudas, brinquedos e material escolar. Além disso, por serem biocompatíveis podem ser empregados na área médico-farmacêutica em fabricação de fios de sutura, próteses ósseas, suportes de culturas de tecidos para implantes e encapsulação de fármacos para liberação controlada^{1,10}.

Apesar desta grande possibilidade de aplicações, os plásticos biodegradáveis ainda têm participação mínima no mercado internacional, em virtude de seu alto custo em relação aos plásticos petroquímicos e às dificuldades de processamento. A redução dos custos de produção depende da obtenção de linhagens altamente eficientes na conversão dos substratos no produto desejado, de utilização de substratos de baixo custo, do desenvolvimento de processos que permitam explorar ao máximo o potencial dessas linhagens e do desenvolvimento de processos de extração-purificação, de forma a tornar os custos de recuperação do produto os menores possíveis¹. Com relação ao processamento, como o P(3HB) é quimicamente instável a altas temperaturas, o tempo de processo deve ser reduzido, ajustando-se às propriedades do polímero¹¹. Algumas das estratégias do bioprocessamento, envolvendo decisões sobre microorganismo produtor, tipo de biorreator, substratos utilizados e tipos de alimentações,

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

visando a melhoria dos processos de produção de PHA's, estão apresentadas a seguir.

ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) E POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDROXIVALERATO)

A produção industrial de PHA's tem utilizado *R. eutropha*, por sua capacidade de acumular grande quantidade de polímero com alto peso molecular^{8,12}. Dentre os principais PHA's produzidos industrialmente estão o P(3HB) e o copolímero P(3HB-co-3HV). O homopolímero P(3HB) tem baixa estabilidade na fusão, pois se decompõe a aproximadamente 200 °C, que é uma temperatura muito próxima à sua temperatura de fusão; é altamente cristalino e relativamente frágil. A incorporação de unidades 3HV, torna o copolímero P(3HB-co-3HV) mais flexível e com maior resistência à ruptura, à medida que aumenta a fração 3-hidroxivalerato. Com o aumento desta fração, ocorre o decréscimo da temperatura de fusão, sem afetar a temperatura de degradação, permitindo melhor processamento térmico do copolímero, o que o torna mais atrativo para produção industrial¹².

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

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

Utilização de substratos de baixo custo na produção de PHA's

O maior obstáculo na comercialização de PHA's é seu alto custo. Segundo Choi e Lee¹³, aproximadamente 40% do total do custo de produção de PHA's são devidos aos custos dos substratos. Assim, para se conseguir reduzir os custos de produção é necessário a utilização de fontes de carbono mais baratas.

Uso de sacarose, melão e açúcar invertido

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

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

dos da fermentação alcoólica, naturais e biodegradáveis, portanto, sem representar impacto ambiental¹⁴.

A única produção industrial de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) a partir de cana-de-açúcar, utilizando essa produção integrada em usina sucroalcooleira, está sendo realizada pela indústria brasileira PHB Industrial S.A. A resina, comercialmente conhecida como Bio Cycle, está sendo produzida em escala-piloto e destinada a universidades, empresas e centros de pesquisa e desenvolvimento. Até 2005, a empresa pretende produzir cerca de 10 mil toneladas por ano. Os custos de produção da PHB industrial são os menores do mundo. Enquanto na Europa o polímero é produzido a US\$ 10-20/kg, no Brasil esses custos estão entre US\$ 2,5 – 5/kg, porém ainda cerca de 4 a 5 vezes o custo dos polímeros convencionais¹⁴⁻¹⁶.

Como *R. eutropha*, o microorganismo utilizado industrialmente, não é capaz de assimilar sacarose, é necessária a inversão prévia deste substrato, o que aumenta os custos de produção. Com o objetivo de desenvolver uma cepa derivada da *R. eutropha* DSM 545 com a capacidade de crescer em meio com sacarose como única fonte de carbono, Fava¹⁷ construiu a cepa *R. eutropha* 290/sac. Os resultados demonstraram a habilidade desta nova cepa em consumir sacarose, embora sua eficiência de crescimento e produção de P(3HB) fosse relativamente inferior em relação ao que é produzido utilizando-se glicose e frutose como substratos. Nos estudos em frascos agitados, utilizando glicose e frutose, foram obtidas velocidade específica máxima de crescimento de 0,29 h⁻¹ e quantidade de P(3HB) equivalente a 79% do peso seco celular, enquanto em sacarose obteve-se velocidade específica máxima de crescimento de 0,24 h⁻¹ e P(3HB) com apenas 58% do peso seco. O autor sugere que novos melhoramentos possam aumentar o desempenho da cepa construída. Em vista do menor custo da sacarose como fonte de carbono, mais estudos com essa cepa poderiam levar a significantes reduções dos custos de produção.

Gomez *et al.*¹⁸ avaliaram a eficiência de produção de PHA's por diversas bactérias gram-negativas, isoladas do solo de plantações de cana-de-açúcar. As culturas foram realizadas sob limitação de nitrogênio e utilizando como carboidratos sacarose, glicose e frutose. Quando foi usada sacarose, alguns microorganismos mostraram valores de rendimento global de carboidrato em produto, $Y_{P/C}^0$, maiores que em glicose e/ou frutose. Os autores explicaram o fato afirmando que a mesma massa de sacarose gera 5% mais acetil-CoA e, por consequência PHA, que glicose e frutose. Entre os microorganismos isolados, a *Burkholderia* sp. IPT 101 foi capaz de acumular 75% do seu peso seco em P(3HB) a partir de glicose mais frutose e 69% a partir de sacarose, com uma eficiência maior que 80% do máximo rendimento teórico, que é de 0,48 g/g quando se utiliza glicose e/ou frutose, de acordo com Yamane¹⁹, e 5% maior, de 0,5 g/g quando se usa sacarose. A bactéria ainda foi capaz de crescer com velocidade específica de crescimento (0,4 – 0,45 h⁻¹), maior que *R. eutropha* (0,3 h⁻¹).

A produção de P(3HB) a partir de hidrolisado de bagaço de cana, resíduo da indústria sucroalcooleira, utilizando *B. sacchari*, também está sendo estudada como forma de reduzir os custos de produção do polímero¹⁶.

Alcaligenes latus é um microorganismo que produz P(3HB) associado ao seu crescimento, mesmo em condições de não limitação de nitrogênio, porém, normalmente produz baixo conteúdo de P(3HB), em torno de 50%²⁰. Wang e Lee²⁰ estudaram o efeito da aplicação de limitação de nitrogênio sobre a produção de P(3HB) por *A. latus* DSM 1123, a partir de sacarose. A limitação de nitrogênio ocorreu quando a concentração de biomassa era de 76 g/L e, ao final da fase de acúmulo, obtiveram 111,7 g/L de biomassa seca, 98,7 g/L de P(3HB), correspondente a 88% e produtividade de 4,94 g/L h. Segundo os autores, esta alta produtividade foi principalmente obtida porque durante a fase de acúmulo, sob limitação de

nitrogênio, não houve crescimento celular, apenas produção de P(3HB).

Melhorias no processo produtivo de P(3HB) por *Alcaligenes latus* DSM 1123 a partir de sacarose como única fonte de carbono, também foram propostas por Grothe *et al.*²¹. Os autores investigaram os efeitos da temperatura, pH inicial, concentração de elementos traços, tipo da fonte de nitrogênio e da razão carbono/nitrogênio (C/N). Nas melhores condições verificadas, obtiveram a produção de 63% de P(3HB) com um coeficiente de conversão de sacarose em biomassa igual a 0,4 kg/kg.

O melaço é um subproduto industrial que tem sido largamente utilizado como fonte de carbono em fermentações com leveduras para produção de álcool²². Além de ser mais barato que a glicose, o melaço contém elementos traços e vitaminas que podem ser usados como potencializadores do crescimento²³.

Melaço de cana foi usado como suplemento nutricional na produção de P(3HB) por *R. eutropha* DSM 545 crescendo em glicose²³. Os autores concluíram que a suplementação com melaço de cana em concentrações de 0,3% maximizou a produção de P(3HB), pois aumentou a formação de biomassa na fase de crescimento não-limitada, resultando em maior quantidade de células para acúmulo de polímero.

Liu *et al.*²² estudaram a produção de P(3HB) por *E. coli* recombinante HMS174/pTZ18u-PHB, utilizando melaço de beterraba hidrolisado como única fonte de carbono. A cultura foi realizada em batelada alimentada e resultou em 39,5 g/L de peso seco celular, 80% de P(3HB) com produtividade de 1 g/L h. Relataram que a concentração de melaço teve efeito significativo na síntese de P(3HB) e no crescimento das células. No estudo, a concentração de melaço no meio foi gradualmente aumentada de 26,5 para 144 g/L. Observou-se que a biomassa residual foi inibida pela alta concentração de melaço, enquanto o conteúdo de polímero aumentou até o final da cultura, ou seja, altas concentrações de melaço resultaram em altos conteúdos de P(3HB).

Pinto²⁴ comparou o crescimento de *R. eutropha* DSM 545 em glicose e em açúcar invertido, em culturas em frascos agitados. Concluiu que as velocidades específicas de crescimento celular obtidas para os dois substratos foram bastante similares, indicando que *R. eutropha* é capaz de se desenvolver tão bem em açúcar invertido quanto em glicose, podendo dessa forma ser um substituto de baixo custo. Confirmando este estudo, Marangoni *et al.*²⁵ encontraram que em açúcar invertido, também em culturas em frascos agitados, a velocidade específica máxima de crescimento de *R. eutropha* DSM 545 foi ligeiramente superior à obtida em glicose.

Uso de soro de leite

Soro de leite é um grande efluente da indústria de laticínios, resultante da fabricação de queijo ou caseína, representando cerca de 80-90% do volume de leite transformado²⁶. Uma vez que o soro de leite é rico em nutrientes, sendo a lactose seu maior constituinte, apresenta-se como outra alternativa de substrato de baixo custo na produção de PHA's.

Wong e Lee²⁶ estudaram a produção de P(3HB) em culturas de alta densidade de células de *Escherichia coli* recombinante GCSC 6576, em batelada alimentada, utilizando soro de leite concentrado como fonte de carbono. Obtiveram 87 g/L de células e 69 g/L de P(3HB), perfazendo um total de 80% de polímero com produtividade de 1,4 g/L h. Apesar de terem obtido valores de concentração e produtividade de polímero menores que com fontes puras de carbono, relataram que sua produção pode ser econômica principalmente se incorporada a uma indústria de laticínios, agregando valor ao efluente. Embora tenham conseguido boas concentrações de P(3HB), o meio de cultura precisava ser constantemente removido, devido à

limitação volumétrica do fermentador causada pela baixa solubilidade da lactose na solução de alimentação (210 g/L), se comparada à da glicose (700 – 800 g/L)²⁶.

Para tentar resolver esse problema de remoção do meio de cultura, Kim²⁷ estudou a produção de P(3HB) por *E. coli* recombinante GCSC 6576 em soro de leite não concentrado, tentando controlar a biossíntese do polímero fazendo com que as células comesçassem a produzir mais cedo durante a cultura e acumulassem mais P(3HB) sem precisar remover o meio de cultura. Assim, realizou fermentações com e sem limitação de oxigênio. Na cultura com limitação obteve 80% de P(3HB) com produtividade de 0,48 g/L h, enquanto na cultura sem limitação obteve 57% de P(3HB) com produtividade de 0,9 g/L h. Embora *E. coli* não necessite de limitação de nutriente para produzir o polímero, na condição de oxigênio insuficiente houve aumento da produção de P(3HB), por diminuição da velocidade de crescimento celular.

No mesmo intuito de desenvolver estratégias para produção de P(3HB) a partir de soro de leite sem remoção do meio de cultura, Ahn *et al.*²⁸ conseguiram resultados ainda melhores. Desenvolveram uma nova estratégia para produção de P(3HB) utilizando *E. coli* recombinante GCSC 4401 crescendo em solução de soro de leite altamente concentrado (280 g/L de lactose), com controle apropriado da concentração de oxigênio dissolvido. Durante a fase inicial ativa de crescimento de *E. coli*, na qual o fornecimento suficiente de oxigênio é importante para conseguir concentrações finais elevadas de células e polímero, mantiveram a concentração de oxigênio dissolvido em 40%. Na fase seguinte, de maior acúmulo de polímero, a concentração de oxigênio dissolvido foi diminuída primeiramente de 40 para 30% e depois para 15%. Dessa forma, obtiveram 119,5 g/L de células, 96,2 g/L de P(3HB) num total de 80% do peso seco, com alta produtividade de 2,57 g/L h, sem remoção do meio de cultura. Os resultados mostraram que altas concentrações de células e polímero podem ser obtidas pela otimização do tempo e forma de redução do oxigênio dissolvido em cultura de *E. coli*, além de demonstrar que P(3HB) pode ser eficientemente produzido a partir de um efluente altamente poluente como o soro de leite.

O crescimento de *R. eutropha* DSM 545 em lactose hidrolisada²⁵ e em soro de leite²⁹ foi investigado. A bactéria mostrou-se capaz de se desenvolver muito bem em ambos substratos, sendo que, em lactose hidrolisada, observaram-se duas fases distintas de crescimento, a primeira correspondente ao consumo de glicose e a segunda, ao consumo da galactose, com velocidades específicas máximas de crescimento de 0,2 e 0,11 h⁻¹, respectivamente. Quando o soro de leite foi utilizado como única fonte inicial de carbono, com adições de açúcar invertido e ácido propiônico, na forma de pulsos, observou-se uma fase de crescimento exponencial, com velocidade específica máxima de 0,23 h⁻¹, bastante similar aos resultados com *R. eutropha* crescendo em outros substratos, como glicose e açúcar invertido. Apesar de ter produzido pouco conteúdo de polímero, em torno de 37%, a fração de unidades 3HV foi bastante elevada, 38%, com rendimento de conversão de propionato em unidades 3HV de 0,22 mol mol⁻¹. Estes resultados sugerem a possibilidade da existência de precursores de 3HV no soro de leite e mostram que o soro de leite é uma alternativa interessante para a produção de PHA's, com composição atrativa comercialmente, também utilizando *R. eutropha*.

Uso de óleos e gorduras

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

Fukui e Doi³⁰ estudaram a capacidade de *R. eutropha* H16 crescer e produzir PHA's a partir de óleos vegetais como óleo de oliva, de milho, dendê e ácido oleico como únicas fontes de carbono. Os

resultados mostraram que a bactéria cresce muito bem nesses substratos, acumulando alto teor de P(3HB), entre 79-82% de seu peso seco.

Utilização de diferentes nutrientes limitantes na produção de PHA's

O acúmulo de polímero pelos microorganismos é favorecido pela limitação de um nutriente como oxigênio, magnésio, potássio, enxofre, nitrogênio ou fósforo⁵. O nitrogênio e o fósforo têm sido os elementos mais estudados como nutrientes limitantes, sendo analisadas tanto estratégias em carência como com alimentação do nutriente na fase de acúmulo, visando a máxima produção de polímero^{8,24,31-35}.

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

O efeito da alimentação de amônia na fase de produção de P(3HB) por *A. eutrophus* H16, em batelada alimentada foi investigado³¹. Quando uma baixa concentração de amônia foi adicionada a uma taxa de 0,00065 g/h, a produtividade de P(3HB) aumentou de 0,1 g/L h para 0,99 g/L h, durante as 10 h em que a amônia foi adicionada. Estes valores são duas vezes maiores que os obtidos sob carência de amônia. Após 29 h de fermentação, cessou-se a adição de amônia sendo que, neste instante, o teor de P(3HB) era 62% do peso seco para a cultura com alimentação e 42,5% para a cultura em carência. Esses resultados mostraram que a alimentação de amônia durante a fase de produção de P(3HB) pode aumentar o acúmulo de polímero. Este trabalho confirma os resultados anteriormente obtidos por Suzuki *et al.*³², em que a alimentação com pequena quantidade de amônia durante a fase de acúmulo, em culturas de *Protomonas extorquens*, resultou em mais rápido aumento do conteúdo de P(3HB) que em culturas com deficiência de amônia. Por outro lado, uma alimentação excessiva de amônia causou não só degradação do P(3HB) acumulado, mas também reduziu a atividade microbiana de síntese do polímero pelo microorganismo.

Estratégias de carência e alimentação com nitrogênio e carência de fósforo durante a fase de produção de P(3HB) por *R. eutropha* DSM 545, em batelada alimentada, foram estudadas por Aragão³³. Com relação ao teor de P(3HB) obteve 51, 73,5 e 60% nas culturas em carência de nitrogênio, alimentação de nitrogênio e carência de fósforo, respectivamente. Por outro lado, os valores de conversão de glicose em polímero e produtividade foram maiores para a cultura em carência de fósforo, obtendo 0,42 g_{P(3HB)}/g_{glicose} e 2,21 g/L h contra 0,33 e 0,31 g_{P(3HB)}/g_{glicose} e 0,45 e 1,16 g/L h para as culturas em carência e alimentação de nitrogênio, respectivamente. O autor considera que a maior produtividade obtida sob carência em fósforo, em relação à carência e alimentação de nitrogênio, se deve ao fato de que o fósforo não participa diretamente da composição de proteínas das células e, dessa forma, sua limitação permite um crescimento celular residual por algum tempo, uma vez que esse elemento faz parte dos intermediários energéticos recicláveis (ATP/ADP), levando a um acréscimo da produção de polímero.

Resultados obtidos por Pinto²⁴, utilizando *R. eutropha* DSM 545 em batelada alimentada, com açúcar invertido como única fonte de carbono, também demonstraram valores de produtividade de P(3HB) maiores nas culturas sob carência/limitação de fósforo que de nitrogênio. No caso da limitação em nitrogênio, assim como Bitar e

Underhill³¹, o autor relata que alimentação controlada durante a fase de produção permitiu obter maior produtividade de P(3HB) que sob carência. Entretanto, as culturas sob carência/limitação de fósforo obtiveram produtividades ainda maiores.

O efeito de várias estratégias de alimentação em nitrogênio na produção de P(3HB-co-3HV) em culturas de *R. eutropha* DSM 545 foi estudado por Aragão *et al.*³⁴. Para a cultura sob carência em nitrogênio obtiveram resultados comparáveis aos de Ramsay *et al.*⁸, ou seja, 5 mol% de 3HV por mol de PHA, enquanto as culturas com alimentação de nitrogênio durante a fase de acúmulo, mostraram-se mais favoráveis à produção do copolímero, com produtividade de 0,72 g/L h, fração de 3HV final de 13 mol% e fator de conversão de ácido propiônico em 3HV de 0,15 mol_{3HV}/mol_{ác. prop.}. O fator de conversão de propionato em 3HV teve valor máximo de 0,4 mol_{3HV}/mol_{ác. prop.} no início da fase de produção, diminuindo continuamente até o final da cultura. A análise do fator de conversão de glicose em polímero, mostrou que uma fração do ácido propiônico poderia, via acetil-CoA, ser convertido em unidades 3HB por vias similares do metabolismo da fonte principal de carbono. Dessa forma, a produção do copolímero foi favorecida pelo uso da estratégia de alimentação de nitrogênio em que o crescimento celular foi mantido, mesmo durante a fase de acúmulo de polímero. Não só as taxas de produção foram melhoradas, como também a composição molar do polímero que obteve maior fração de unidades 3HV.

A utilização de alimentação de fosfato durante a fase de acúmulo de P(3HB-co-3HV), mantendo uma pequena velocidade de crescimento residual (r_x) em *Ralstonia eutropha* DSM 545, de 0,02 gXr/L h, aumentou o conteúdo de polímero acumulado em relação à carência do nutriente³⁵.

A limitação de oxigênio, durante a fase de acúmulo de P(3HB) por *E. coli* recombinante XL1-Blue (pSYL107), contendo genes de biossíntese de PHA de *A. eutrophus*, foi relatada por Wang e Lee³⁶. A cultura em batelada alimentada foi realizada utilizando glicose como fonte de carbono. A concentração de oxigênio dissolvido foi mantida entre 1-3% de saturação de ar durante a fase de acúmulo de P(3HB). Sob essas condições os autores obtiveram 204,3 g/L de concentração de biomassa, 157,1 g/L de P(3HB) correspondente a 77% e produtividade de 3,2 g/L h.

Utilização de culturas com alta densidade de células na produção de PHA's

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

Kim *et al.*³⁷, no intuito de melhorar a produtividade de P(3HB), estudaram a produção de polímero por *R. eutropha* NCIMB 11599, em batelada alimentada com alta densidade de células, utilizando dois métodos para manter a concentração de glicose em um valor ótimo: um método usando a medida da taxa de evolução de CO₂ (CER), em mol/h, por espectrometria de massa para estimar a concentração de glicose e outro, utilizando um analisador de glicose "on-line", que controlava diretamente a concentração de glicose no meio de cultura. Segundo os autores, controlando a concentração de glicose entre 10 - 20 g/L, o crescimento do microorganismo seria otimizado, resultando em produção mais eficiente de P(3HB). Também estudaram o efeito da limitação de nitrogênio em diferentes concentrações de biomassa (30, 55 e 70 g/L) sobre a produção de P(3HB). Encontraram os melhores resultados de concentração de células, de P(3HB) e de produtividade com o analisador de glicose "on-line" e limitação de nitrogênio, quando a biomassa era de 70 g/L. Nessas condições, obtiveram 164 g/L de concentração celular, 121 g/L de P(3HB) correspondente a 76% do peso seco celular, com produ-

tividade de 2,42 g/L, em 50 h. Testaram ainda a limitação de nitrogênio quando a biomassa era de 90 g/L, já que obtiveram os melhores resultados quando a limitação ocorreu na maior concentração de biomassa, porém a cultura mostrou-se instável, com baixa concentração de polímero, devido a causas desconhecidas pelos autores. Uma cultura sem o controle da concentração de glicose também foi realizada para comparação dos resultados. Neste caso, a concentração de glicose esteve entre 0–20 g/L e cada vez que o pH subia rapidamente como sinal da exaustão da glicose, ela era adicionada para voltar a 20 g/L. Dessa forma obtiveram em 44 h, apenas 58 g/L de concentração celular com 10 g/L de P(3HB), sendo que a limitação de nitrogênio ocorreu quando a biomassa era de aproximadamente 45 g/L. Assim, pode-se obter alta concentração e produtividade de P(3HB) em culturas de *A. eutrophus*, controlando a concentração de glicose e o momento da limitação do nutriente.

Culturas de *A. eutrophus* NCIMB 11599 em fermentador de 60 L, regime de batelada alimentada com alta densidade de células, foram estudadas por Ryu *et al.*³⁸. Eles utilizaram limitação em fosfato em vez de nitrogênio e controlaram a concentração de glicose, que ficou entre 0 – 20 g/L, pela concentração de oxigênio dissolvido. Investigaram também o efeito da concentração inicial de fosfato na produção do polímero. Em todos os casos, o teor final de P(3HB) obtido foi de 80% do peso seco celular. Entretanto, a cultura com maior concentração de fosfato inicial, 5,5 g/L, foi a que produziu maior concentração de biomassa e de P(3HB), resultando em 281 g/L de biomassa e 232 g/L de P(3HB) com produtividade de 3,14 g/L h em 75 h. Dessa forma, os autores mostraram que a quantidade de células e P(3HB) produzida pode ser maior com o aumento da concentração inicial de fosfato. Para comparação de resultados, os autores também avaliaram uma cultura nas mesmas condições, porém com limitação em nitrogênio. Entretanto, não conseguiram alta densidade de células devido à significativa lise das mesmas, causada pela toxicidade da solução de NaOH excessivamente adicionada para controle de pH. No caso de limitação em fosfato, a solução utilizada para controle de pH foi amônia e as células mantiveram boas condições durante toda a fermentação, sem lise, o que pode ter contribuído para a produção de P(3HB) com alta produtividade³⁸.

Choi *et al.*³⁹ estudaram a produção de P(3HB) por *E. coli* recombinante XL1-Blue(pJC4) contendo genes de biossíntese de PHA de *A. latus*. A cultura foi realizada em batelada alimentada com glicose como fonte de carbono. Ao final, foram obtidos 194,1 g/L de concentração de biomassa, 141,6 g/L de P(3HB), correspondendo a 73% de polímero, com alta produtividade de 4,63 g/L h. Assim, os autores relataram que *E. coli* recombinante pode ser usada para produção de P(3HB), com alto nível de competitividade econômica.

Produção do copolímero P(3HB-co-3HV)

Uma vez que o P(3HB) é um material rígido e quebradiço, a incorporação de unidades 3HV é responsável pela melhoria das características do copolímero P(3HB-co-3HV). Como resultado da incorporação de unidades 3HV, ocorrem alterações de parâmetros, como níveis de cristalinidade e ponto de fusão, acarretando na diminuição da rigidez do polímero e no aumento da resistência ao impacto. Teores de 3HV entre 17 e 20 mol% permitem a obtenção de um produto com propriedades termoplásticas, que levam à maior aplicação do polímero⁴⁰. A partir de fontes de carbono como glicose e frutose, *Ralstonia eutropha* produz apenas o homopolímero 3HB. Para a produção do copolímero, são necessários precursores como ácido propiônico ou valérico, que podem ser metabolizados a unidades 3HV⁷.

Utilização de ácido propiônico como precursor de unidades 3HV

A produção industrial do copolímero P(3HB-co-3HV) por *R.*

eutropha é feita adicionando-se ácido propiônico à cultura para a incorporação de unidades 3HV. O teor de 3HV incorporado ao polímero é controlado pela variação da razão de glicose e ácido propiônico da alimentação. É necessário um controle apropriado da concentração de propionato adicionado pois, se presente no meio em concentrações maiores que 0,1%, pode ser tóxico ao microorganismo e inibir a síntese do polímero⁷.

Entretanto, a fração de 3HV incorporada ao polímero geralmente é baixa, uma vez que, além de servir como co-substrato para unidades 3HV, o ácido propiônico também pode ser assimilado para o crescimento celular⁴¹. O ácido propiônico é rápida e eficientemente degradado por células bacterianas, e seu uso, durante a fase de multiplicação celular, implica em maior desperdício desse substrato, impedindo que ele cumpra seu principal papel nesse processo, ou seja, a síntese de unidades 3HV¹.

O baixo teor de P(3HB-co-3HV) e produtividade são atribuídos ao efeito tóxico do co-substrato, às estratégias impróprias de alimentação do ácido propiônico⁴² e ao fato de que a maioria dos microorganismos apresenta baixo fator de conversão de ácido propiônico em unidades 3HV⁴³. Vários estudos têm sido realizados no intuito de melhorar a produção de P(3HB-co-3HV). Ramsay *et al.*⁸ estudaram a produção do copolímero por *R. eutropha* DSM 545 a partir de glicose e ácido propiônico, utilizando uma razão de alimentação ácido propiônico/glicose (P/G) constante e igual a 0,33 mol/mol. Obtiveram 17 g/L de P(3HB-co-3HV) contendo 5 mol% de unidades 3HV com produtividade máxima de 0,74 g/L h. Relataram que 0,1 g de monômero de 3HV foram produzidos para cada grama de ácido propiônico metabolizado, correspondendo a uma conversão molar de 0,074 mol_{3HV}/mol_{ác.prop.}

Kim *et al.*⁴⁴ verificaram o efeito do ácido propiônico na produção de P(3HB-co-3HV) por *A. eutrophus* ATCC 17699 a partir de frutose e ácido propiônico, sob limitação de nitrogênio. Relataram que o crescimento microbiano foi completamente inibido em concentrações de ácido propiônico maiores que 1,5 g/L e que a maior velocidade de produção de unidades 3HV (0,06 g/g h) foi obtida quando a concentração de ácido foi de 0,5 g/L. Realizaram culturas em batelada, mantendo essa concentração ótima de ácido propiônico durante a fase de acúmulo, e obtiveram mais de 70% de polímero com fração de unidades 3HV de 50%.

Kim *et al.*⁴⁵ também analisaram a produção de copolímero em batelada alimentada, com controle “on-line” da concentração de glicose. No momento da limitação em nitrogênio, quando a biomassa era de 60-70 g/L, a solução de alimentação foi alterada de glicose para uma mistura de glicose e ácido propiônico com razões P/G constantes variando de 0,17 a 0,52 (mol/mol). As concentrações de biomassa e P(3HB-co-3HV) finais diminuíram conforme aumentou a razão P/G. O teor de P(3HB-co-3HV) e a produtividade também caíram, de 74 para 56,5% e de 2,55 para 1,64 g/L h, respectivamente, com o aumento de P/G. A fração 3HV do copolímero aumentou continuamente até 14,3 mol% com o acréscimo de P/G, entretanto, a conversão de ácido propiônico em 3HV caiu de 0,344 para 0,293 g_{3HV}/g_{ác.prop.}. Estes autores sugeriram que o baixo conteúdo de PHA obtido com o aumento de P/G se deve ao fato de que a maior quantidade de ácido propiônico inibiu a síntese do polímero.

A produção de P(3HB-co-3HV), com *R. eutropha* DSM 545 a partir de glicose e propionato de sódio em batelada alimentada com limitação de nitrogênio e baixa concentração de oxigênio dissolvido, foi estudada por Lefebvre *et al.*⁴⁶. A adição de glicose e propionato de sódio foi feita de maneira descontínua, através de pulsos. Quando o teor de oxigênio dissolvido foi mantido entre 1 e 4% de saturação de ar durante a fase de acúmulo, a fração molar de 3HV obtida no polímero foi de 27-31 mol% e a conversão de propionato em 3HV foi de 0,48 a 0,73 mol_{3HV}/mol_{prop.}, enquanto no experimento controle com 50–70%

de saturação de ar obtiveram-se valores menores, com 21 mol% de 3HV e conversão de propionato em 3HV de $0,25 \text{ mol}_{3\text{HV}}/\text{mol}_{\text{prop.}}$. Ambos experimentos resultaram em teor de PHA de 75–80% do peso seco celular, entretanto, a produtividade foi um pouco menor com a utilização de baixas concentrações de oxigênio dissolvido. Os autores citam que foi anteriormente demonstrado por Doi *et al.*⁴⁷ que, durante a fase de acúmulo do copolímero, *R. eutropha* incorpora o íon propionato, via propionil-CoA a unidades 3HV após sua condensação com acetil-CoA, enquanto as unidades 3HB são formadas pela condensação de duas moléculas de acetil-CoA. No entanto, propionil-CoA pode perder um grupo carbonil gerando acetil-CoA, liberando CO_2 e assim resultando em unidades 3HB. Sendo que essa conversão de propionil-CoA a acetil-CoA requer 1,5 mol de oxigênio por mol de propionil-CoA, Lefebvre *et al.*⁴⁶ sugerem que a baixa concentração de oxigênio dissolvido utilizado no estudo, limitou a descarboxilação do propionil-CoA, fazendo com que melhorasse sua conversão a unidades 3HV. Do ponto de vista econômico, esta estratégia levaria à redução de custos de produção, uma vez que necessitaria de menos aeração durante toda a fase de acúmulo, além de melhorar a conversão de propionato em 3HV, cujo custo é elevado para ser usado para produção de biomassa ou de unidades 3HB.

Marangoni⁴⁸ estudou diferentes estratégias de alimentação de ácido propiônico em diferentes substratos na produção de P(3HB-co-3HV) com *R. eutropha* DSM 545, em batelada alimentada. Quando utilizou soro de leite, a estratégia de alimentação do ácido propiônico por pulsos obteve baixa produtividade porém, com grande fração de unidades 3HV, cerca de 38%, com conversão de propionato em 3HV de $0,22 \text{ mol}_{3\text{HV}}/\text{mol}_{\text{ác. prop.}}$, sugerindo a possibilidade da existência de precursores de 3HV no soro. Com açúcar invertido, utilizou alimentação de ácido propiônico como regulação de pH, em pulsos de 1 g/L e de forma contínua, sendo que as frações molares de 3HV obtidas foram 17,5 e 26 mol% 3HV, respectivamente. Quanto aos fatores de conversão foi obtido $0,03 \text{ mol}_{3\text{HV}}/\text{mol}_{\text{ác. prop.}}$ para as estratégias de regulação de pH e pulsos, e $0,13 \text{ mol}_{3\text{HV}}/\text{mol}_{\text{ác. prop.}}$ para a alimentação contínua, mantendo a concentração de ácido propiônico em 0,4 g/L no meio.

Os efeitos de diferentes estratégias de alimentação de ácido propiônico na produção de P(3HB-co-3HV), com *R. eutropha* a partir de glicose e limitação em nitrogênio, foram estudados por Du *et al.*⁴². Experimentos em frascos agitados revelaram que o momento e a concentração de ácido propiônico adicionado têm efeitos significativos no crescimento celular, na síntese de copolímero e na fração 3HV. Segundo os autores, quando o ácido propiônico foi adicionado muito cedo, na fase de crescimento, inibiu o crescimento celular e o acúmulo de polímero, especialmente em altas concentrações devido ao seu efeito tóxico, resultando em baixas concentrações de biomassa residual e concentração de polímero. Por outro lado, quando a adição foi muito tardia, grande quantidade de P(3HB) já havia sido sintetizada pelas células e a incorporação de 3HV foi relativamente baixa, pois a diminuição da síntese de polímero levou à fraca utilização do ácido propiônico. O momento ótimo de adição do ácido foi, então, no início da limitação de nitrogênio e acúmulo de polímero. Neste caso, houve alta concentração de polímero com alta fração 3HV ao mesmo tempo. Em geral, com o aumento da concentração de ácido adicionado, houve aumento da fração 3HV porém a biomassa residual, a concentração de copolímero produzido e a conversão em unidades 3HV decresceram.

Nos experimentos em batelada alimentada, Du *et al.*⁴² utilizaram a alimentação contínua de ácido propiônico e glicose (P/G) na fase de acúmulo, pois a adição em pulsos poderia causar uma elevada concentração pontual no meio, levando à inibição do crescimento celular e da formação de polímero. A fonte de nitrogênio foi adicionada de forma a manter no meio uma razão carbono/nitrogênio igual

a 50. Dessa forma, utilizaram-se diferentes razões de alimentação P/G. Uma baixa razão P/G=0,1 levou a altas concentrações de biomassa, teor de P(3HB-co-3HV) e produtividade, porém baixa fração de unidades 3HV. Uma maior razão P/G= 0,2, por outro lado, resultou em alta incorporação de unidades 3HV porém, baixo teor de copolímero e produtividade. A velocidade específica de produção de P(3HB-co-3HV) decresceu linearmente com o tempo, sendo que a maior velocidade foi obtida com menor P/G, e a queda de produção mais acentuada ocorreu em maior P/G, quando o acúmulo de ácido no meio pode ter inibido a síntese do polímero. A velocidade específica de formação de 3HV foi maior inicialmente em maior razão P/G, na qual havia mais ácido propiônico inicial para a formação das unidades. Porém, o acúmulo de ácido no meio inibiu a atividade metabólica, resultando em rápido declínio desta velocidade de formação. Os autores relatam que a capacidade das células utilizarem o ácido propiônico decresceu com o tempo, sendo que a alimentação em razões P/G constantes pode resultar em acúmulo de ácido, fato que não só desperdiça substrato caro como também inibe a síntese do polímero. Assim, a partir destes resultados, desenvolveram uma estratégia otimizada para a produção de copolímero. Nas primeiras 10 h de acúmulo, utilizaram a maior razão de alimentação P/G, ou seja, 0,2, nas 15 h seguintes utilizaram P/G = 0,15 e nas últimas 10 h utilizaram P/G = 0,1. Assim obtiveram 52,1 g/L de biomassa, 40,8 g/L de P(3HB-co-3HV), perfazendo um total de 78,3% do peso seco celular e fração molar de 3HV de 16,2 mol% com conversão de $0,38 \text{ mol}_{3\text{HV}}/\text{mol}_{\text{ác. prop.}}$. Dessa forma, a estratégia otimizada levou à minimização do acúmulo de ácido propiônico, aumento do teor de copolímero, da produtividade, com fração de 3HV em teores desejáveis técnica e comercialmente, sendo uma maneira simples e efetiva de produzir o copolímero sem desperdício de ácido propiônico e com redução de custos.

Utilização de suplementos nutricionais

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

Choi e Lee⁴⁹ desenvolveram estratégias de cultura para produção de altas concentrações de P(3HB-co-3HV), com diferentes frações de 3HV por *E. coli* recombinante contendo genes de biossíntese de PHA de *A. latus*. Utilizando apenas glicose e ácido propiônico (20mM), obtiveram baixo teor de PHA (42,5%) com 10 mol% 3HV, conversão de ácido propiônico em 3HV de $0,23 \text{ g}_{3\text{HV}}/\text{g}_{\text{ác. prop.}}$ e grande acúmulo de ácido propiônico no meio, o que pode ter sido a razão para o relativo baixo teor de PHA obtido. Para estimular a assimilação do ácido propiônico, foram feitos experimentos utilizando indução com ácido acético e/ou suplementação com ácido oleico. A indução com ácido acético é a utilização do mesmo como a única fonte de carbono até determinado crescimento microbiano, quando então se adicionam glicose e ácido propiônico. Neste caso, obtiveram 62,1% de PHA com 15,3 mol% 3HV. No caso da suplementação com ácido oleico, os autores relatam a produção de menos polímero (41,8%), porém com maior fração de unidades 3HV (19,3 mol%). Em ambos os casos, mesmo em menor proporção, houve acúmulo de ácido propiônico no meio. Quando utilizaram ácido propiônico na concentração de 10 mM, ácido acético e ácido oleico, obtiveram 71,4% de polímero com 14,8 mol% de 3HV, entretanto, os melhores resultados foram obtidos quando se utilizaram concentrações ainda menores de ácido propiônico (5 mM) para reduzir o acúmulo, além da indução com ácido acético e suplementação com ácido oleico. Neste caso, os autores obtiveram em 55 h, 203,1 g/L de concentração celular, 158,8 g/L de P(3HB-co-3HV) correspondente a 78,2% do peso seco com 10,6 mol% de 3HV. O fator de conversão de ácido propiônico em unidades 3HV obtido foi de $0,47 \text{ g}_{3\text{HV}}/\text{g}_{\text{ác. prop.}}$, com

produtividade de 2,88 g/L h. Assim, usando solução de alimentação com baixa concentração de ácido propiônico, foi possível obter alta concentração e teor de polímero, porém com menor fração de 3HV. A indução com ácido acético aumentou a concentração de células, de polímero e a produtividade, enquanto a suplementação com ácido oleico levou, principalmente, ao aumento da fração 3HV no polímero. A conversão do ácido propiônico em unidades 3HV aumentou bastante com as estratégias utilizadas.

A influência da utilização do ácido oleico como suplemento nutricional na produção de P(3HB-co-3HV) em culturas de *R. eutropha* DSM 545, a partir de açúcar invertido, foi estudada por Marangoni *et al.*⁵⁰. Obtiveram aumento da produtividade do polímero de 0,14 para 0,28 g/L h e, também, aumento de polímero acumulado, de 18,3 para 28,3%, com a suplementação de ácido oleico. Entretanto, ao contrário de Choi e Lee⁴⁹, obtiveram menor fração de unidades 3HV, com igual conversão de ácido propiônico. Assim, relataram que o ácido oleico atuou como indutor de unidades 3HB, já que gera principalmente acetil-CoA, aumentando a produção de polímero, sem alterar a conversão do ácido propiônico.

Utilização de microorganismos recombinantes incapazes de crescer em ácido propiônico

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

Como o ácido propiônico ou o propionato de sódio são bem mais caros que as outras fontes de carbono que podem ser consumidas pelos microorganismos durante a fermentação, a otimização do seu aproveitamento na forma de unidades 3HV no copolímero é de grande importância na redução dos custos de produção⁴³.

Lee *et al.*⁴¹ desenvolveram, a partir de *A. eutrophus* NCIMB 11599, uma cepa mutante *A. eutrophus* BK-23, que é incapaz de assimilar o ácido propiônico para o crescimento celular. As duas cepas foram comparadas quanto à habilidade de acumular P(3HB-co-3HV) e à composição do polímero produzido. Os experimentos foram realizados em batelada alimentada utilizando a razão de alimentação P/G de 0,21 e limitação em nitrogênio. Níveis finais similares de conteúdo de células e de copolímero foram obtidos para as culturas, entretanto, observou-se para a cepa mutante, uma fração de unidades 3HV duas vezes maior (22 mol%), enquanto para a cepa original foi menor que 10 mol%. A taxa de conversão de ácido propiônico em unidades 3HV durante a fase de acúmulo foi de $0,4 \frac{g_{3HV}}{g_{ac. prop.}}$ para a mutante, contra $0,1 \frac{g_{3HV}}{g_{ac. prop.}}$ para a cepa original. Assim, os autores relataram que com essa cepa torna-se possível produzir P(3HB-co-3HV) com maior fração de unidades 3HV, usando menos ácido propiônico.

Em estudo semelhante, Sartori⁵¹ obteve uma cepa mutante *A. eutrophus* UV1, derivada de *R. eutropha* DSM 545, incapaz de crescer em propionato, visando seu melhor aproveitamento para a biossíntese das unidades 3HV do copolímero. A cepa mutante UV1 acumulou 37 mol% de 3HV, enquanto a cepa original acumulou apenas 8,6 mol% e se mostrou capaz de converter 60,7% de todo o propionato fornecido a unidades 3HV, sendo que, nas mesmas condições, a cepa original só converteu 18,5%. Além disso, a cepa mutante ainda mantém, ou até supera, a capacidade de produção de polímero total da cepa original. Dessa forma, esse novo mutante é apresentado como tendo um ótimo potencial de aproveitamento industrial.

Outro microorganismo que está sendo estudado para a produção de PHA's é *Burkholderia* sp⁵². *Burkholderia* sp. IPT 101 é apresentada como boa produtora de polímero, entretanto, a conversão de ácido propiônico em unidades 3HV é restrita a menos de 10% do rendimento máximo teórico, que é de 1,35g 3HV/g ácido propiônico

de acordo com Gomez *et al.*¹⁸. No intuito de aumentar essa eficiência de conversão e utilização do ácido propiônico, Silva *et al.*⁴³ desenvolveram mutantes da *Burkholderia* sp IPT 101 incapazes de crescer em ácido propiônico, mas ainda capazes de acumular unidades 3HV do ácido. A mutante *Burkholderia* sp. IPT 189 e a cepa original foram comparadas crescendo em biorreator com razão de alimentação de ácido propiônico e sacarose (P/S) de 0,44 para a cepa original e de 0,09 para a mutante, já que era esperado que a mutante tivesse melhor utilização do ácido propiônico. Com a mutante IPT 189 obtiveram uma alta taxa de conversão de ácido propiônico em unidades 3HV, de $1,2 \frac{g_{3HV}}{g_{ac. prop.}}$ enquanto para a cepa original obtiveram apenas $0,05 \frac{g_{3HV}}{g_{ac. prop.}}$. Entretanto, as células acumularam pouco polímero, sendo cerca de 50% para a IPT 189 e 65% para a IPT 101. Os autores sugerem que a elucidação dos mecanismos de decréscimo do acúmulo de PHA na cepa mutante pode levar a novos rumos para garantir a redução de custos na produção de P(3HB-co-3HV) usando esta mutante e aplicando estratégias adequadas de cultivo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

1. Gomez, J. G. C.; Bueno Netto, C. L.; *Rev. Bras. Eng. Quím.* **1997**, *17*, 24.
2. Brauneegg, G.; Lefebvre, G.; Genser, K. F.; *J. Biotechnol.* **1998**, *65*, 127.
3. Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y.; *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 1503.
4. Madison, L. L.; Huisman, G. W.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 21.
5. Dawes, E. A.; Senior, P. J.; *Adv. Microbiol. Physiol.* **1973**, *10*, 135.
6. Lee, S. Y.; *Tibtech* **1996**, *14*, 431.
7. Byrom, D.; *Tibtech* **1987**, *5*, 246.
8. Ramsay, B. A.; Lomaliza, K.; Chavarie, C.; Dubé, B.; Bataille, P.; Ramsay, J.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 2093.
9. Brämer, C. O.; Vandamme, P.; Silva, L. F.; Gomez, J. G. C.; Steinbüchel, A.; *Int. J. Syst. Bacteriol. Evol. Microbiol.* **2001**, *51*, 1709.
10. Williams, S. F.; Martin, D. P.; Horowitz, D. M.; Peoples, O. P.; *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *25*, 111.
11. Hänggi, U. J.; *FEMS Microbiol. Rev.* **1995**, *16*, 213.
12. Lee, S. Y.; *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49*, 1.
13. Choi, J.; Lee, S. Y.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 13.
14. Nonato, R. V.; Mantelatto, P. E.; Rossell, C. E.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *57*, 1.
15. <http://www.ipt.br/imprensa/midia/?ID=260>, acessada em Novembro 2002.
16. <http://www.ipt.br/imprensa/midia/?ID=962>, acessada em Novembro 2002.
17. Fava, A. L. B.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1997.
18. Gomez, J. G. C.; Rodrigues, M. F. A.; Alli, R. C. P.; Torres, B. B.; Bueno Netto, C. L.; Oliveira, M. S.; Silva, L. F.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *45*, 785.
19. Yamane, T.; *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *41*, 165.
20. Wang, F.; Lee, S. Y.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 3703.
21. Grothe, E.; Moo-Young, M.; Chisti, Y.; *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 132.
22. Liu, F.; Li, W.; Ridgway, D.; Gu, T.; *Biotechnol. Lett.* **1998**, *20*, 345.
23. Beaulieu, M.; Beaulieu, Y.; Mélinard, J.; Pandian, S.; Goulet, J.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 165.
24. Pinto, R. O.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 1999.
25. Marangoni, C.; Furigo Jr., A.; Aragão, G. M. F.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2001**, *18*, 175.
26. Wong, H. H.; Lee, S. Y.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *50*, 30.
27. Kim, B. S.; *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 774.
28. Ahn, W. S.; Park, S. J.; Lee, S. Y.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3624.
29. Marangoni, C.; Furigo Jr. A.; Aragão, G. M. F.; *Process Biochem.* **2002**, *38*, 137.
30. Fukui, T. E.; Doi, Y.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *49*, 333.
31. Bitar, A. E.; Underhill, S.; *Biotechnol. Lett.* **1990**, *12*, 563.
32. Suzuki, T.; Yamane, T.; Shimizu, S.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1986**, *24*, 366.
33. Aragão, G. M. F.; *These Doctorat*, L'institut National des Sciences Appliquees de Toulouse, France, 1996.
34. Aragão, G. M. F.; Lindley, N. D.; Uribealra, J. L.; Pareilleux, A.; *Biotechnol. Lett.* **1996**, *18*, 937.
35. Squio, C. R.; Marangoni, C.; De Vecchi, C.; Aragão, G. M. F.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 257.
36. Wang, F.; Lee, S. Y.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 4765.
37. Kim, B. S.; Lee, S. C.; Lee, S. Y.; Chang, H. N.; Chang, Y. K.; Woo, S. I.; *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 892.
38. Ryu, H. W.; Hahn, S. K.; Chang, Y. K.; Chang, H. N.; *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *55*, 28.
39. Choi, J.; Lee, S. Y.; Han, K.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 4897.
40. Holmes, P. A.; *Phys. Technol.* **1985**, *16*, 32.
41. Lee, S. Y.; Kim, G. J.; Choi, D. K.; Yeon, B. K.; Park, Y. H.; *J. Ferment. Bioeng.* **1996**, *81*, 255.
42. Du, G. C.; Chen, J.; Yu, J.; Lun, S.; *Biochem. Eng. J.* **2001**, *8*, 103.
43. Silva, L. F.; Gomez, J. G. C.; Oliveira, M. S.; Torres, B. B.; *J. Biotechnol.* **2000**, *76*, 165.
44. Kim, J. H.; Kim, B. G.; Choi, C. Y.; *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14*, 903.
45. Kim, B. S.; Lee, S. C.; Lee, S. Y.; Chang, H. N.; Chang, Y. K.; Woo, S. I.; *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, *16*, 556.
46. Lefebvre, G.; Rocher, M.; Brauneegg, G.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 827.
47. Doi, Y.; Kunioka, M.; Nakamura, Y.; Soga, K.; *Macromolecules* **1987**, *20*, 2988.
48. Marangoni, C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2000.
49. Choi, J. E.; Lee, S. Y.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 4363.
50. Marangoni, C.; Furigo Jr., A.; Aragão, G. M. F.; *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22*, 1635.
51. Sartori, D. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1998.
52. Gomez, J. G. C.; Fontolan, V.; Alli, R. C. P.; Rodrigues, M. F. A.; Bueno Netto, C. L.; Silva, L. F.; Simões, D. A.; *Rev. Microbiol.* **1997**, *28*, 43.