



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



# **Estudo da transferência de oxigênio em cultivo de *Bacillus megaterium***

*Autor: Giulia Carli Lorenzini*

*Orientadora: Profa. Msc. Débora Jung Luvizetto Faccin*

*Co-orientadora: Profa. Dra. Rosane Rech*

Porto Alegre, julho de 2012

<b>Sumário</b>	
<b>Sumário</b> .....	<b>ii</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>iii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>iv</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>v</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>vi</b>
<b>Lista de Símbolos</b> .....	<b>vii</b>
Subíndices .....	viii
Sobreíndices.....	viii
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b> .....	<b>ix</b>
<b>1 Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Objetivos .....	2
1.2 Estrutura .....	2
<b>2 Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>3</b>
2.1 Breve introdução aos processos biotecnológicos.....	3
2.2 Polihidroxialcanoatos: biopolímeros.....	3
2.3 <i>Bacillus megaterium</i> .....	5
2.4 Transferência de massa em biorreatores: transferência de oxigênio .....	7
2.5 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ ) .....	10
2.5.1 Métodos de determinação do $k_La$ .....	11
2.5.2 Fatores que afetam o $k_La$ em biorreatores .....	14
2.5.3 Caminhos metabólicos preferenciais em função do $k_La$ e da OTR.....	18
<b>3 Materiais e Métodos</b> .....	<b>20</b>
3.1 Cultivo de <i>Bacillus megaterium</i> .....	20
3.1.1 Ativação celular e inóculo .....	20
3.1.2 Meio de cultura .....	21
3.1.3 Biorreator .....	22
3.1.4 Esterilização.....	23
3.2 Análises.....	23
3.2.1 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.....	23
3.2.2 Concentração de biomassa .....	26
3.2.3 Análise estatística .....	26
<b>4 Resultados e discussão</b> .....	<b>27</b>
4.1 Crescimento celular e consumo de oxigênio.....	27
4.2 Balanço de massa para o oxigênio: perfil de $pO_2$ e OUR .....	28
4.3 Influência da biomassa no $k_La$ .....	31
<b>5 Conclusões e Trabalhos Futuros</b> .....	<b>34</b>
<b>6 Referências</b> .....	<b>35</b>
<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>39</b>
<b>APÊNDICE B</b> .....	<b>41</b>
<b>ANEXO A</b> .....	<b>45</b>

## **Agradecimentos**

Por haver sido indescritível, agradeço sem mais palavras o apoio das minhas orientadoras Débora Faccin e Rosane Rech.

Do mesmo modo, agradeço aos meus pais, Roberto e Gisele Lorenzini, e à minha família, embora não entre no mérito neste momento agradecer-lhes por tudo que merecem.

Ao Prof. Marco Antônio Záchia Ayub, do ICTA/UFRGS, pela disponibilização do laboratório, equipamentos e materiais necessários à realização deste trabalho.

Ao Alan Budaszewski, pelo carinho e paciência.

Aos amigos engenheiros (ou futuros engenheiros) João Pedro Chagas Zanetti, Carlo Morandi, Alice D'Almeida, Gabriela Stoll, Vanessa Patzer e Mariana Saraiva pelos momentos de angústia e descontração e à Amanda Manke, pela amizade de hoje e sempre.

À equipe do setor de Processo da Unitec, pelo incentivo, conhecimento transmitido e compreensão.

Aos meus orientadores como bolsista de iniciação científica Nádyá Silveira e Maria Lionzo (Instituto de Química/UFRGS) e Oscar Lopez (Departamento de Engenharia Química/UFRGS) e ao CNPq pelas oportunidades de crescimento acadêmico.

Ao Programa Santander/UAM, pelo período de intercâmbio acadêmico.

E, finalmente, à UFRGS e aos seus professores e funcionários, que, ao longo deste período, possibilitaram a mim todo esse processo evolutivo.

## Resumo

O oxigênio é um gás pouco solúvel em água, o que torna sua transferência em um cultivo aeróbio um fator crítico a ser considerado. O coeficiente volumétrico de transferência de massa ( $k_La$ ) é fundamental na avaliação da eficiência da transferência de oxigênio e é, por esse motivo, um dos critérios mais importantes no dimensionamento e escalonamento de um biorreator aeróbio. Esse parâmetro é afetado por diversos fatores, como as condições operacionais e as propriedades do meio de cultivo. No presente trabalho, procurou-se identificar se a biomassa e a concentração desta afetam significativamente os valores de  $k_La$  em um cultivo de *Bacillus megaterium*. Para isso, realizou-se um cultivo batelada com a bactéria *B. megaterium* em um biorreator do tipo tanque agitado de 5 L durante 12 h. Mantiveram-se constantes as condições de temperatura, taxa de aeração, velocidade de agitação e pH do meio. Os valores de  $k_La$  foram determinados periodicamente através do método dinâmico. Através desse método obtiveram-se também os valores de taxa de respiração (OUR – *Oxygen Uptake Rate*) durante o cultivo. A biomassa foi determinada pelo método gravimétrico, nos mesmos intervalos de obtenção do  $k_La$ . Através da análise da curva de crescimento celular, observou-se que o micro-organismo foi inoculado em sua fase exponencial de crescimento, começando a sofrer desaceleração metabólica a partir de 6 h e atingido a fase estacionária em 9 h de cultivo. Não se verificou fase *lag*, nem morte celular durante o cultivo de 12 h. A taxa específica de respiração ( $q_{O_2}$ ) apresentou comportamento típico, com maior atividade metabólica (maiores valores de  $q_{O_2}$ ) durante a fase exponencial e decrescendo juntamente com a desaceleração do crescimento celular. Identificou-se um comportamento anormal na curva de oxigênio dissolvido e de respiração celular (OUR), em 7 h e 8 h. A utilização do método dinâmico para obtenção do  $k_La$  levou o sistema a atingir concentrações de oxigênio muito baixas nos períodos de maior respiração, provavelmente inferiores à concentração crítica para *B. megaterium*. Esse fato ocasionou uma alteração da rota metabólica das células até o restabelecimento do comportamento normal na concentração de oxigênio dissolvido ( $pO_2$ ). Os valores de  $q_{O_2}$  reduziram atipicamente para esta etapa do cultivo, enquanto os de oxigênio dissolvido elevaram-se, indicando uma desaceleração inesperada do metabolismo. Esse resultado demonstrou a limitação da aplicação desse método de determinação do  $k_La$  para o cultivo estudado. O  $k_La$  não foi significativamente influenciado pela presença de biomassa, conforme confirmado por análise de variância. Esse resultado permite a utilização de valores de  $k_La$  que atendam aos interesses do cultivo determina-os previamente para o biorreator sem células. Desse modo, elimina-se a problemática da medição e do controle desse parâmetro durante o cultivo de *B. megaterium*. A constatação do presente estudo permite ainda a desconsideração do fator biomassa em correlações para predição do  $k_La$  nesses cultivos.

## Lista de Figuras

<i>Figura 1: Estrutura genérica de polihidroxicanoatos.</i>	4
<i>Figura 2: Metabolismo central de carbono simplificado para B. megaterium.</i>	5
<i>Figura 3: Rota metabólica para a produção de PHB por B. megaterium.</i>	6
<i>Figura 4: Etapas e resistências associadas na transferência de oxigênio da bolha de gás à célula.</i>	8
<i>Figura 5: Evolução típica da taxa de consumo de oxigênio (OUR), taxa específica de consumo de oxigênio (<math>q_{O_2}</math>) e concentração de oxigênio dissolvido (OD) durante um cultivo aeróbio.</i>	9
<i>Figura 6: Crescimento microbiano em cultivo em batelada.</i>	10
<i>Figura 7: Relação entre OTR, <math>k_La</math> e parâmetros hidrodinâmicos em biorreatores a diversos níveis.</i>	11
<i>Figura 8: Principais métodos para determinação do <math>k_La</math>.</i>	11
<i>Figura 9: Determinação do <math>q_{O_2}</math> e <math>k_La</math> a partir do método dinâmico.</i>	13
<i>Figura 10: Variação da taxa específica de respiração, <math>q_{O_2}</math>, com a concentração de oxigênio, C.</i>	14
<i>Figura 11: Fator de aumento biológico: valores experimentais e estimados em culturas de: a) Xantomonas campestris; b) Rhodococcus erythropolis; c) Candida bombicola em meio de crescimento; d) Candida bombicola em meio de produção.</i>	17
<i>Figura 12: Estudo do <math>k_La</math> e <math>q_{O_2}</math> durante cultivo de células vegetais.</i>	18
<i>Figura 13: Escalonamento para a inoculação do biorreator de 4 L.</i>	21
<i>Figura 14: Biorreator com unidade de controle automático (à direita) e sistema de aquisição de dados (à esquerda) utilizado nos experimentos.</i>	22
<i>Figura 15: Determinação experimental do <math>k_La</math> utilizando o método dinâmico.</i>	25
<i>Figura 16: Curva de crescimento celular de B. megaterium para o cultivo em biorreator (A) e a duplicata (B).</i>	27
<i>Figura 17: Curva da taxa específica de consumo de oxigênio durante cultivo de B. megaterium.</i>	28
<i>Figura 18: Perfil da concentração de oxigênio dissolvido</i>	29
<i>Figura 19: Perfil da taxa de respiração celular durante cultivo de B. megaterium.</i>	30
<i>Figura 20: Variação do <math>k_La</math> durante cultivo de Bacillus megaterium.</i>	31
<i>Figura 21: Concentração oxigênio dissolvido durante aplicação do método dinâmico.</i>	42
<i>Figura 22: Determinação da OUR a partir da seção descendente da curva do método dinâmico.</i>	43
<i>Figura 23: Determinação do <math>k_La</math> a partir do trecho ascendente da curva do método dinâmico.</i>	44

**Lista de Tabelas**

<i>Tabela 1: Composição do meio de cultivo empregado para B. megaterium. ....</i>	21
<i>Tabela 2: Valores controlados para as variáveis de cultivo. ....</i>	23
<i>Tabela 3: Menores medidas registradas na concentração de oxigênio dissolvido para os experimentos A e B. ....</i>	30
<i>Tabela 4: Fator de aumento biológico (E) em um cultivo de B. megaterium.....</i>	32
<i>Tabela 5: Resumo da análise estatística de variância ANOVA fator único. ....</i>	32
<i>Tabela 6: Resultados da análise estatística de variância ANOVA fator único. ....</i>	32
<i>Tabela 7: Biomassa determinada através de peso seco celular durante cultivo de Bacillus megaterium. ....</i>	39
<i>Tabela 8: Taxa de respiração celular obtida pelo método dinâmico ao longo do cultivo de B. megaterium. ....</i>	39
<i>Tabela 9: Taxa específica de respiração obtidas pelo método dinâmico ao longo do cultivo de B. megaterium. ....</i>	40
<i>Tabela 10: <math>k_La</math> determinado pelo método dinâmico durante cultivo de B. megaterium. ...</i>	40
<i>Tabela 11: Aplicação do método dinâmico para determinação do <math>k_La</math> em 5 h de cultivo... </i>	41

**Lista de Símbolos**

$k_L a$	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em meio sem células ( $s^{-1}$ )
$K_L a$	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio na presença de células ( $s^{-1}$ )
$k_L$	Coeficiente de transferência de massa ( $m s^{-1}$ )
$a$	Área interfacial específica ( $m^{-1}$ )
$q_{O_2}$	Taxa específica de consumo de oxigênio ( $s^{-1}$ )
$OTR$	Taxa de transferência de oxigênio ( $g L^{-1} s^{-1}$ )
$OUR$	Taxa de consumo de oxigênio ( $g L^{-1} s^{-1}$ )
$t$	Tempo (s)
$C$	Concentração de oxigênio dissolvido no seio do líquido ( $g L^{-1}$ )
$p_{O_2}$	Concentração de oxigênio dissolvido no seio do líquido em relação à saturação (%)
$X$	Biomassa ( $g L^{-1}$ )
$X_i$	Biomassa no inóculo ( $g L^{-1}$ )
$X_0$	Biomassa inicial no biorreator ( $g L^{-1}$ )
$M$	Massa dos frascos com biomassa (g)
$m$	Massa dos frascos vazios (g)
$F$	Vazão molar ( $mol s^{-1}$ )
$N$	Velocidade do impelidor (rpm)
$Q$	Vazão de ar ( $m^3 s^{-1}$ )
$v_s$	Velocidade superficial de gás ( $= 4Q / (\pi D_t^2)$ ) ( $m s^{-1}$ )
$V$	Volume de líquido no biorreator (L)
$V_i$	Volume do cultivo pelo impelidor ( $m^3$ )
$V_a$	Volume de amostra coletado (L)
$\sigma$	Tensão superficial ( $N m^{-1}$ )
$\mu$	Viscosidade dinâmica (Pa s)
$P_g$	Consumo de potência gasosa (W)
$P_{g_i}$	Consumo de potência gasosa pelo impelidor (W)

$D_i$	Diâmetro do impelidor (m)
$D_t$	Diâmetro do tanque (m)
$Sh^*$	Número de Sherwood modificado ( $= k_L a D_i^2 / D_{O_2}$ ) (adimensional)
$Re_m$	Número de Reynolds modificado (adimensional)
$Sc$	Número de Schmidt ( $= \mu_{ap} / (\rho D_{O_2})$ ) (adimensional)
$Fr$	Número de Froude ( $= D_i N^2 / g$ ) (adimensional)
$D$	Difusividade mássica ( $m^2 s^{-1}$ )

### Subíndices

$O_2$	Oxigênio
$i$	Momento da interrupção da agitação/aeração do biorreator
$o$	Momento da retomada da agitação/aeração no biorreator
$ap$	Aparente

### Sobreíndices

$in$	Relativo à entrada
$out$	Relativo à saída
*	saturação no seio do líquido em equilíbrio com o seio da fase gasosa



## Lista de Abreviaturas e Siglas

Acetil-CoA	Acetil-coenzima-A
F	Valor F do teste F da análise de variância
F <sub>crít</sub>	Valor de F crítico do teste F da análise de variância
gl	Graus de liberdade
OD	Oxigênio dissolvido
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i> (Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento)
OTR	<i>Oxygen Transfer Rate</i> (Taxa de transferência de oxigênio)
OUR	<i>Oxygen Uptake Rate</i> (Taxa de consumo de oxigênio)
P	Valor P ( <i>P-value</i> ) da análise de variância
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Poli(3-hidroxiacetato) ou poli( $\beta$ -hidroxibutirato)
SCP	<i>Single Cell Protein</i> (proteína microbiana)



## 1 Introdução

A utilização da biotecnologia para a produção de bens e serviços remonta às origens da civilização. Porém, esse ramo da ciência vem se destacando cada vez mais pela grande variedade e potencial para a descoberta de novas aplicações e por ser uma fonte de desenvolvimento sustentável.

Entre os processos biotecnológicos de interesse, encontram-se os realizados com micro-organismos aeróbios. Nesses, é de fundamental importância o entendimento e o controle do mecanismo da transferência de oxigênio, a fim de otimizar as condições de determinado cultivo.

Um desses processos consiste na produção de poli(3-hidroxi-butarato), ou PHB, por bactérias *Bacillus megaterium*. Esse poliéster é um biopolímero biodegradável e biocompatível produzido a partir de fontes renováveis. Ele possui características promissoras para a substituição, puro ou com inserção de outros monômeros, de polímeros oriundos do petróleo. A síntese desse material, no entanto, ocorre sob condições bastante específicas de aeração, sendo tanto o excesso quanto a ausência de oxigênio fatores limitantes.

*B. megaterium* é uma bactéria estritamente aeróbia que aceita uma variedade de carboidratos como fonte de carbono, cresce em uma faixa relativamente ampla de temperaturas e possui crescimento acelerado. Tais condições a tornam de grande interesse na produção de PHB. Esse micro-organismo utiliza a rota aeróbia do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, ou ciclo de Krebs, para seu crescimento celular e geração de energia. Já para a produção de PHB, utiliza uma rota alternativa que tem como ponto comum com o ciclo de Krebs a utilização da acetil-coenzima-A (acetil-CoA). Sob condições de limitação de oxigênio, a atividade do ciclo de Krebs diminui e maior quantidade de acetil-CoA pode ser utilizada na síntese de PHB.

Em um cultivo aeróbio como o de *B. megaterium*, um fator crítico a ser avaliado é o suprimento de oxigênio ao cultivo, devido à sua baixa solubilidade na água. O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) é um dos principais parâmetros que quantificam a eficiência da transferência de oxigênio em um biorreator. Por esta razão o  $k_L a$  é um dos, senão o principal, parâmetro de escalonamento, dimensionamento e operação de biorreatores aeróbios.

O  $k_L a$  é afetado por diversos fatores, entre eles, as condições operacionais e as propriedades do meio de cultivo. Geralmente, no estudo de um cultivo celular aeróbio, opta-se por empregar um valor de  $k_L a$  constante durante o tempo, mantendo-se as condições operacionais inalteradas, e igual para o biorreator sem e com células. Há, porém, estudos na literatura provando que não apenas as condições operacionais e as características do meio de cultivo influenciam o valor do  $k_L a$ , mas também a presença e a concentração de biomassa.

Entre os efeitos da biomassa no  $k_L a$  estudados na literatura, encontram-se a alteração de propriedades do meio, a presença física das células como partículas sólidas e a influência da respiração celular. Através dos trabalhos disponíveis, percebeu-se que muitos desses efeitos apontam para direções opostas, podendo ocorrer um aumento ou

um decréscimo do  $k_La$  com a biomassa. Ainda, detectou-se a carência de estudos que avaliem experimentalmente o comportamento do  $k_La$  com a concentração celular.

Por esse motivo, e tendo-se em mente o interesse por *B. megaterium* devido a suas características e produtos, além da importância da transferência de oxigênio para a otimização da produção de PHB, decidiu-se pelo estudo do  $k_La$  durante um cultivo dessas células.

### 1.1 Objetivos

Com o objetivo principal de estudar a transferência de oxigênio, avaliando a influência da presença e da concentração de biomassa no  $k_La$ , durante um cultivo de *B. megaterium*, adotou-se como objetivos específicos:

- Realizar um cultivo batelada de *B. megaterium* em biorreator de bancada tipo tanque agitado;
- Determinar a curva de crescimento celular durante o cultivo de *B. megaterium* por análises da concentração de biomassa através de medidas gravimétricas (medidas de peso seco);
- Avaliar a variação de oxigênio dissolvido durante um cultivo de *B. megaterium*;
- Obter a taxa de respiração (OUR) e a taxa específica de respiração ( $q_{O_2}$ ) durante um cultivo de *B. megaterium*;
- Determinar os valores de  $k_La$  periodicamente através de método dinâmico, testando a aplicabilidade desta técnica;
- Relacionar os valores de  $k_La$  com a presença e a quantidade de biomassa e com a taxa de respiração específica das células.

### 1.2 Estrutura

Este trabalho está dividido em seis capítulos, dois apêndices e um anexo. No Capítulo 1, introduziu-se o tema da pesquisa, incluindo as motivações e objetivos do estudo. O Capítulo 2 contempla uma análise da literatura com breves revisões sobre: biotecnologia, polihidroxicanoatos, mais especificamente PHB e sua produção pelo micro-organismo de interesse, *B. megaterium*, transferência de oxigênio em cultivos e o  $k_La$ , além das variáveis que afetam e podem ser afetadas por esse parâmetro em um bioprocessamento. O Capítulo 3 reúne a descrição dos experimentos realizados e materiais utilizados. Também nesse são detalhadas as determinações e análises efetuadas. No Capítulo 4, são apresentados os resultados obtidos juntamente com sua interpretação e discussão. Finalmente, o Capítulo 5 reúne as conclusões observadas e proposições para trabalhos futuros.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Breve introdução aos processos biotecnológicos

Biotecnologia, em uma definição genérica da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OECD, 2005), consiste na aplicação da ciência e tecnologia a organismos vivos, bem como partes, produtos e modelos, para alterar materiais vivos e não vivos, visando à produção de conhecimentos, bens e serviços.

A aplicação industrial da Biotecnologia envolve fundamentalmente conhecimentos de Biologia, Química e Engenharia. A transferência para larga escala dos processos biotecnológicos e a sua otimização são atributos da Engenharia Bioquímica através da aplicação dos conhecimentos da Engenharia Química (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

As origens da biotecnologia datam de cerca de 10.000 anos atrás, com o início de plantios e criações animais. Há cerca de 6.000 anos já se conheciam produtos alimentícios obtidos a partir de processos microbiológicos. Mais recentemente, contudo, a partir da década de 1960, uma “nova” biotecnologia tomou forma. Esta evolução engloba o uso de processos celulares e biomoleculares para solucionar problemas e gerar produtos de interesse (LITTLEHALES e MASSEY, 2007).

Atualmente, importantes aplicações biotecnológicas são empregadas nos setores agropecuário, alimentício, sanitário, ambiental e industrial (BORZANI *et al.*, 2001). Entre alguns produtos desse último, estão os biocombustíveis, antibióticos, alimentos e bebidas fermentados, plantas modificadas geneticamente, plásticos biodegradáveis, etc. (WAITES *et al.*, 2001; LITTLEHALES e MASSEY, 2007).

Neste contexto, os processos industriais biotecnológicos que envolvem o cultivo de células microbianas aeróbias ou aeróbias facultativas possuem grande destaque. Entre eles, encontram-se (HOCKING, 2005):

- Produção de *single cell protein* (SCP) ou proteína microbiana, isto é, síntese de biomassa de leveduras a partir de hidrocarbonetos;
- Oxidação seletiva de hidrocarbonetos específicos empregados como substrato;
- Produção de aminoácidos, vitaminas, antibióticos e ácidos orgânicos.

Os cultivos aeróbios em larga escala ocorrem geralmente em biorreatores do tipo tanque agitado (CSTR), em meio líquido, envolvendo um sistema trifásico sólido-líquido-gasoso. Nesses, o fator limitante decisivo é o fornecimento de ar ao meio, devido à baixa solubilidade do oxigênio em água (HOCKING, 2005). Desta forma, esses processos demandam o dimensionamento do sistema para a adequada transferência de oxigênio da fase gasosa para a líquida, onde será consumido pelas células.

### 2.2 Polihidroxialcanoatos: biopolímeros

Um grupo de produtos de destaque biotecnológico são os biopolímeros (DANIELL e GUDA, 1997), entre os quais se encontram os polihidroxialcanoatos (PHAs) (BYROM, 1987; WAITES *et al.*, 2001).

Poli(hidro)alcanoatos são uma família de poliésteres produzidos e armazenados por diversas bactérias, tanto aeróbias quanto anaeróbias, como reserva de carbono e energia (ANDERSON e DAWES, 1990; VERLINDEN *et al.*, 2007). Esses biopolímeros podem ser processados como polímeros petroquímicos, porém apresentando uma série de vantagens. Além de serem biodegradáveis e biocompatíveis, os PHAs provêm do metabolismo microbológico, uma fonte renovável.

O primeiro PHA identificado foi o poli(3-hidroxi-butirato), ou PHB, em um trabalho de Lemoigne datado de 1926. Esse composto foi encontrado como uma reserva de carbono em bactérias *Bacillus megaterium*. Desde então, foram identificados mais de cem ácidos hidroalcanóicos como monômeros precursores de poliésteres bacterianos, os quais possuem a estrutura genérica apresentada na Figura 1 (BRAUNEGG *et al.*, 1998; YU, 2007).

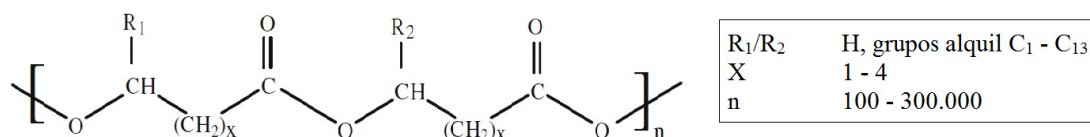


Figura 1: Estrutura genérica de poli(hidro)alcanoatos.

Fonte: adaptado de Valappil *et al.* (2007)

Poli(3-hidroxi)alcanoatos) ou poli(β-hidroxi)alcanoatos), em especial PHB, são os PHAs mais comuns, e possuem X=1. PHB puro é composto por monômeros com um grupo metila como cadeia lateral (BRAUNEGG *et al.*, 1998). Estudos sobre diferentes aplicações do PHB, inclusive comerciais, em substituição aos plásticos provenientes do petróleo foram apresentados por Holmes (1985), Byrom (1987), Anderson e Dawes (1990), Waites *et al.* (2001), Volova *et al.* (2003), Bucci *et al.* (2005), entre outros.

Em seu estudo, Reyes *et al.* (1997) isolaram e identificaram bactérias para a produção de PHB em amostras de solo das Filipinas. Os grânulos de polímero observados apareceram como inclusões com coloração marrom para preto dentro de células rosa avermelhadas. As células foram mantidas em estado de privação, o que se mostrou eficiente para manter a capacidade de síntese do biopolímero. Entre as células isoladas, *B. megaterium* mostrou-se promissora para a produção de PHB.

Semelhantemente, Yilmaz *et al.* (2005) realizaram estudo comparativo da produção de PHB por bactérias do gênero *Bacillus*, a maioria isolada de amostras de solo da Turquia, entre as quais *B. megaterium*. Esta espécie apresentou rendimento de PHB entre 5,6 % e 12,4 % de seu peso seco celular. O maior rendimento (41,7 %) obteve-se para *B. subtilis*.

Entre as vantagens representadas pelo cultivo de *B. megaterium*, estão seu rápido crescimento, a aceitação de diversas fontes de carboidratos, a utilização destas fontes de carbono mesmo em condições não otimizadas e a relativamente ampla faixa de temperaturas ótimas em que crescem (30 °C a 40 °C) (REYES *et al.*, 1997). Ainda, Reyes *et al.* (1997) constataram maior rendimento em PHB em um menor período de síntese que para bactérias *Alcaligenes eutrophus*.

### 2.3 *Bacillus megaterium*

*Bacillus megaterium* é uma bactéria gram-positiva (WAITES *et al.*, 2001). Esta espécie é estritamente aeróbia e formadora de esporos (REYES *et al.*, 1997), estruturas resistentes a condições adversas que representam uma vantagem para a sobrevivência e disseminação do micro-organismo. Espécies de *Bacillus* produzem endósporos cilíndricos ou ovais (WAITES *et al.*, 2001).

O metabolismo central de carbono de *B. megaterium* consiste da glicólise, via das pentoses-fosfato e ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ou ciclo do ácido cítrico ou, ainda, ciclo de Krebs). A Figura 2 representa estas rotas metabólicas simplificada.

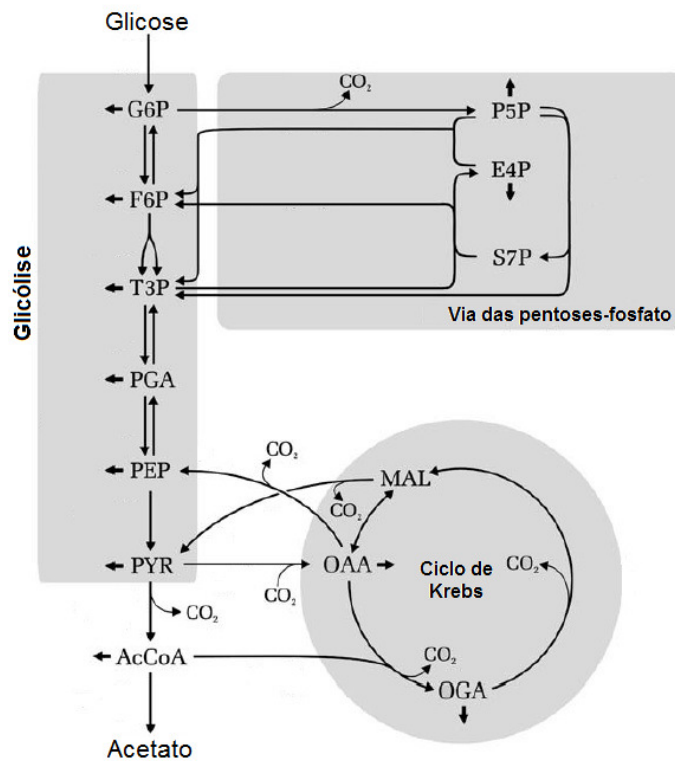


Figura 2: Metabolismo central de carbono simplificado para *B. megaterium*.

Fonte: adaptado de Fürch *et al.* (2007)

Nesse metabolismo, a acetil-coenzima-A (acetil-CoA) pode tanto ser oxidada através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, quanto ser utilizada como substrato para a produção de PHAs, dependendo das condições de cultivo (ANDERSON e DAWES, 1990). Conforme a Figura 3, durante o crescimento celular normal, a enzima 3-cetotiolase será inibida pela coenzima-A livre vinda do ciclo de Krebs. Porém, quando a entrada da acetil-CoA no ciclo de Krebs é restringida por alguma limitação de nutrientes, excetuando-se limitação de carbono, o excesso desta é direcionado para a biossíntese de PHB. A rota metabólica para produção de PHB não envolve oxigênio molecular ( $O_2$ ), podendo ocorrer na limitação desse (VERLINDEN *et al.*, 2007).

Devido ao PHB ser praticamente insolúvel em água, pode ser acumulado em grandes quantidades como grânulos dentro das células. Com base nesse fato, Macrae e Wilkinson (1958) discutiram a possibilidade de que o PHB tenha o papel de reserva de carbono e fonte energética.

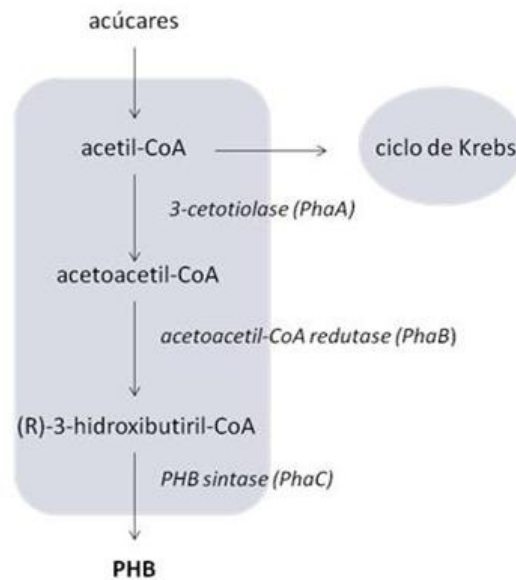


Figura 3: Rota metabólica para a produção de PHB por *B. megaterium*.  
Fonte: Verlinden et al. (2007)

Os mesmos autores compararam diversas fontes de carbono na produção de PHB por *B. megaterium* e *B. cereus*, obtendo maior rendimento em polímero para a glicose. A adição de acetato de sódio aumentou significativamente a produção de PHB, já a adição de fontes de nitrogênio e magnésio resultaram em pequena inibição da produção. A síntese máxima de PHB deu-se em pH aproximadamente 7,5.

Ainda nesse mesmo estudo, foi demonstrado que a produção de PHB por *B. megaterium* e *B. cereus* é inibida por altas concentrações de oxigênio e que a síntese em *B. megaterium* também não ocorre em condições anaeróbicas. Verificou-se que a produção de PHB foi maior com ar que com oxigênio puro. Ao testar misturas de oxigênio e nitrogênio de composições variáveis, os autores encontraram uma concentração ótima para a síntese do biopolímero a 5 % (v/v) de oxigênio.

Estudos mais detalhados da regulação da síntese de PHB tendo glicose como fonte de carbono foram realizados para *Azobacter beijerinckii*. Esta espécie acumula o polímero apenas sob limitação de oxigênio, quando a razão NADH/NAD aumenta (ANDERSON e DAWES, 1990).

Os estudos de Slepecky e Law (1961) demonstraram que para cepas de *B. megaterium* formadoras de esporos o metabolismo de síntese e utilização de PHB foi atingido na fase estacionária, com formação de poucos esporos (menos de 1 %). Em condições adversas à síntese, a quantidade de polímero formado foi significativamente menor e o pico de produção ocorreu durante a fase exponencial de crescimento. A esporulação superou 90 % nestas condições. No caso em que as células estão fortalecidas com polímero, ou as condições para seu rápido consumo não são favoráveis, ocorre uma lenta utilização do PHB como fonte de carbono e reserva energética, sem tendência a esporular. Caso contrário, com escassez de polímero ou condições para seu rápido consumo, ocorre o consumo da fonte de nutriente endógena no processo de esporulação, o qual demanda energia. Glicose e acetato foram favoráveis para produção de polímero.



Semelhantemente, Vazquez *et al.* (2003) observaram que o acúmulo de PHB em *B. megaterium* aumentava a partir da metade da fase de crescimento exponencial até a fase estacionária. Os autores concluíram que o acúmulo de polímero e a expressão da enzima fosfotransbutirilase possivelmente estão incluídos no sistema de regulação global característico do estado transiente da bactéria, anterior à esporulação. O PHB, como fonte de energia e reserva de carbono, permitiria que os micro-organismos permanecessem durante mais tempo no estado vegetativo, sob a forma de esporos.

Muitos dos estudos citados demonstraram a importância da regulação do processo de transferência de oxigênio nos cultivos de *B. megaterium*, a fim de maximizar a obtenção do produto de interesse. Portanto, é fundamental entender e controlar o mecanismo de transporte de oxigênio nesses cultivos.

#### 2.4 Transferência de massa em biorreatores: transferência de oxigênio

A transferência de oxigênio da fase gasosa para o meio de cultivo líquido e dentro desse até ser consumido pelas células é uma etapa crítica e limitante dos processos biotecnológicos aeróbios. Isto se deve à baixa solubilidade do oxigênio em água: a concentração de saturação do gás dissolvido, a 35 °C, ao se borbulhar ar a 1 atm, é de apenas 7 mg L<sup>-1</sup> (SCHMIDELL *et al.*, 2001). O estudo da transferência de oxigênio é, portanto, fundamental para a correta seleção, projeto e escalonamento de biorreatores.

O processo de transferência de oxigênio da fase gasosa em que se encontra ao micro-organismo respirante pode ser entendido como uma série resistências de diferentes magnitudes associadas a cada etapa do transporte de massa, conforme representado na Figura 4. Comumente, admite-se que a principal destas resistências encontra-se na película líquida estagnada ao redor da bolha de ar (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009).

A concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida adequadamente agitada ( $C$ ) é dada pelo balanço material nesta:

$$\frac{dC}{dt} = OTR - OUR \quad (1)$$

onde  $C$  é a concentração de oxigênio dissolvido em g L<sup>-1</sup>;  $t$  é o tempo em s;  $OTR$  (*Oxygen Transfer Rate*) é a taxa de transferência de oxigênio em g L<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> e  $OUR$  (*Oxygen Uptake Rate*) é a taxa de consumo de oxigênio pelas células em g L<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>.

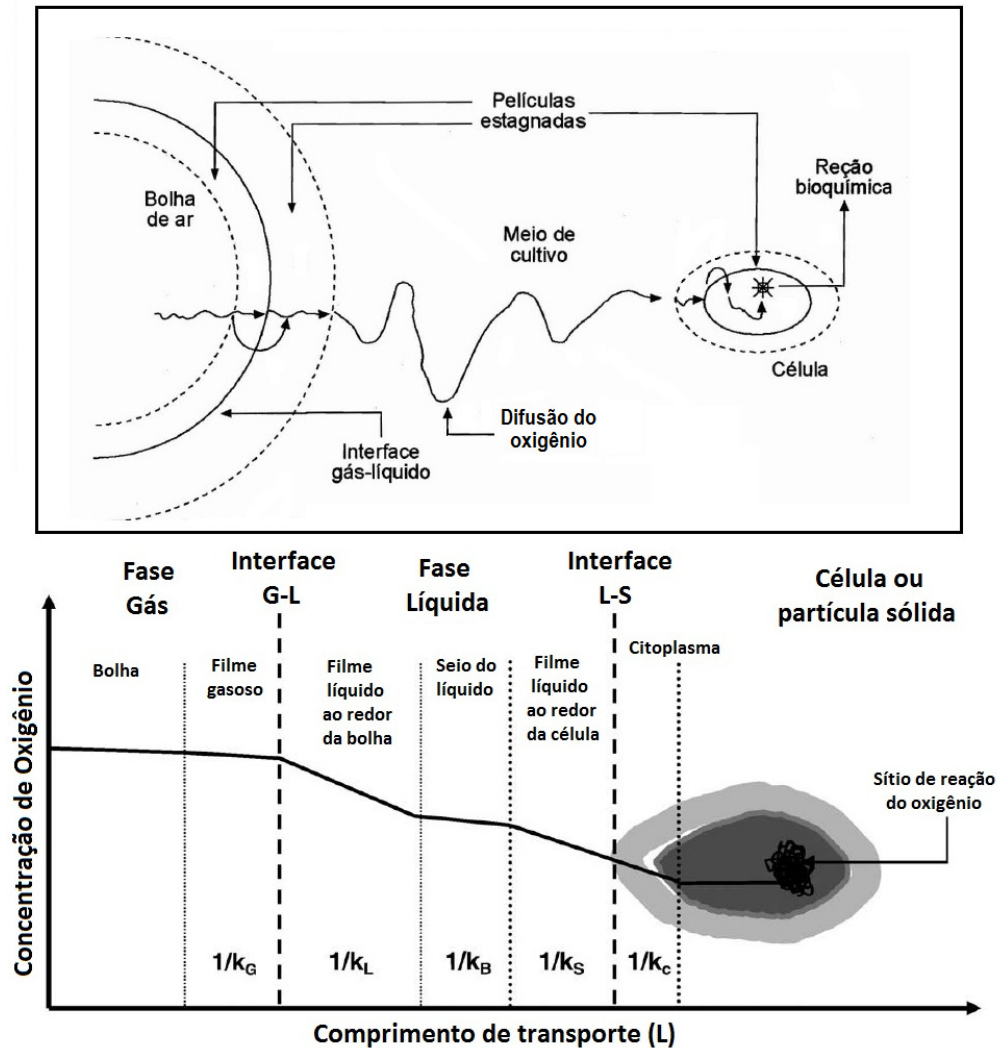


Figura 4: Etapas e resistências associadas na transferência de oxigênio da bolha de gás à célula.

Fonte: adaptado de Schmidell et al. (2001) e Garcia-Ochoa e Gomez (2009)

A OTR, como discutido, é governada pela resistência à transferência de massa na película líquida estagnada ao redor da bolha de gás. Desse modo, sua equação pode ser simplificada para:

$$OTR = k_L a (C^* - C) \quad (2)$$

onde  $C^*$  é a concentração de saturação do oxigênio no seio do líquido em equilíbrio com o seio da fase gasosa, para uma determinada temperatura, em  $g L^{-1}$ ;  $C$  é a concentração de oxigênio dissolvido no seio do líquido em  $g L^{-1}$ ;  $k_L$  é o coeficiente de massa local em  $s^{-1}$  e  $a$  é a área da interface gás-líquido por unidade de volume do líquido em  $m^{-1}$ .

A obtenção dos parâmetros  $k_L$  e área interfacial  $a$  individualmente é bastante complexa. Portanto, costuma-se englobar ambos em um único parâmetro,  $k_L a$ , determinado mais facilmente. O produto  $k_L a$  é denominado coeficiente volumétrico de

transferência de oxigênio. Segundo a Equação (2), a força motriz da OTR é o gradiente de concentração entre a interface gás-líquido e o seio do líquido, sendo  $k_L a$  a constante de proporcionalidade. Quando o  $k_L a$  é obtido em um sistema com células respirantes, costuma-se empregar a notação  $K_L a$ .

Já a OUR é dada pelo produto entre a taxa específica de consumo de oxigênio ( $q_{O_2}$ ) e a concentração de células ( $X$ ):

$$OUR = q_{O_2} X \quad (3)$$

A OUR pode ser medida, fornecendo importantes informações sobre a atividade metabólica das células. O  $q_{O_2}$  é específico para cada micro-organismo e usualmente é considerado constante durante o crescimento celular, apesar de que os resultados experimentais não concordem com esta prerrogativa (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2010). Uma curva típica da OUR,  $q_{O_2}$  e concentração de oxigênio dissolvido (OD) são apresentados na Figura 5.

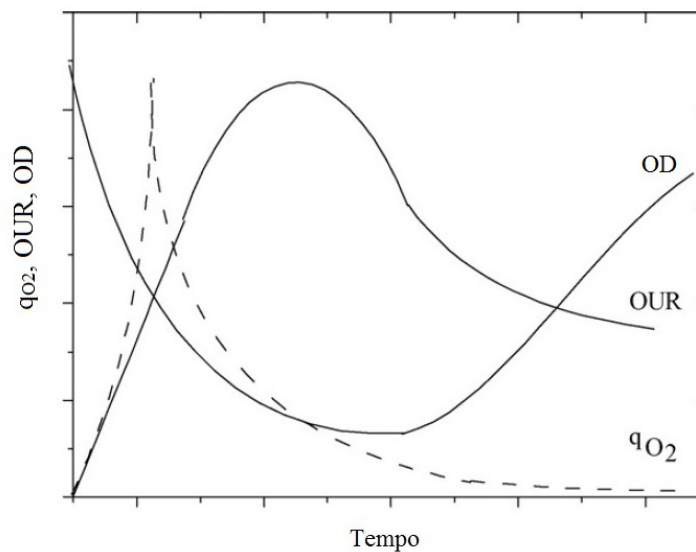


Figura 5: Evolução típica da taxa de consumo de oxigênio (OUR), taxa específica de consumo de oxigênio ( $q_{O_2}$ ) e concentração de oxigênio dissolvido (OD) durante um cultivo aeróbio.

Fonte: adaptado de Garcia-Ochoa *et al.* (2010)

Quando os micro-organismos encontram-se na fase exponencial de crescimento, a atividade metabólica é maior, portanto os valores de  $q_{O_2}$  e OUR aumentam, enquanto o OD diminui. Uma curva típica de crescimento celular ( $\log(X)$  versus tempo) que demonstra a evolução da biomassa ( $X$ ) em um cultivo e as fases do metabolismo microbiano é representada na Figura 6.

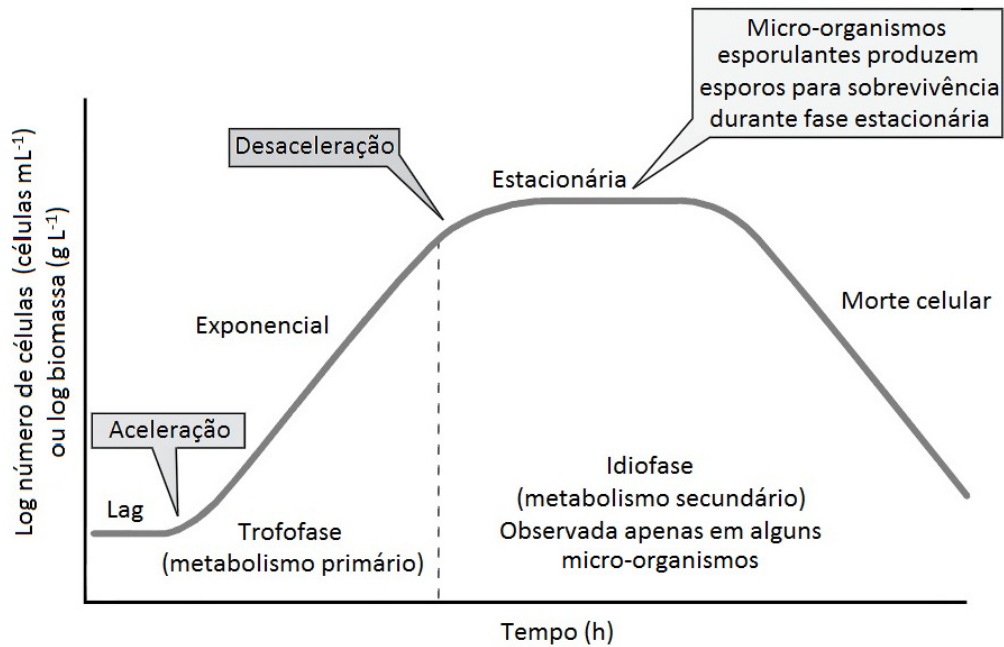


Figura 6: Crescimento microbiano em cultivo em batelada.  
 Fonte: adaptado de Waites et al. (2001)

## 2.5 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ )

O conhecimento do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) em biorreatores aeróbios é essencial para estabelecer a eficiência da aeração e quantificar o efeito das variáveis operacionais no fornecimento de oxigênio dissolvido (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009). A utilização do  $k_L a$  como critério de escalonamento de biorreatores é, desse modo, de grande importância nos processos aeróbios.

O  $k_L a$  é afetado por diversos fatores, entre os quais:

- Características geométricas e operacionais do biorreator (GALACTION *et al.*, 2003);
- Composição do meio (JAMNONGWONG *et al.*, 2010), incluindo propriedades como a viscosidade e a adição de substâncias (antiespumantes, surfactantes, etc.) (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009);
- Temperatura (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009);
- Tipo, concentração e morfologia dos micro-organismos presentes (GALACTION *et al.*, 2003).

O fluxograma da Figura 7 relaciona esquematicamente diversos fatores que afetam o  $k_L a$  e a OTR a diferentes níveis em um bioprocessamento.

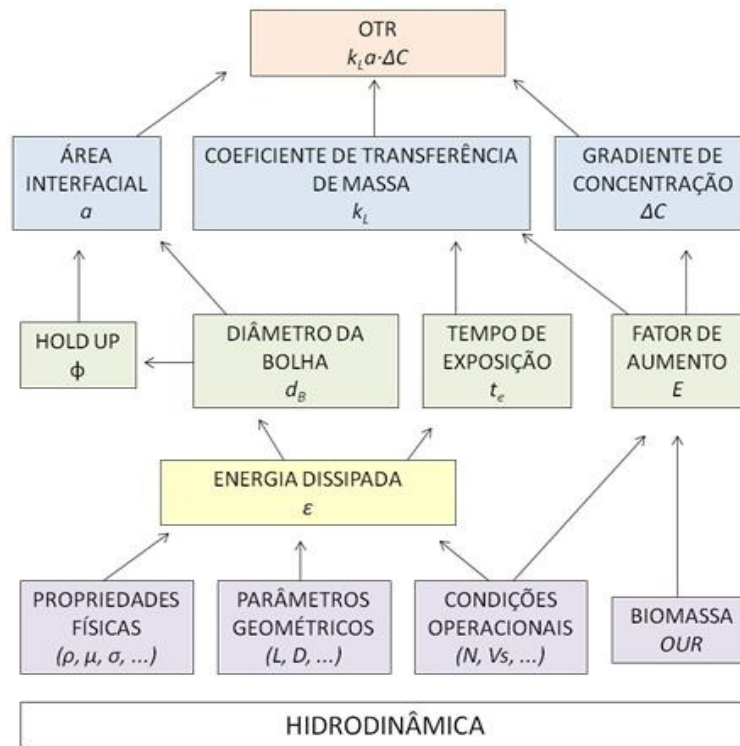


Figura 7: Relação entre OTR,  $k_L a$  e parâmetros hidrodinâmicos em biorreatores a diversos níveis.

Fonte: adaptado de Garcia-Ochoa (2009)

### 2.5.1 Métodos de determinação do $k_L a$

De acordo com o método empregado para obtenção do  $k_L a$ , podem ser obtidos valores distintos (POULIOT *et al.*, 2000; GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009). Entre os métodos, existem os que são aplicáveis a biorreatores sem consumo biológico de oxigênio (sem células respirantes) e os realizados durante um bioprocessamento. Os métodos podem ainda ser subdivididos em químicos e físicos. Alguns dos principais métodos foram reunidos por Garcia-Ochoa e Gomez (2009) e são apresentados esquematicamente na Figura 8.

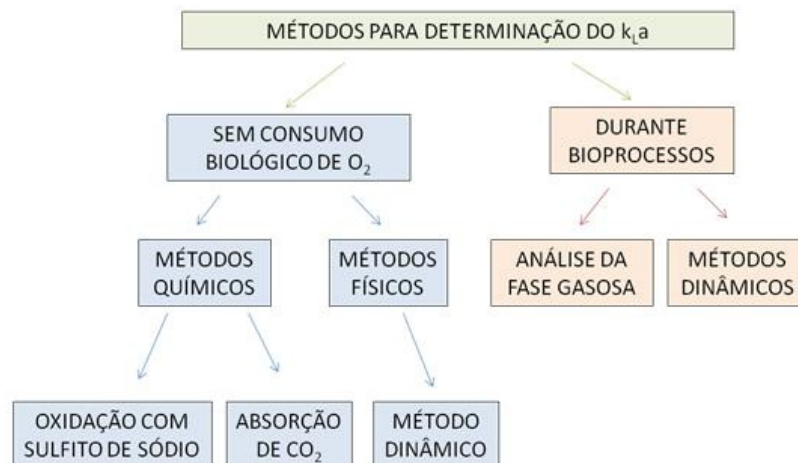


Figura 8: Principais métodos para determinação do  $k_L a$ .

Apesar de terem sido os primeiros métodos a se tornarem amplamente aceitos, os métodos químicos para a determinação do  $k_La$  possuem a desvantagem de alterar a fluidodinâmica do sistema devido à adição de compostos químicos. Entre os métodos físicos, os mais comumente empregados para obtenção do  $k_La$  durante um bioprocessamento em que ocorre consumo de oxigênio são:

a) Análise da fase gasosa (balanço da de gás):

Nesta técnica, utilizam-se analisadores de oxigênio para medir a concentração desse gás na entrada e na saída do processo, juntamente com um eletrodo que realiza a medida do valor de oxigênio dissolvido no líquido. Através do balanço de massa para o oxigênio, obtém-se a equação que permite determinar o valor do  $k_La$ :

$$k_La = \frac{F_{O_2}^{in} - F_{O_2}^{out}}{V(C^* - C)} \quad (4)$$

Onde  $F_{O_2}^{in}$  e  $F_{O_2}^{out}$  são as vazões molares de oxigênio medidas na entrada e na saída do biorreator, respectivamente, e  $V$  é o volume do biorreator.

Esse método requer uma boa agitação para a sua aplicação. Ainda, se a OUR for muito baixa, a variação da concentração de oxigênio entre as correntes gasosas de entrada e de saída do bioprocessamento será muito pequena, devendo ser empregados analisadores mais sensíveis. Para biorreatores muito grandes e, conseqüentemente, com elevada força motriz ( $C^* - C$ ) para a transferência de oxigênio, pode-se aproximar esta força pela média logarítmica entre os valores de concentração de oxigênio na entrada e na saída da corrente gasosa.

b) Método dinâmico

O método dinâmico é um método simples, relativamente acurado e amplamente empregado para a determinação do  $k_La$  durante um cultivo (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009) em razão da sua praticidade e reprodutibilidade.

Esta técnica, proposta por Bandyopadhyay e Humphrey (1967), consiste na interrupção da aeração e agitação no momento do cultivo em que se deseja determinar o  $k_La$ . Esta interrupção é temporária e deve durar poucos minutos para não afetar o processo (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009). A concentração de oxigênio dissolvido, monitorada por um eletrodo imerso no biorreator, diminuirá com uma taxa igual ao seu consumo devido à respiração celular. Esta queda é linear e permite a obtenção da OUR a partir do seu coeficiente angular em um gráfico de concentração de oxigênio dissolvido versus tempo, conforme a Figura 9.

Ao religar a agitação e a aeração, a concentração de oxigênio volta a subir. A determinação do  $k_La$  é realizada empregando-se a equação obtida a partir do balanço material para o trecho ascendente de concentração de oxigênio dissolvido:

$$\ln \left( \frac{C_i - C}{C_i - C_0} \right) = k_La(t - t_0) \quad (5)$$

onde  $C_i$ ,  $C_0$  e  $C$  são, respectivamente, as concentrações de oxigênio dissolvido antes da interrupção da agitação/aeração, no momento em que é retomada a agitação/aeração (tempo  $t_0$ ) e em um tempo  $t$  durante a etapa de absorção de oxigênio pelo meio, conforme a Figura 9.

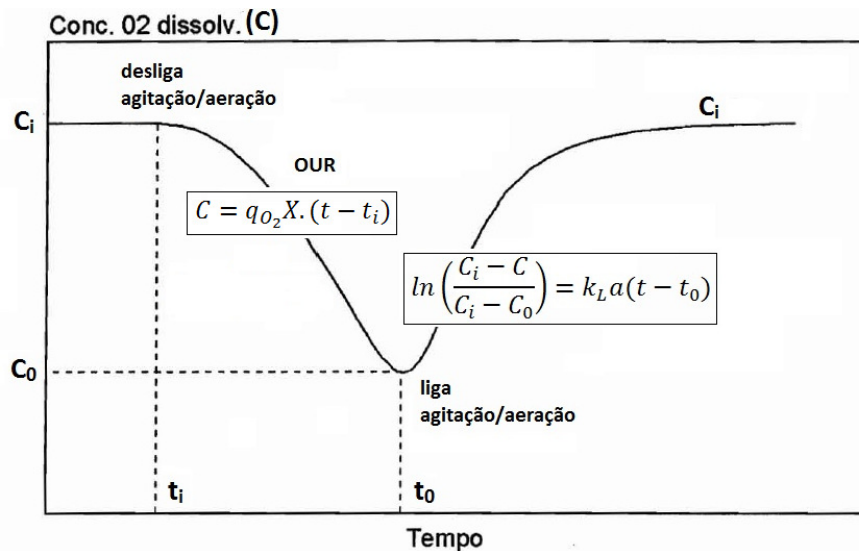


Figura 9: Determinação do  $q_{O_2}$  e  $k_L a$  a partir do método dinâmico.

Fonte: adaptado de Schmidell et al. (2001)

Esse método assume que a taxa de utilização de oxigênio pelas células não é afetada pela ausência de borbulhamento de ar e de agitação, nem pela menor concentração de oxigênio dissolvido no meio.

Uma variação desse método consiste na desoxigenação do meio pelo borbulhamento de um gás, como nitrogênio. Esta técnica é conhecida como método dinâmico *gassing-out* (RIET, 1979) e é aplicado para determinar o  $k_L a$  quando não há consumo biológico de oxigênio.

O procedimento utilizado para o método dinâmico pode ser empregado diversas vezes durante um cultivo, porém possui limitações a serem consideradas:

- **Decantação celular:** com a interrupção total tanto da aeração quanto da agitação, as células tendem a decantar no biorreator. Desse modo, o consumo de oxigênio torna-se maior no fundo do sistema e não é corretamente medido pelo eletrodo, localizado próximo ao meio do reator. Para contornar esse problema, Pouliot *et al.* (2000) introduziram uma pequena modificação na técnica. Os autores mantiveram uma agitação reduzida (30 rpm) apenas para manter as células em suspensão ao interromper a aeração.
- **Tempo de resposta dinâmica do eletrodo:** a resposta dinâmica do eletrodo deve ser considerada para a correta determinação do  $k_L a$ , caso o tempo característico do eletrodo de oxigênio seja da ordem de magnitude do tempo característico do processo de transferência de oxigênio ( $1/k_L a$ ) (POULIOT *et al.*, 2000; GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009).

- **Concentração crítica de oxigênio:** Para que não haja limitação de oxigênio no cultivo, deve ser mantida uma concentração superior à concentração crítica para cada micro-organismo. A concentração crítica é definida como o valor acima do qual a velocidade específica de respiração ( $q_{O_2}$ ) é constante e máxima, conforme ilustra a Figura 10 (DORAN, 1995; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

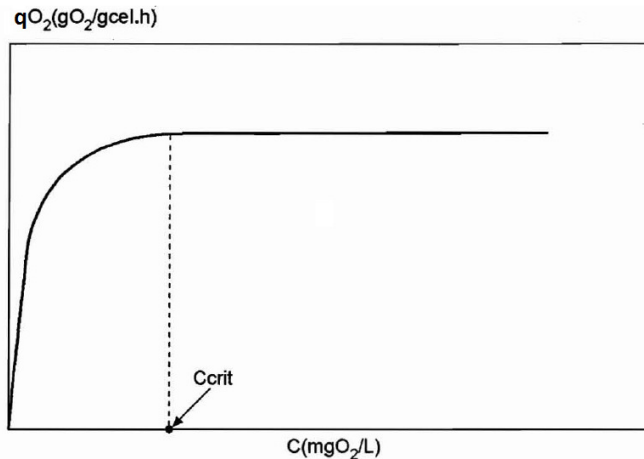


Figura 10: Variação da taxa específica de respiração,  $q_{O_2}$ , com a concentração de oxigênio,  $C$ .

Fonte: retirado de Schmidell *et al.* (2001)

Badino Júnior *et al.* (2001) observaram que esse método somente é útil quando a concentração de oxigênio dissolvido é significativamente maior do que o valor crítico. Para valores inferiores, métodos alternativos, como o método de balanço de gás, seriam mais apropriados para a determinação do  $k_La$ .

Por sua vez, Gomez *et al.* (2006a) aplicaram um método dinâmico modificado, introduzindo uma etapa anterior de passagem de oxigênio puro, devido às baixas concentrações desse gás atingidas em um cultivo de *Pseudomonas putida*.

### 2.5.2 Fatores que afetam o $k_La$ em biorreatores

O  $k_La$  pode ser afetado tanto por variáveis operacionais e propriedades do meio de cultivo quanto pela presença de biomassa, de diferentes maneiras.

- a) Efeito de variáveis operacionais, parâmetros geométricos e propriedades físicas do meio de cultivo no  $k_La$

Atualmente, a literatura apresenta uma grande quantidade de estudos a respeito dos efeitos de variáveis operacionais de biorreatores do tipo tanque agitado no  $k_La$ , entre elas, velocidade de agitação e taxa de aeração (AHMAD *et al.*, 1994; GARCÍA-OCHOA e GÓMEZ, 1998; SCHMIDELL *et al.*, 2001; DEMIRTAS *et al.*, 2003; GOMEZ *et al.*, 2006a; GOMEZ *et al.*, 2006b).

Demirtas *et al.* (2003) observaram que, em um cultivo da bactéria *Thermus thermophilus*, o  $k_La$  é afetado principalmente pela velocidade de agitação, aumentando juntamente com esta. Da mesma forma, ocorreu aumento do  $k_La$  com maiores taxas de aeração, porém menos significativamente. Conseqüentemente, também a OTR eleva-se com o aumento desses parâmetros.



Ahmad e colaboradores (1994) obtiveram conclusões semelhantes em uma fermentação com *Candida utilis*. Os autores observaram a elevação da OTR com a agitação e a aeração até valores-limite. Concluiu-se nesse estudo que maiores velocidades de agitação causam a quebra das bolhas de ar, aumentando a área de transferência de massa, e criam condições turbulentas que favorecem a mistura. O tempo de residência das bolhas no reator também sofre um acréscimo. Em velocidades muito elevadas de agitação, porém, ocorre danificação celular, diminuição da taxa de respiração e, conseqüentemente, a força motriz para a transferência de oxigênio. Já maiores taxas de aeração provocam o aumento da área interfacial específica ( $a$ ).

Além da agitação e da aeração, propriedades do meio de cultivo, como a viscosidade aparente, também afetam a OTR. No caso da viscosidade, seu aumento está relacionado a uma maior resistência à transferência de oxigênio, verificando-se queda do  $k_La$  em cultivos de maior viscosidade (BADINO JÚNIOR *et al.*, 2001).

García-Ochoa e Gómez (1998) estudaram a influência de diversos parâmetros no  $k_La$  em solução de goma xantana, obtendo uma correlação em que o aumento da agitação, velocidade superficial de gás e diminuição da viscosidade efetiva do líquido levam ao aumento do  $k_La$ . Os autores sugeriram que a diminuição na efetividade da transferência de oxigênio em função do aumento da viscosidade pode ser causada pela queda do grau de turbulência. Esta queda causaria o aumento do tamanho de equilíbrio dinâmico das bolhas de gás, diminuindo o  $k_La$ .

Correlações para o  $k_La$  em função de variáveis operacionais (velocidade de agitação, taxa de aeração e consumo de potência gasosa), parâmetros geométricos (volume do cultivo, diâmetro do impelidor) e propriedades físicas dos cultivos (viscosidade aparente e tensão superficial) foram reunidas e ajustadas a dados experimentais por Badino Júnior *et al.* (2001). Estas correlações estão presentes no Anexo I deste trabalho.

#### b) Efeito da biomassa no $k_La$

Encontra-se ainda escasso material na literatura que investigue experimentalmente o efeito da presença e concentração de células aeróbias no  $k_La$ . Sabe-se que as células podem afetar a transferência de oxigênio em um cultivo basicamente de três formas distintas: alterando propriedades do meio; pela simples presença como partículas sólidas de quantidade variável durante um cultivo e através do consumo de oxigênio dissolvido no meio (JU e SUNDARARAJAN, 1994). Os estudos disponíveis revelam que esses fatores podem afetar o  $k_La$  de diferentes formas, tornando de difícil previsão a influência da biomassa nesse parâmetro.

##### b.1) Modificações metabólicas do meio

Tanto a morfologia e o crescimento da biomassa durante o cultivo quanto os produtos por ela sintetizados podem alterar propriedades do meio e, conseqüentemente, o  $k_La$ .

Badino Júnior *et al.* (2001) demonstraram que durante um cultivo de *Aspergillus awamori*, ocorreu aumento da viscosidade aparente e, com isso, redução dos valores de  $k_La$ . Também foi observado um modesto comportamento ascendente da tensão superficial relativa para o mesmo período, provavelmente devido ao consumo de nutrientes dissolvidos do meio de cultura original.

Por outro lado, há estudos que identificaram a diminuição das bolhas de ar durante o cultivo e, desse modo, o aumento da área interfacial gás-líquido específica e do  $k_La$  (JU e SUNDARARAJAN, 1994). Ho e colaboradores (1995) sugeriram que a liberação de substâncias semelhantes a surfactantes pela cultura celular, como proteínas, poderia ter reduzido a tensão superficial interfacial e causado um aumento dos valores de  $k_La$ .

#### b.2) Presença física das células como partículas sólidas

A presença de biomassa simplesmente em sua condição de partículas pode ter efeitos contrários no  $k_La$ . Deve-se ressaltar que o número de células varia durante as fases de um cultivo, alterando a magnitude desta influência.

Ju e Sundararajan (1994) estudaram a influência de células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) inativas na transferência de oxigênio a diferentes concentrações celulares, velocidades de agitação e taxas de aeração. Os valores de  $k_La$ , determinados pelo método dinâmico, foram até 30 % inferiores na presença de células em comparação com o respectivo meio filtrado. Esse efeito foi explicado como um bloqueio físico da interface gás-líquido pelas células, que possuem menor permeabilidade ao oxigênio que o meio líquido. O efeito bloqueador aumentou com a concentração de células. Também ocorreu aumento do bloqueio com maiores velocidades de agitação e com menores taxas de aeração, pois quanto menores as bolhas geradas, maior era a captura celular em sua interface. Galaction *et al.* (2004) confirmaram estas observações.

Já Andrews e Fonta (1984a) reportaram o chamado “*snowball effect*” (efeito bola de neve, em inglês) em cultivos de *Escherichia coli* conduzidos na fase estacionária. Esse estudo mostrou que a grande concentração de materiais surfactantes existentes no cultivo na fase estacionária e adsorvidos às bolhas de gás não era suficiente para imobilizar a interface gás-líquido. Teoricamente, esta imobilização deveria ocorrer devido ao contrabalanceamento entre as forças exercidas pelo líquido e a pressão superficial dos surfactantes. Porém, no trajeto percorrido pela bolha, células chocam-se contra ela, adsorvendo-se e movimentando sua interface. O movimento interfacial acarreta um aumento na eficiência de captura celular e mais células são adsorvidas, gerando o efeito bola de neve, até a interface tornar-se completamente móvel. As células acumulam-se próximo ao ponto de estagnação inferior, portanto, assim como o efeito bloqueador da biomassa, o aumento químico produzido pelo aumento da taxa de respiração na interface gás-líquido possui pouca influência na taxa de transferência total de oxigênio. Esse efeito hidrodinâmico é igualmente importante para células mortas ou partículas inertes e provoca o aumento no coeficiente de transferência de massa (ANDREWS e FONTA, 1984b).

#### b.3) Respiração celular e o fator biológico de aumento (E)

A presença de células pode afetar o  $k_La$  e a OTR devido à respiração dos microorganismos (OUR) acumulados na interface gás-líquido. Para quantificar o aumento do  $k_La$  com a respiração celular, definiu-se um fator de aumento biológico ( $E$ ), como a razão entre o fluxo de absorção de oxigênio na presença de uma terceira fase dispersa (células, neste caso),  $K_La$ , e o fluxo de absorção sem esta,  $k_La$ , sob as mesmas condições hidrodinâmicas e mesma força motriz para a transferência de massa (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009):

$$E = \frac{K_L a}{k_L a} \quad (6)$$

Em geral, apesar da influência da biomassa no  $k_L a$ , assume-se  $E = 1$ .

Gomez *et al.* (2006a) obtiveram estimativas do fator  $E$  durante um cultivo de *Pseudomonas putida*. Observou-se o aumento de  $E$  com a concentração de biomassa, indicando que, sob estas condições, o transporte de massa está acompanhado de uma grande OUR.

A Figura 11 apresenta resultados semelhantes (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009). Os valores de  $E$  menores que 1 indicam que a transferência de massa é acompanhada por uma lenta OUR e uma maior resistência ao transporte. Há uma série de resistências envolvidas que foram consideradas no modelo para a estimativa de  $E$  em biorreatores, conforme descrito pelos autores.

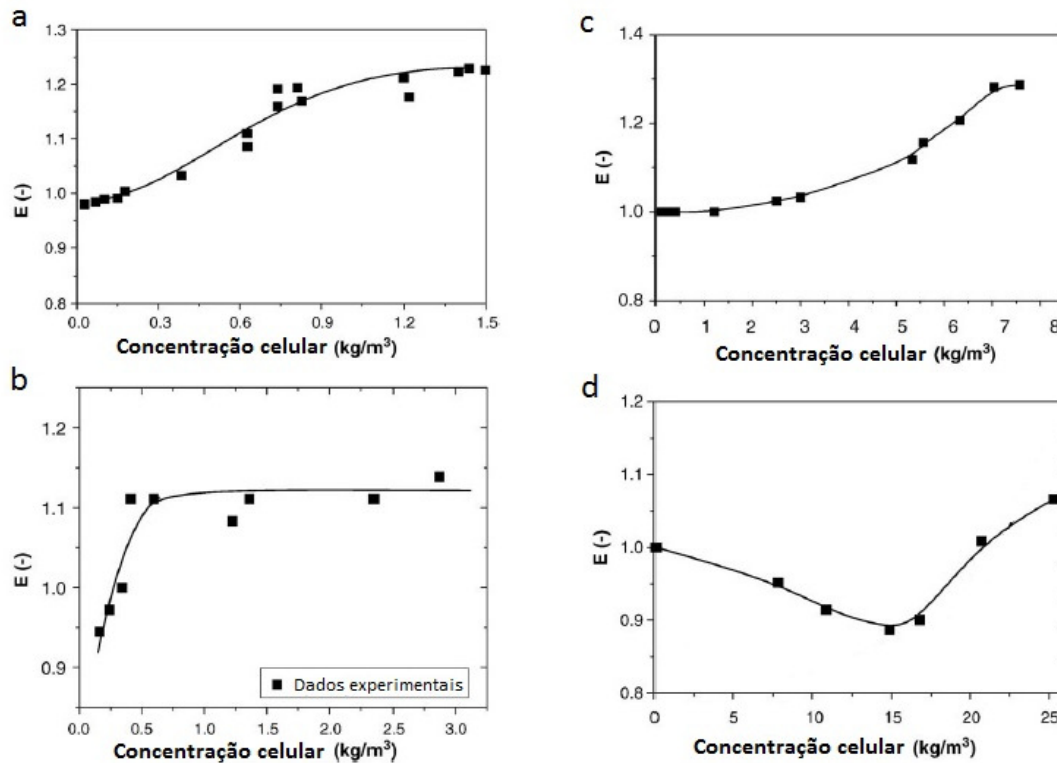


Figura 11: Fator de aumento biológico: valores experimentais e estimados em culturas de: a) *Xantomonas campestris*; b) *Rhodococcus erythropolis*; c) *Candida bombicola* em medio de crescimento; d) *Candida bombicola* em meio de produção.

Fonte: adaptado de Garcia-Ochoa *et al.* (2009)

Ho *et al.* (1995) determinaram periodicamente o  $k_L a$  durante cultivos de células vegetais de tabaco para diferentes velocidades de agitação e obtiveram resultados similares. Observou-se que, no início do cultivo, quando a concentração celular ainda estava relativamente diluída, os valores de  $k_L a$  se aproximaram dos valores para o biorreator sem células. Durante o princípio da fase exponencial de crescimento, porém, esse valor cresceu entre 10 % e 20 %. Sugeriu-se que esse aumento tenha decorrido do contato direto das células com as bolhas de ar, conforme Andrews e Fonta (1984b), ou da redução na tensão superficial interfacial entre as bolhas e o meio líquido, devido à

liberação de substâncias semelhantes a surfactantes (proteínas, etc.) pelas células. Após o começo da fase exponencial de crescimento, o  $k_La$  diminuiu com o aumento da densidade celular até estabilizar na fase estacionária. Esses resultados aparecem na Figura 12, juntamente com curva  $q_{O_2}$ , a qual apresentou o comportamento típico descrito por Garcia-Ochoa e colaboradores (2010).

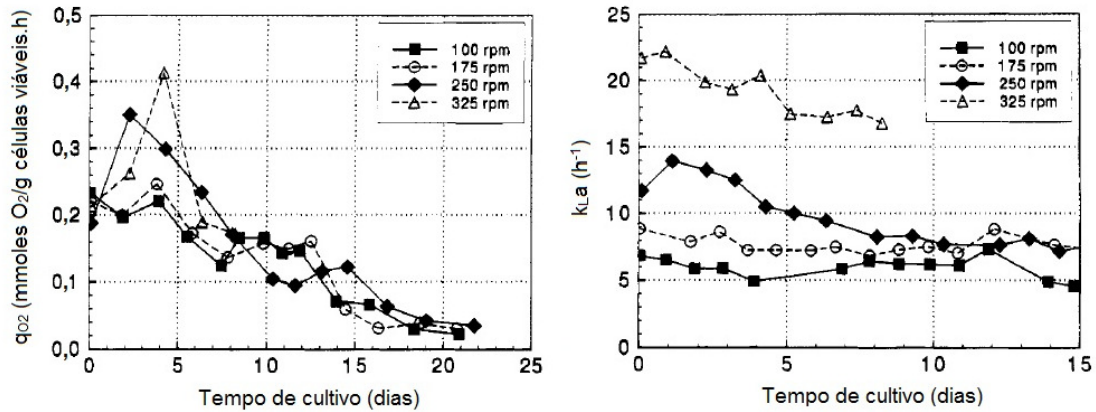


Figura 12: Estudo do  $k_La$  e  $q_{O_2}$  durante cultivo de células vegetais.

Fonte: adaptado de Ho et al. (1995)(HO et al., 1995)

Pouliot *et al.* (2000), por outro lado, observaram que valores de  $k_La$  obtidos durante um cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* e tratados através de técnicas de reconciliação de dados se mantiveram relativamente constantes.

### 2.5.3 Caminhos metabólicos preferenciais em função do $k_La$ e da OTR

Dependendo da transferência de oxigênio em um biorreator, o metabolismo celular pode ser deslocado para uma ou outra rota metabólica preferencial, alterando, desta forma, os produtos obtidos.

Schirmer-Michel *et al.* (2008) demonstraram a influência das condições de aeração como um fator chave na bioconversão de xilose para diferentes produtos (etanol, xilitol ou biomassa). O fornecimento de oxigênio e os valores de  $k_La$  foram modificados através do emprego de diferentes taxas de aeração e de velocidades de agitação. Em condições aeróbias, as bactérias *Candida guilliermondii* priorizaram a produção de biomassa a partir de hidrolisado de casca de soja; sob anaerobiose, obteve-se etanol com altos rendimentos; e, sob limitação de oxigênio (microaeração), grande parte da xilose foi convertida a xilitol com glicerol como coproduto. No trabalho, ressaltou-se a importância do controle do fornecimento de oxigênio para otimizar a obtenção do produto desejado.

Gomez *et al.* (2006a) observaram a influência das condições de transferência de oxigênio no crescimento celular e na capacidade de biodessulfurização de dibenzotiofeno de *Pseudomonas putida*. A concentração de oxigênio dissolvido no cultivo é o resultado das duas taxas opostas, OUR e OTR, e foi variada através do emprego de diferentes velocidades de agitação. Uma alta concentração de oxigênio dissolvido aumentou a taxa de crescimento de biomassa, enquanto uma queda na capacidade de dessulfurização foi verificada.

Como já citado anteriormente, o trabalho de Macrae e Wilkinson (1958) permitiu estabelecer os efeitos da concentração de oxigênio dissolvido no metabolismo de *B.*

*megaterium*. Enquanto altas concentrações inibiram a síntese de PHB, menores concentrações favoreceram a produção do biopolímero. No entanto, a limitação de oxigênio pode resultar na esporulação das bactérias (WU *et al.*, 2001), havendo o consumo de PHB (SLEPECKY e LAW, 1961). Não houve síntese de PHB em condições anaeróbias. Pandian *et al.* (2010) e Kulpreecha *et al.* (2009) também observaram a indução do acúmulo de PHB em limitação de oxigênio.

Através desses estudos percebe-se a importância do estudo do  $k_La$  como variável para o controle da transferência de oxigênio em um cultivo e, por conseguinte, para a otimização da obtenção do produto de interesse.

### 3 Materiais e Métodos

Os experimentos deste estudo foram realizados no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS).

No presente trabalho, avaliou-se a influência da presença de biomassa, mais especificamente de bactérias *Bacillus megaterium*, e de sua fase de crescimento na transferência de oxigênio através do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ). Para isto, realizou-se um cultivo de 12 h em batelada em um biorreator tipo tanque agitado. Foi realizada uma duplicata do cultivo. Denominou-se os dois cultivos de A e B, respectivamente. Determinou-se periodicamente o valor do  $k_L a$ , taxa de respiração celular (OUR) e a concentração de biomassa ( $X$ ). Os testes foram realizados conforme descrito abaixo.

#### 3.1 Cultivo de *Bacillus megaterium*

##### 3.1.1 Ativação celular e inóculo

O micro-organismo empregado foi *Bacillus megaterium* DSMZ 32<sup>T</sup> fornecido pelo Laboratório de Bioprocessos da COPPE/UFRJ através do Prof. D.Sc Tito Lívio Moitinho Alves.

As células foram mantidas congeladas a -18 °C em microtubos Eppendorf contendo solução crioprotetora (20 % em volume de glicerol). O estoque foi renovado a cada 6 meses até a utilização dos micro-organismos.

Para a reativação celular a fim do seu emprego como inóculo no biorreator, realizou-se o cultivo das células em frascos cônicos contendo meio mineral com as mesmas concentrações de fonte de carbono e de nitrogênio utilizadas no biorreator. Os frascos de pré-inóculo foram mantidos durante 18 h em estufa incubadora rotatória a 160 rpm e temperatura de 30 °C.

Para obtenção do inóculo, 2 % (v/v) do conteúdo do frasco cônico foi transferido para outro frasco contendo mesmo meio de cultivo. Esse inóculo foi mantido por aproximadamente 5 h nas mesmas condições de agitação e temperatura anteriores, a fim de atingir a fase de crescimento exponencial. Utilizou-se 2 % (v/v) desse inóculo para o cultivo em biorreator de maior escala. A Figura 13 apresenta o procedimento de escalonamento realizado.

Os micro-organismos previamente reativados e em sua fase exponencial de crescimento foram utilizados como inóculo no biorreator, eliminando a necessidade da fase de adaptação (fase *lag*) das células a esse. Para garantir esta etapa do crescimento, realizaram-se medidas da concentração celular por densidade óptica anteriormente à inoculação do biorreator.

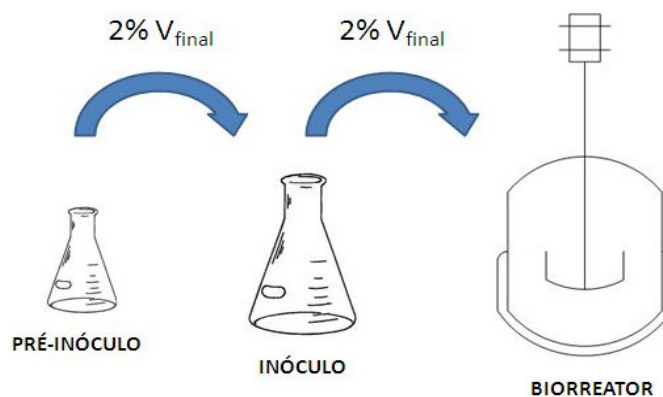


Figura 13: Escalonamento para a inoculação do biorreator de 4 L.

Durante esses procedimentos, procurou-se manter condições estéreis a fim de evitar uma possível contaminação do cultivo.

### 3.1.2 Meio de cultura

Utilizou-se como meio de cultivo o meio mineral proposto por Wang e Lee (1997) acrescido de 1 mL de solução de micronutrientes a cada litro. A fonte de carbono empregada foi sacarose e a de nitrogênio, sulfato de amônio. O pH inicial foi ajustado para 7,0 através da correção com ácido ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  2M) ou álcali ( $\text{NaOH}$  2M). A fonte de nitrogênio só foi adicionada minutos antes da adição do inóculo no biorreator. As concentrações de todos os componentes do meio de cultivo encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Composição do meio de cultivo empregado para *B. megaterium*.

Meio mineral	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,008 g L <sup>-1</sup>
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	3,6 g L <sup>-1</sup>
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5 g L <sup>-1</sup>
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g L <sup>-1</sup>
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 g L <sup>-1</sup>
Ácido Cítrico	0,1 g L <sup>-1</sup>
Solução de micronutrientes	1 mL L <sup>-1</sup>
Solução de micronutrientes	
$\text{H}_3\text{BO}_3$	300 mg L <sup>-1</sup>
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200 mg L <sup>-1</sup>
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30 mg L <sup>-1</sup>
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	30 mg L <sup>-1</sup>
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	30 mg L <sup>-1</sup>
$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30 mg L <sup>-1</sup>
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10 mg L <sup>-1</sup>
Fonte de Carbono e Nitrogênio	
Sacarose (fonte de Carbono)	16 g L <sup>-1</sup>
Sulfato de Amônio (fonte de Nitrogênio)	2 g L <sup>-1</sup>

### 3.1.3 Biorreator

Os cultivos foram realizados em batelada em biorreator experimental tipo tanque agitado (CSTR) de 5 L de volume (4 L de volume útil). Utilizou-se o equipamento BIOSTAT® B (B. Braun Biotech International Co.). O vaso feito de vidro conta com prato de topo de aço inox com entradas para os eletrodos de medida e com camisa para troca térmica. O ar é fornecido por um compressor e é injetado pelo fundo do biorreator através do aerador localizado abaixo do impelidor.

O impelidor de aço inox é do tipo turbina com dois conjuntos de 6 pás planas. Devido ao conhecimento de que a configuração do impelidor afeta os valores de  $k_L a$  (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009), procurou-se manter a mesma configuração dos conjuntos de pás para os experimentos.

O biorreator está acoplado a uma unidade de controle. As variáveis controladas foram temperatura e velocidade do impelidor. A unidade ainda permite o controle de pH e do percentual de oxigênio dissolvido ( $pO_2$ ). É possível realizar sem controle automatizado a injeção de antiespumante, caso necessário, e regular a aeração manualmente utilizando o rotâmetro localizado na unidade de controle.

Um computador foi conectado ao conjunto para recepção e envio de sinais a fim de realizar a aquisição de dados e o controle. Utilizou-se o software MATLAB (MathWorks) como interface. O sistema completo aparece na Figura 14.

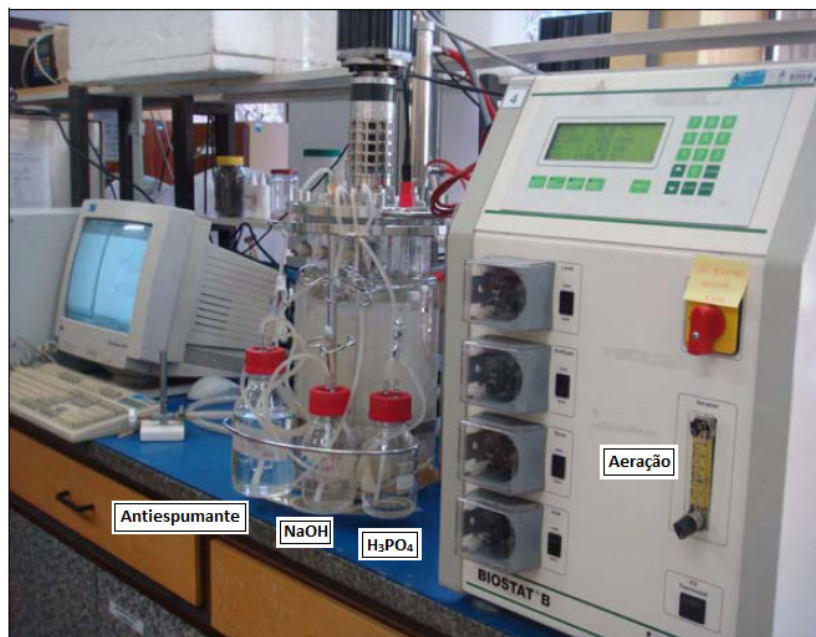


Figura 14: Biorreator com unidade de controle automático (à direita) e sistema de aquisição de dados (à esquerda) utilizado nos experimentos.

Os experimentos foram conduzidos com controle automático de temperatura através da circulação de água de resfriamento pela camisa do reator e sem controle de pH. Empregou-se uma velocidade de agitação de 600 rpm e aeração de  $4 \text{ L min}^{-1}$  (1 vvm) de ar. A Tabela 2 resume os valores estipulados para estas variáveis. Adicionou-se antiespumante quando necessário.



Tabela 2: Valores controlados para as variáveis de cultivo.

Variável	Valor
Temperatura (°C)	30
Velocidade de agitação (rpm)	600
Taxa de aeração (L min <sup>-1</sup> )	4

O eletrodo de pH foi previamente calibrado fora do reator. As medidas de percentual de saturação de oxigênio dissolvido foram realizadas por eletrodo polarográfico conectado ao biorreator. O eletrodo de oxigênio dissolvido foi calibrado no meio de cultivo para 100 % da saturação de oxigênio e para 0 %, através da expulsão do ar por injeção de gás nitrogênio, antes da adição do inóculo.

### 3.1.4 Esterilização

O biorreator, juntamente com os eletrodos, foi preenchido com água destilada e autoclavado fechado a 121 °C durante 30 minutos. Posteriormente, substituiu-se a água destilada pelo meio de cultura a ser utilizado e se repetiu a autoclavagem por mais 20 minutos. A fonte de nitrogênio só foi adicionada ao biorreator imediatamente antes do começo do cultivo, sendo, para isso, autoclavada separadamente.

## 3.2 Análises

Na realização deste estudo, procurou-se manter todas as condições operacionais descritas sem alterações, de modo que apenas a variação da quantidade de biomassa e da respiração celular durante o cultivo afetassem os valores de  $k_La$ .

### 3.2.1 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

Para avaliar o comportamento do  $k_La$  durante o cultivo, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio foi medido através do método dinâmico proposto por Bandyopadhyay e Humphrey (1967), com a modificação sugerida por Pouliot *et al.* (2000).

A técnica consiste na interrupção do fornecimento de ar ao cultivo e na diminuição quase total da agitação. Esta interrupção é executada durante poucos minutos, a fim de evitar influências na evolução do processo. Foi mantida uma velocidade de agitação de 50 rpm apenas para impedir que as células decantassem e fossem obtidas medidas equivocadas de  $pO_2$  pelo eletrodo (POULIOT *et al.*, 2000).

Ao interromper a agitação e a aeração, ocorre a queda da concentração de oxigênio dissolvido devido à respiração celular. Considera-se, para estas condições, que a transferência de oxigênio (OTR) é nula, e a concentração de oxigênio é dada por:

$$\frac{dC}{dt} = OUR = -q_{O_2}X \quad (7)$$

Integrando esta equação a partir de uma concentração de oxigênio  $C_i$  no momento em que são interrompidas a agitação e a aeração (instante  $t_i$ ) a uma concentração  $C$  em um dado tempo  $t$ , temos:

$$C = C_i - q_{O_2} X (t - t_i) \quad (8)$$

A OUR pode ser obtida diretamente da inclinação da curva de concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo. As taxas específicas de respiração celular ( $q_{O_2}$ ) foram calculadas em posse dos valores de OUR e dos dados de concentração celular ( $X$ ).

Ao religar a agitação e a aeração, a concentração de oxigênio volta a aumentar. Considerando um cultivo em estado estacionário, uma vez que a variação da concentração de oxigênio dissolvida normalmente é lenta durante o cultivo e é utilizado um período curto para aplicação do método dinâmico, espera-se que o  $pO_2$  retorne a valores semelhantes aos de antes da aplicação do método dinâmico. Assim, obtemos do balanço de massa em estado estacionário:

$$k_L a (C^* - C_i) = q_{O_2} X \quad (9)$$

que, reorganizada, torna-se:

$$C_i = C^* - \frac{q_{O_2} X}{k_L a} \quad (10)$$

O balanço de massa para o oxigênio no trecho ascendente da curva do método dinâmico será dado por:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_i - C) \quad (11)$$

Integrando a equação acima do tempo em que se retoma a agitação/aeração  $t_0$  ao tempo  $t$ , é possível determinar o  $k_L a$  através da equação obtida do balanço de massa para o oxigênio (SCHMIDELL *et al.*, 2001):

$$\ln \left( \frac{C_i - C}{C_i - C_0} \right) = k_L a (t - t_0) \quad (12)$$

onde  $C_i$ ,  $C_0$  e  $C$  são as concentrações de oxigênio dissolvido logo antes da interrupção da agitação/aeração, no tempo  $t_0$  ao retomar a aeração e em um tempo  $t$  durante a etapa de absorção de oxigênio, conforme a Figura 9.

O  $k_L a$  é obtido a partir da inclinação da reta de logaritmo natural da razão das concentrações versus tempo para o trecho ascendente da curva do método dinâmico, conforme a Equação (12) e a Figura 15.

Com fins ilustrativos, o Apêndice B deste trabalho traz a determinação do  $k_L a$  e do  $q_{O_2}$  através do método dinâmico para um dos pontos do cultivo. Os demais pontos foram determinados de maneira análoga.

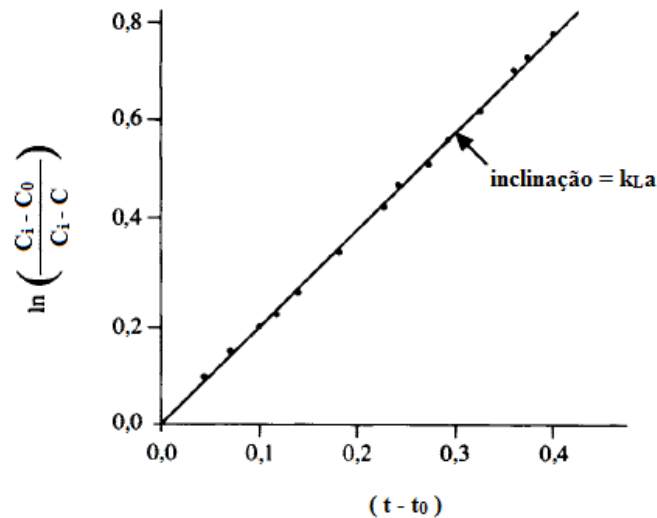


Figura 15: Determinação experimental do  $k_L a$  utilizando o método dinâmico.  
Fonte: adaptado de Doran (1995)

Nesse método, são, portanto, realizadas as seguintes considerações:

- A taxa de respiração celular não é afetada pela interrupção da aeração/agitação, nem pelas baixas concentrações de oxigênio, desde que superiores à concentração crítica;
- Variação lenta da concentração de oxigênio dissolvido ao longo do cultivo, permitindo assumir estado estacionário durante intervalos de tempo limitados;
- Aplicação do método dinâmico em um intervalo curto de tempo, sendo a concentração de OD antes da interrupção da agitação/aeração praticamente igual no término da determinação;
- Considera-se a concentração  $C_i$  constante. Desse modo, admite-se que o valor de  $q_{O_2}$  não varia durante a determinação do  $k_L a$ ;

Inicialmente, efetuou-se a medida do  $k_L a$  para o biorreator sem células. Nesse caso, em que não ocorre consumo biológico de oxigênio, o gás foi expulso através da injeção de nitrogênio, segundo o método dinâmico *gassing-out* (RIET, 1979). Após a adição do inóculo, realizou-se a determinação do  $q_{O_2}$  e  $k_L a$  a cada hora, a partir da segunda hora de cultivo, quando a densidade celular já seria significativa.

Admitiu-se que o valor de  $k_L a$  independe da posição no fermentador, uma vez que foram empregadas altas taxas de agitação e o cultivo apresentava baixa viscosidade, permitindo um bom grau de mistura.

A influência de biomassa nos valores de  $k_L a$  foi analisada também através da razão entre os valores para o biorreator com células ( $K_L a$ ) e o valor obtido inicialmente para o biorreator sem células ( $k_L a$ ). Esta razão é conhecida como fator de aumento biológico ( $E$ ) e é dada pela Equação (6).

### 3.2.2 Concentração de biomassa

A concentração de células, ou biomassa ( $X$ ), no biorreator foi determinada a cada hora, a partir da segunda hora de cultivo, em duplicata. As determinações foram realizadas por medidas de peso seco celular (gravimetria) (DEMIRTAS *et al.*, 2003; BANDAIPHET e PRASERTSAN, 2006; SCHIRMER-MICHEL *et al.*, 2008; KULPREECHA *et al.*, 2009). Para isso, tomaram-se alíquotas do volume do biorreator em frascos para centrifuga previamente pesados. As amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 3500 rpm, lavadas com água destilada, e novamente centrifugadas nas mesmas condições. A massa celular depositada foi deixada em estufa a vácuo a 75 °C até atingir peso constante. A biomassa foi obtida da seguinte maneira:

$$X = \frac{M - m}{V_a} \quad (13)$$

onde  $M$  é a massa do frasco com a massa seca celular;  $m$  é a massa de cada frasco e  $V_a$  é o volume coletado de meio em cada frasco centrifugado.

Para a determinação da biomassa imediatamente no início do cultivo (0 h), utilizaram-se os dados de concentração celular do inóculo, determinados pelo mesmo método gravimétrico. Como foi empregado um volume de 80 mL de inóculo no biorreator para totalizar aproximadamente 4 L de volume (2 % v/v), a biomassa no tempo 0 ( $X_0$ ) contida no biorreator é dada por:

$$X_0 = 0,02X_i \quad (14)$$

onde  $X_i$  é a concentração celular determinada para o inóculo.

### 3.2.3 Análise estatística

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância para permitir concluir se os valores de  $k_L a$  foram significativamente afetados durante o cultivo. Utilizou-se a ferramenta de análise de dados ANOVA: fator único do MSEXcel 2007 (Microsoft). O método encontra-se descrito por Montgomery e Runger (2003) e, resumidamente, por Cvijovi *et al.* (2005).

## 4 Resultados e discussão

O Apêndice A deste trabalho reúne os resultados numéricos obtidos para os valores de biomassa ( $X$ ), taxa de respiração celular (OUR), taxa específica de respiração celular ( $q_{O_2}$ ) e coeficiente volumétrico de transferência de massa ( $k_L a$ ) determinados ao longo das 12 h de cultivo de *Bacillus megaterium* (A) e da sua duplicata (B).

### 4.1 Crescimento celular e consumo de oxigênio

O crescimento celular durante o cultivo foi analisado através das curvas de biomassa em função do tempo de cultivo, mostradas na Figura 16. Para obter a curva típica de crescimento, plotaram-se os valores de biomassa em escala logarítmica. Os gráficos da Figura 16 apresentam valores médios de biomassa.

Observou-se a ausência de fase *lag* de adaptação das células ao biorreator, conforme esperado, já que o inóculo, cultivado previamente no mesmo meio de cultivo, estava no princípio da fase exponencial quando adicionado. A fase estacionária foi plenamente atingida em aproximadamente 9 h de cultivo.

Ao longo das 12 h, percebeu-se a alteração no aspecto visual do cultivo, de transparente para rosa leitoso. Também foi notado um odor característico.

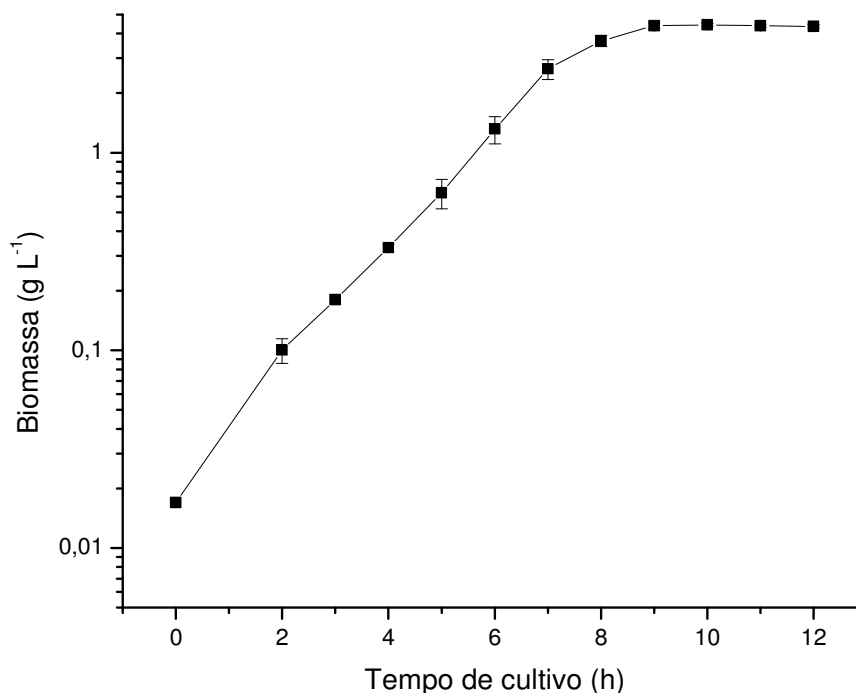


Figura 16: Curva de crescimento celular de *B. megaterium* para o cultivo em biorreator (A) e a duplicata (B).

A curva da taxa de respiração específica ( $q_{O_2}$ ) durante o cultivo, obtida a partir dos dados do trecho descendente da curva do método dinâmico e dos valores de biomassa determinados por gravimetria, comportou-se conforme apresentado na Figura 17. Esses resultados devem ser analisados conjuntamente com os de crescimento celular (Figura

16). Como já esperado, observou-se que o  $q_{O_2}$  iniciou a partir de um valor máximo, uma vez que as células já se encontravam na fase de maior respiração, a fase exponencial. À medida que a biomassa vai aumentando e as células começam a se deparar com a limitação de nutrientes, o cultivo vai se aproximando da fase estacionária, quando a atividade metabólica decai, com a consequente redução no  $q_{O_2}$ . Esse comportamento está de acordo com o observado na literatura por Garcia-Ochoa e Gomez (2009) e Ho *et al.* (1995).

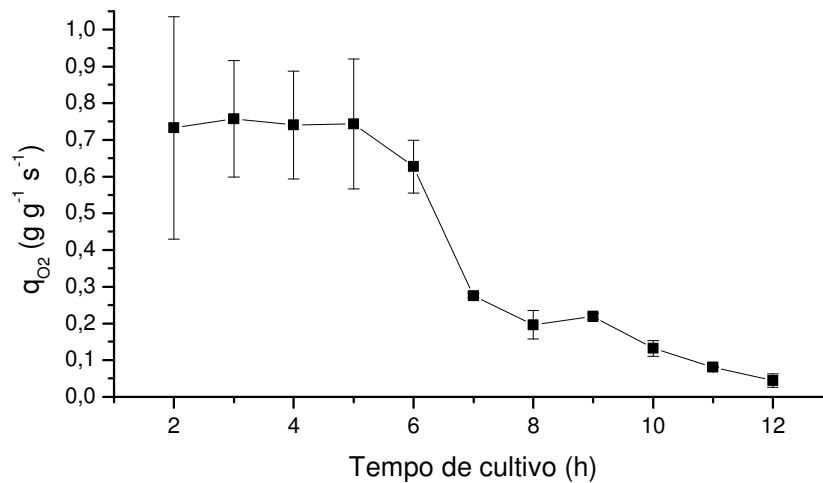


Figura 17: Curva da taxa específica de consumo de oxigênio durante cultivo de *B. megaterium*.

Desse modo, a atividade metabólica celular pode ser investigada através do crescimento celular (Figura 16) e do  $q_{O_2}$  (Figura 17) durante o cultivo. Pode-se perceber analisando estas duas figuras que, em um tempo de cultivo de 6 h, já começa a ocorrer uma leve desaceleração do crescimento celular. A partir de 7 h esta desaceleração se torna clara e, em 9 h, o crescimento já se encontra em uma fase plenamente estacionária. O cultivo não chegou a apresentar uma fase de morte celular.

#### 4.2 Balanço de massa para o oxigênio: perfil de $pO_2$ e OUR

A percentagem de oxigênio dissolvido ( $pO_2$ ) e a taxa de respiração celular (OUR) durante o cultivo foram representados na Figura 18 e Figura 19, respectivamente. As quedas acentuadas na curva de  $pO_2$  correspondem às determinações de  $k_L a$  através do método dinâmico para o biorreator com células.

Durante um cultivo aeróbio, as curvas de crescimento celular, taxa de respiração e a de concentração de oxigênio estão inter-relacionadas. Como já observado, com o aumento do número de células durante a fase exponencial de crescimento, ocorre uma queda na concentração de oxigênio dissolvido, devido à alta demanda de oxigênio (OUR) provocada pelo maior consumo de substrato durante esta etapa. Posteriormente, as células ingressam na fase estacionária devido à limitação de nutrientes, entre os quais oxigênio, e esta demanda diminui, fazendo com que os níveis de OD sejam recuperados. Segundo Garcia-Ochoa e Gomez (2009), esse é o comportamento apresentado na maioria dos cultivos de micro-organismos disponíveis na literatura.

Avaliando a curva de  $pO_2$  obtida, observou-se a tendência a seguir esse comportamento típico para os dois experimentos, ocorrendo, no entanto, um comportamento anômalo em 7 h e 8 h de cultivo. A taxa de consumo de oxigênio é mais elevada nesta etapa do cultivo, como confirmado pela Figura 19, devido ao produto entre biomassa e  $q_{O_2}$  estar elevado. Ao realizar a determinação do  $k_La$ , acredita-se que a concentração de oxigênio dissolvido tenha caído além da concentração crítica para esta linhagem de *B. megaterium*.

Durante a aplicação do método nesses pontos, a taxa de decréscimo no  $pO_2$  foi bastante acentuada e superior ao tempo de resposta do eletrodo. Mesmo após a retomada da aeração e agitação, os valores de  $pO_2$  continuaram caindo. Portanto, devido a esta limitação de oxigênio, acredita-se que as células tenham alterado seu metabolismo. Após o cultivo atingir baixas concentrações de OD, as células passaram a consumir o gás a uma taxa mais lenta, aumentando repentinamente o valor de  $pO_2$  medido e contrariando a tendência que vinha sendo seguida. Posteriormente, a partir de 9 h, o metabolismo restabeleceu o comportamento típico.

Observa-se na Figura 19 que as taxas de respiração celular a 7 h e 8 h apresentaram uma queda inesperada. Isto ocorreu devido às alterações metabólicas descritas acima. As curvas de OD e de OUR apresentam comportamentos contrários. Esse resultado deve-se ao balanço de massa para o oxigênio, dado pela Equação (1), em que a queda na OD é causada pela respiração celular ao longo do cultivo.

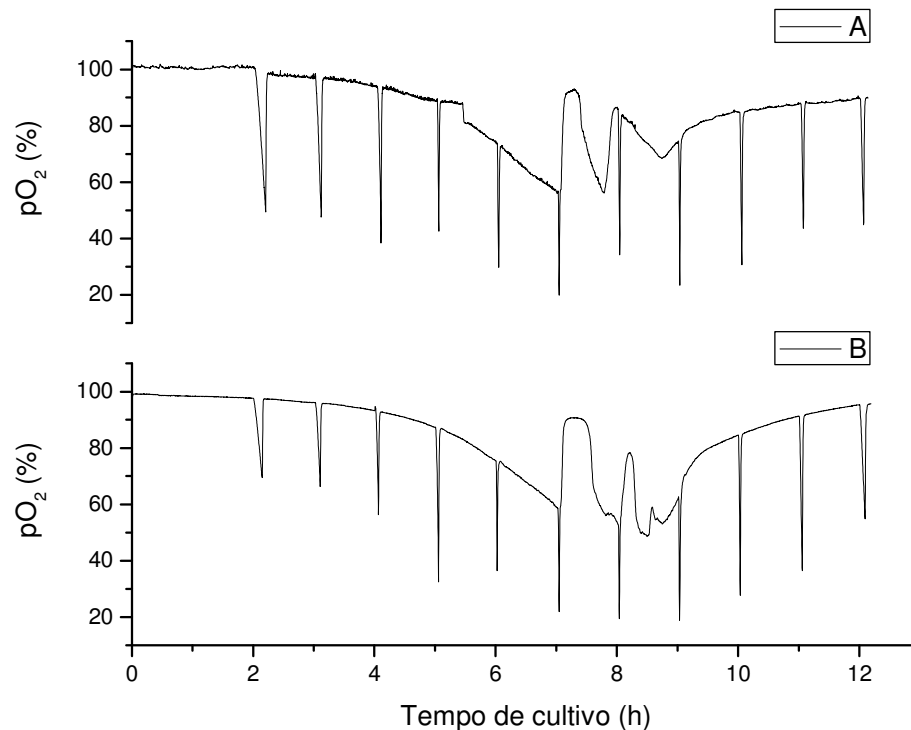


Figura 18: Perfil da concentração de oxigênio dissolvido

Conforme Pouliot *et al.* (2000), se a atividade da reação bioquímica for alta o suficiente para reduzir significativamente os níveis de OD no cultivo, a determinação com

o método dinâmico torna-se inviável, devendo utilizar-se determinações baseadas no balanço de gás. Esta conclusão reforça a afirmação feita por Badino Júnior *et al.* (2001).

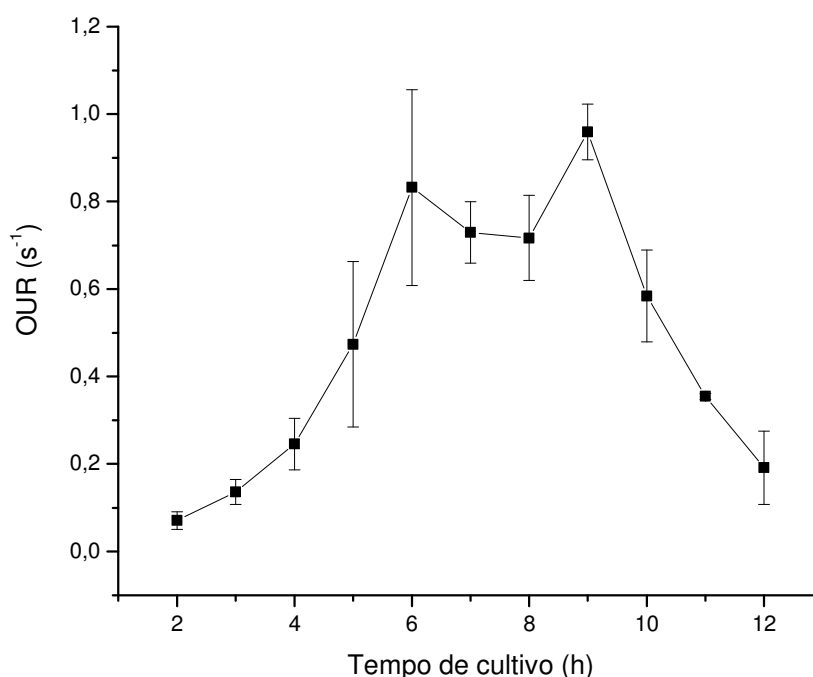


Figura 19: Perfil da taxa de respiração celular durante cultivo de *B. megaterium*.

As concentrações mínimas de OD atingidas em 7 h de cultivo, após as quais a *B. megaterium* apresentou comportamento anômalo, foram de 19,8 % para o cultivo (A) e 21,9 % para a duplicata (B). As concentrações mínimas que foram medidas pelos eletrodos de OD em cada hora para os experimentos A e B estão listadas na Tabela 3. Em vista dos resultados, acredita-se que a concentração crítica de oxigênio para *B. megaterium* encontre-se redor dos 20 %.

Tabela 3: Menores medidas registradas na concentração de oxigênio dissolvido para os experimentos A e B.

Tempo (h)	pO <sub>2</sub> mínimo A (%)	pO <sub>2</sub> mínimo B (%)
2	49,4	69,4
3	47,6	66,4
4	38,3	56,3
5	42,6	32,4
6	29,8	36,5
7	19,8	21,9
8	34,2	19,4
9	23,4	18,8
10	30,7	27,7
11	43,7	36,5
12	44,8	54,9



### 4.3 Influência da biomassa no $k_L a$

Inicialmente, o valor medido do  $k_L a$  para o biorreator sem células foi, em média, de  $0,045 \text{ s}^{-1} \pm 0,003 \text{ s}^{-1}$ .

Para análise da variação do  $k_L a$  durante o cultivo, foram desconsiderados os pontos tomados em 7 h e 8 h, devido ao desvio de metabolismo descrito. Além disso, a obtenção de poucos pontos para a aplicação do método dinâmico, uma vez que a concentração de OD caía muito rapidamente e não se desejava aproximar-se do valor crítico, dificultou a obtenção de valores confiáveis de  $k_L a$  nesses casos. A alteração metabólica dos microorganismos fez com que os níveis de OD não retornassem aos valores iniciais, ao se desligar a aeração na determinação em 7 h. Opostamente, esses níveis subiram significativamente, e a seção ascendente da curva de determinação do  $k_L a$  pelo método dinâmico não apresentou um comportamento linear durante todo o trecho, dificultando ainda mais a obtenção de um valor confiável.

A Figura 20 apresenta os resultados obtidos para o  $k_L a$ . Pode-se verificar que o valor manteve-se relativamente constante ao longo do cultivo e, conseqüentemente, com a quantidade de biomassa. O  $k_L a$  não foi influenciado pelo  $q_{O_2}$ , não ocorrendo, portanto, o efeito significativo da respiração celular no  $k_L a$  descrito por Garcia-Ochoa e Gomez (2009) e observado também por Ho *et al.* (1995).

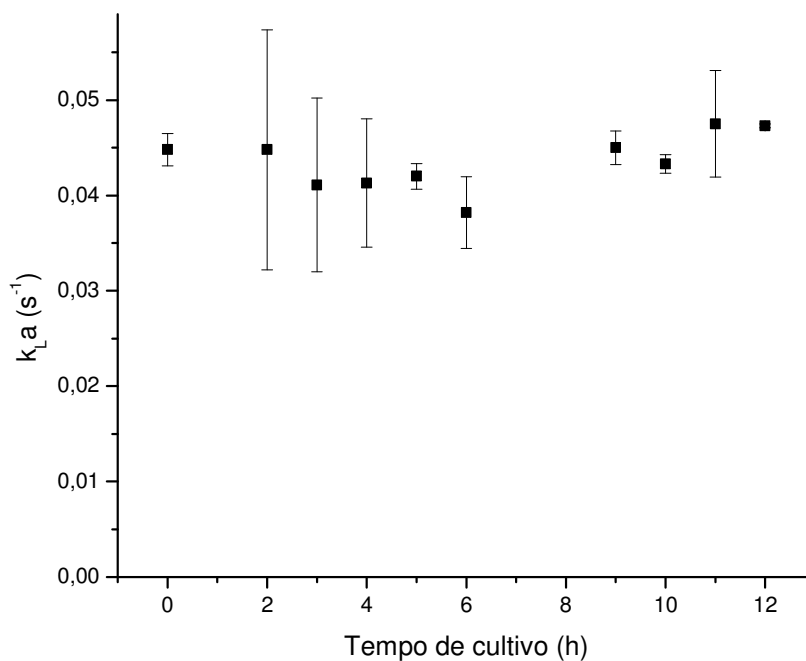


Figura 20: Variação do  $k_L a$  durante cultivo de *Bacillus megaterium*.

A fim de verificar a influência da biomassa no valor do  $k_L a$ , foram obtidos os valores do fator biológico de aumento ( $E$ ). Os dados apresentados na Tabela 4 confirmam que esse fator pode ser considerado aproximadamente igual a 1 durante o cultivo.

Tabela 4: Fator de aumento biológico (E) em um cultivo de *B. megaterium*.

Tempo (h)	E médio	Desvio padrão
2	1,06	0,44
3	0,91	0,26
4	0,91	0,09
5	0,93	0,09
6	0,84	0,14
9	0,99	0,03
10	0,96	0,09
11	1,05	0,19
12	1,04	0,07

Como já esperado, a análise de variância (Tabela 5 e Tabela 6) mostrou que as variações entre os valores de  $k_L a$  não foram significativas para representar uma alteração do  $k_L a$  ao longo do cultivo, sendo esses desvios devido ao acaso e a erros. Como indicado na Tabela 6, o fator F foi inferior ao F crítico e a probabilidade (valor-P) para esse valor de F foi bastante superior a 0,05. Esses valores indicam que não há diferença significativa entre os valores de  $k_L a$ . Também foram desconsiderados os valores obtidos a 7 h e 8 h nesta análise.

Tabela 5: Resumo da análise estatística de variância ANOVA fator único.

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
0	2	0,09085	0,045425	9,03E-06
2	2	0,0954	0,0477	0,000278
3	2	0,0821	0,04105	8,32E-05
4	2	0,0825	0,04125	4,51E-05
5	2	0,0839	0,04195	1,81E-06
6	2	0,0763	0,03815	1,4E-05
9	2	0,0899	0,04495	3,12E-06
10	2	0,0866	0,0433	9,8E-07
11	2	0,0949	0,04745	3,12E-05
12	2	0,0945	0,04725	4,5E-08

Tabela 6: Resultados da análise estatística de variância ANOVA fator único.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Tempo de cultivo	0,000188	9	2,09E-05	0,447424	0,879177	3,020383
Erro	0,000467	10	4,67E-05			
Total	0,000655	19				

Esses resultados estão de acordo com Pouliot *et al.* (2000). Conforme os autores, para cultivos não viscosos, como é o caso de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Bacillus megaterium*, o  $k_L a$  permanece relativamente constante durante o curso da fermentação se as demais condições experimentais forem mantidas constantes. Pequenas mudanças no  $k_L a$  podem ser notadas, uma vez que esse valor é levemente afetado pela concentração celular, produção de metabolitos e adição de agente antiespumante.

Obtiveram-se desvios padrão relativamente altos entre os valores obtidos nos dois cultivos para alguns pontos. Isto ocorreu devido a algumas importantes fontes de erros que devem ser consideradas, entre elas:

- Tempo de resposta dinâmica do eletrodo de oxigênio dissolvido não considerado;
- Adição de maneira diferenciada de antiespumantes, segundo a necessidade. Assim como surfactantes, estas substâncias tendem a diminuir os valores de  $k_La$  (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009);
- Estabelecimento do valor de aeração manualmente, através de rotâmetro, e oscilações da pressão de ar fornecido pelo compressor. No entanto, como a aeração não afeta o  $k_La$  de maneira tão significativa (DEMIRTAS *et al.*, 2003), esse fator de erro pode ser considerado menor;
- Peculiaridades dos cultivos e do metabolismo celular.

De fato, Pouliot *et al.* (2000) observaram que as variações dos valores de  $k_La$  estimados pelo método dinâmico em um cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* desconsiderando os erros de medida e a dinâmica do eletrodo de oxigênio dissolvido eram significativamente maiores do que os valores obtidos por reconciliação matemática dos dados.

A constatação de que o  $k_La$  pode ser assumido constante com a biomassa é um ponto positivo nos estudos com *Bacillus megaterium*, pois elimina a necessidade de monitorar e controlar o  $k_La$  durante um cultivo em que as demais condições sejam mantidas constantes. Desse modo, é possível realizar o ajuste do  $k_La$  de acordo com as condições experimentais (taxa de aeração, velocidade de agitação, etc.), mantendo seu valor durante o experimento. Ainda, os problemas envolvidos na utilização do método dinâmico, pela baixa concentração de oxigênio dissolvido nos períodos de maior OUR, não precisam ser contornados. Como as células podem ser afetadas pela utilização desse método, principalmente se a determinação do  $k_La$  não for rápida, pode ser determinado o valor de  $k_La$  para o biorreator sem células, acabando também com esse inconveniente no processo. Por fim, a obtenção de um valor de  $k_La$  relativamente constante elimina a biomassa como parâmetro a ser ajustado em uma correlação para predição do  $k_La$ .

## 5 Conclusões e Trabalhos Futuros

Neste trabalho, realizou-se cultivo batelada de *B. megaterium* durante 12 h em um biorreator de 5 L do tipo tanque agitado. Foram determinados periodicamente valores de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ ) e taxa específica de respiração ( $q_{O_2}$ ) através de método dinâmico e de biomassa através de método gravimétrico, com o objetivo principal de verificar se existe influência da presença e concentração de biomassa no valor do  $k_La$  durante o cultivo.

As células de *B. megaterium* apresentaram resultados típicos para micro-organismos aeróbios quanto ao crescimento celular, à taxa específica de respiração e à taxa de consumo de oxigênio durante o cultivo. A biomassa apresentou leve desaceleração no crescimento exponencial em cerca de 6 h e atingiu a fase estacionária plenamente em 9 h. Não se verificou fase *lag* nem morte celular em 12 h de cultivo. A taxa de respiração específica apresentou queda progressiva à medida que o cultivo se aproximou da fase estacionária, indicando diminuição da atividade metabólica devido à limitação de nutrientes.

A utilização do método dinâmico para um cultivo de *B. megaterium* é limitada nos períodos de maior respiração, devendo-se empregar um método alternativo de determinação do  $k_La$ . A aplicação desse método provocou uma queda no valor de oxigênio dissolvido provavelmente inferior à concentração crítica para o micro-organismo, próxima a 20 %. A curva típica de OD foi afetada pela alteração metabólica consequente. A taxa de respiração apresentou redução atípica nesses casos, indicando desaceleração da atividade metabólica.

O  $k_La$  não se mostrou dependente da biomassa em cultivos de *B. megaterium*. Esse resultado constitui um ponto positivo nos estudos desse micro-organismo, uma vez que permite o ajuste e determinação do  $k_La$  antes da adição do inóculo ao biorreator e torna desnecessário seu controle durante o cultivo. Esse fato evita a problemática envolvida na sua determinação com células. Além disso, elimina-se um parâmetro a ser inserido em correlações para prever o  $k_La$  em um cultivo de *B. megaterium*.

Como proposição para trabalhos futuros, de acordo com algumas lacunas a serem exploradas identificadas no presente trabalho, encontram-se:

- Repetição dos cultivos, evitando aproximar o cultivo de concentrações muito baixas de oxigênio dissolvido no momento da determinação do  $k_La$ , considerando, inclusive, a utilização de modificações no método de determinação;
- Investigação do valor real de concentração crítica de oxigênio para *Bacillus megaterium* e estudo mais detalhado da forma com que concentrações de oxigênio abaixo desse valor afetam seu metabolismo;
- Análise de como a produção de PHB pode ser afetada pela taxa específica de respiração celular ( $q_{O_2}$ ).

## 6 Referências

- AHMAD, M. N.; HOLLAND, C. R.; MCKAY, G. Mass Transfer Studies in Batch Fermentation: Mixing Characteristics. *Journal of Food Engineering*, v. 23, p. 145-158, 1994.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, v. 54, p. 450-472, 1990.
- ANDREWS, G.; FONTA, J. The Effects of Cells on Oxygen Transfer Coefficients II: Analysis of Enhancement Mechanisms. *The Chemical Engineering Journal*, v. 29, p. B47-B55, 1984b.
- ANDREWS, G. F.; FONTA, J. P. The Effects of Cells on Oxygen Transfer Coefficients I: Cell Accumulation around Bubbles. *The Chemical Engineering Journal*, v. 29, p. B39-B46, 1984a.
- BADINO JÚNIOR, A. C.; FACCIOTTI, M. C. R.; SCHMIDELL, W. Volumetric oxygen transfer coefficients (kLa) in batch cultivations involving non-Newtonian broths. *Biochemical Engineering Journal*, v. 8, p. 111-119, 2001.
- BANDAIPHET, C.; PRASERTSAN, P. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, kLa in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, p. 216-228, 2006.
- BANDYOPADHYAY, B.; HUMPHREY, A. E. Dynamic Measurement of the Volumetric Oxygen Transfer Coefficient in Fermentation Systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 9, p. 533-544, 1967.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. D. A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial: fundamentos*. São Paulo: Blucher, 2001.
- BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, v. 65, p. 127-161, 1998.
- BUCCI, D. Z.; TAVARES, L. B. B.; SELL, I. PHB packaging for the storage of food products. *Polymer Testing*, v. 24, p. 564-571, 2005.
- BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends in Biotechnology*, v. 5, n. 9, p. 246-250, 1987.
- CVIJOVI, Z.; RADENKOVI, G.; MAKSIMOVI, V.; DIMCIC, B. Application of ANOVA method to precipitation behaviour studies. *Materials Science and Engineering A*, v. 397, p. 195-203, 2005.
- DANIELL, H.; GUDA, C. Biopolymer production in microorganisms and plants. *Chemistry and Industry (London)*, n. 14, p. 555-558, 1997.

DEMIRTAS, M. U.; KOLHATKAR, A.; II, J. J. K. Effect of Aeration and Agitation on Growth Rate of *Thermus thermophilus* in Batch Mode. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 95, p. 113-117, 2003.

DORAN, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*. San Diego: Academic Press, 1995. 439 p.

FÜRCH, T.; HOLLMANN, R.; WITTMANN, C.; WANG, W.; DECKWER, W.-D. Comparative study on central metabolic fluxes of *Bacillus megaterium* strains in continuous culture using <sup>13</sup>C labelled substrates. *Bioprocess Biosystem Engineering*, v. 30, p. 47-59, 2007.

GALACTION, A.-I.; CASCAVAL, D.; ONISCU, C.; TURNEA, M. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochemical Engineering Journal*, v. 20, p. 85-94, 2004.

GALACTION, A.-I.; ONISCU, C.; CASCAVAL, D. Studies on Oxygen Mass Transfer in Stirred Bioreactors. *Chem. Ind.*, v. 57, p. 276-287, 2003.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 153-176, 2009.

GARCÍA-OCHOA, F.; GÓMEZ, E. Mass transfer coefficient in stirred tank reactors for xanthan gum solutions. *Biochemical Engineering Journal*, v. 1, p. 1-10, 1998.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E.; SANTOS, V. E.; MERCHUK, J. C. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, v. 49, p. 289-307, 2010.

GOMEZ, E.; SANTOS, V. E.; ALCON, A.; GARCIA-OCHOA, F. Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: Effect on growth and BDS capability. *Chemical Engineering Science*, v. 61, p. 4595-4604, 2006b.

GOMEZ, E.; SANTOS, V. E.; ALCON, A.; MARTIN, A. B.; GARCIA-OCHOA, F. Oxygen-Uptake and Mass-Transfer Rates on the Growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: Influence on Biodesulfurization (BDS) Capability. *Energy & Fuels*, v. 20, p. 1565-1571, 2006a.

HO, C.-H.; HENDERSON, K. A.; RORRER, G. L. Cell Damage and Oxygen Mass Transfer during Cultivation of *Nicotiana tabacum* in a Stirred-Tank Bioreactor. *Biotechnol. Prog.*, v. 11, p. 140-145, 1995.

HOCKING, M. B. Fermentation and Other Microbiological Processes. In: PRESS, A. (Ed.). *Handbook of Chemical Technology and Pollution Control*. U.S.A, 2005. Cap.16. p. 505-555.

HOLMES, P. A. Applications of PHB - A microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physics in Technology*, v. 16, n. 1, p. 32-36, 1985.

JAMNONGWONG, M.; LOUBIERED, K.; DIETRICH, N.; HÉBRARDA, G. Experimental study of oxygen diffusion coefficients in clean water containing salt, glucose or surfactant: Consequences on the liquid-side mass transfer coefficients. *Chemical Engineering Journal*, v. 165, p. 758-768, 2010.

JU, L.-K.; SUNDARARAJAN, A. The effects of cells on oxygen transfer in bioreactors: physical presence of cells as solid particles. *The Chemical Engineering Journal*, v. 56, p. B15-B21, 1994.

KULPREECHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium* *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 107, p. 240-245, 2009.

LITTLEHALES, C.; MASSEY, A. *Guide to Biotechnology*. Biotechnology Industry Organization (BIO), 2007.

MACRAE, R. M.; WILKINSON, J. F. Poly +hydroxybutyrate Metabolism in Washed Suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *J. gen. Microbiol.*, v. 19, p. 210-222, 1958.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. *Applied statistics and probability for engineers*. 3rd. ed. New York: John Wiley & Sons, 2003. 706 p.

OECD. *ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT: Statistical Definition of Biotechnology*. Disponível em: <[http://www.oecd.org/document/41/0,3746,en\\_2649\\_34537\\_1933994\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/41/0,3746,en_2649_34537_1933994_1_1_1_1,00.html)>. Acesso em: 01 abr. 2012.

PANDIAN, S. R.; DEEPAK, V.; KALISHWARALAL, K.; RAMESHKUMAR, N.; JEYARAJ, M.; GURUNATHAN, S. Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 705-711, 2010.

POULIOT, K.; THIBAUT, J.; GARNIER, A.; LEIVA, G. A.  $K_La$  Evaluation during the course of fermentation using data reconciliation techniques. *Bioprocess Engineering*, v. 23, p. 565-573, 2000.

REYES, G. D.; SO, R. S.; ULEP, M. M. Isolation, screening and identification of bacteria for poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production. *Studies in Environmental Science*, v. 66, p. 737-748, 1997.

RIET, K. V. T. Review of Measuring Methods and Results in Mass Transfer in Stirred Vessels. *Ind. Eng. Chem. Process. Des. Dev.*, v. 18, p. 357-364, 1979.

SCHIRMER-MICHEL, Â. C.; FLÔRES, S. H.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Effect of oxygen transfer rates on alcohols production by *Candida guilliermondii* cultivated on soybean hull hydrolysate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 84, p. 223-228, 2008.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. D. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial: engenharia bioquímica*. São Paulo: Blucher, 2001.

SLEPECKY, R. A.; LAW, J. H. Synthesis and degradation of poly-β-hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*, v. 82, p. 37-42, 1961.

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

VAZQUEZ, G. J.; PETTINARI, M. J.; MÉNDEZ, B. S. Evidence of an association between poly(3-hydroxybutyrate) accumulation and phosphotransbutyrylase expression in *Bacillus megaterium*. *Int Microbiol*, v. 6, p. 127-129, 2003.

VERLINDEN, R. A. J.; HILL, D. J.; KENWARD, M. A.; WILLIAM, C. D.; RADECKA, I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, p. 1437-1449, 2007.

VOLOVA, T.; SHISHATSKAYA, E.; SEVASTIANOV, V.; EFREMOV, S.; MOGILNAYA, O. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. *Biochemical Engineering Journal*, v. 16, p. 125-133, 2003.

WAITES, M. J.; MORGAN, N. L.; ROCKEY, J. S.; HIGTON, G. *Industrial Microbiology: An Introduction*. Blackwell Science, 2001. p.

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

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

YILMAZ, M.; SORAN, H.; BEYATLI, Y. Determination of poly-b-hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 21, p. 565-566, 2005.

YU, J. Microbial Production of Bioplastics from Renewable Resources *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*: Elsevier, 2007. Cap.23. p. 585-610.



## APÊNDICE A

### Resultados experimentais tabelados

Resultados experimentais tabelados para o cultivo (A) e sua duplicata (B). Na Tabela 10 os dados de 7 h e 8 h foram excluídos devido ao comportamento atípico observado e ao desvio no método dinâmico.

*Tabela 7: Biomassa determinada através de peso seco celular durante cultivo de Bacillus megaterium.*

Tempo (h)	X A (g L <sup>-1</sup> )	X B (g L <sup>-1</sup> )	X médio (g L <sup>-1</sup> )	Desvio padrão (g L <sup>-1</sup> )
0	0,017	0,017	0,017	0,000
2	0,090	0,110	0,100	0,014
3	0,180	0,180	0,180	0,000
4	0,340	0,320	0,330	0,014
5	0,700	0,550	0,625	0,106
6	1,460	1,170	1,315	0,205
7	2,870	2,430	2,650	0,311
8	3,850	3,510	3,680	0,240
9	4,280	4,490	4,385	0,148
10	4,370	4,490	4,430	0,085
11	4,440	4,330	4,385	0,078
12	4,410	4,290	4,350	0,085

*Tabela 8: Taxa de respiração celular obtida pelo método dinâmico ao longo do cultivo de B. megaterium.*

Tempo (h)	OUR A (g L <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	OUR B (g L <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	OUR médio (g L <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Desvio padrão (g L <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
2	0,085	0,057	0,071	0,020
3	0,157	0,116	0,136	0,028
4	0,287	0,204	0,245	0,059
5	0,608	0,340	0,474	0,189
6	0,990	0,674	0,832	0,224
7	0,779	0,680	0,730	0,070
8	0,649	0,785	0,717	0,097
9	0,914	1,004	0,959	0,064
10	0,510	0,659	0,584	0,105
11	0,360	0,349	0,355	0,007
12	0,251	0,133	0,192	0,083

Tabela 9: Taxa específica de respiração obtidas pelo método dinâmico ao longo do cultivo de *B. megaterium*.

Tempo (h)	$q_{O_2} A$ ( $s^{-1}$ )	$q_{O_2} B$ ( $s^{-1}$ )	$q_{O_2}$ médio ( $s^{-1}$ )	Desvio padrão ( $s^{-1}$ )
2	0,947	0,518	0,732	0,303
3	0,869	0,646	0,758	0,158
4	0,844	0,637	0,740	0,147
5	0,868	0,618	0,743	0,177
6	0,678	0,576	0,627	0,072
7	0,271	0,280	0,276	0,006
8	0,168	0,224	0,196	0,039
9	0,214	0,224	0,219	0,007
10	0,117	0,147	0,132	0,021
11	0,081	0,081	0,081	0,000
12	0,057	0,031	0,044	0,018

Tabela 10:  $k_L a$  determinado pelo método dinâmico durante cultivo de *B. megaterium*.

Tempo (h)	$k_L a$ A ( $s^{-1}$ )	$k_L a$ B ( $s^{-1}$ )	$k_L a$ médio ( $s^{-1}$ )	$k_L a$ médio ( $h^{-1}$ )	Desvio padrão ( $s^{-1}$ )
0	0,0476	0,0433	0,0454	163,53	0,0030
2	0,0359	0,0537	0,0448	161,28	0,0126
3	0,0346	0,0475	0,0411	147,78	0,0091
4	0,0460	0,0365	0,0413	148,50	0,0067
5	0,0410	0,0429	0,0420	151,02	0,0013
6	0,0355	0,0408	0,0382	137,34	0,0037
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	0,0462	0,0437	0,0450	161,82	0,0018
10	0,0426	0,0440	0,0433	155,88	0,0010
11	0,0435	0,0514	0,0475	170,82	0,0056
12	0,0471	0,0474	0,0473	170,10	0,0002

## APÊNDICE B

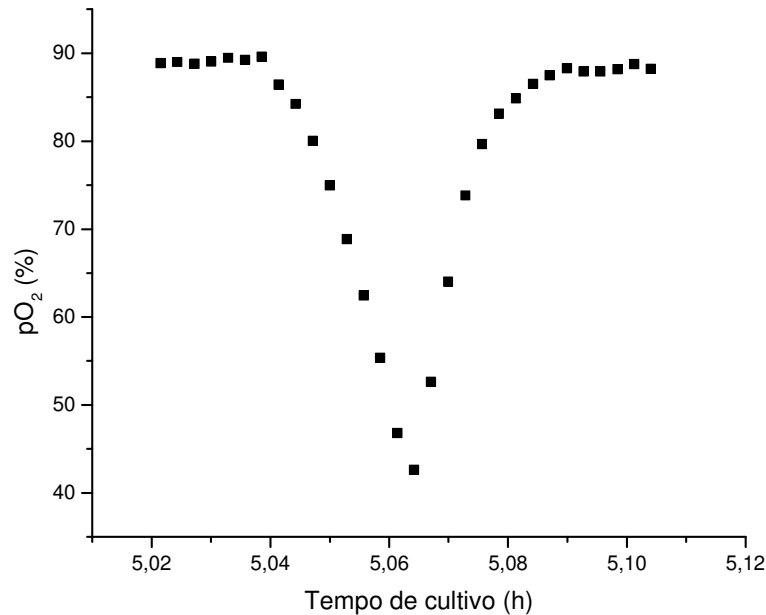
### Cálculo ilustrativo do método utilizado para a determinação do $k_L a$ e do $q_{O_2}$ .

Os cálculos deste exemplo foram realizados para o ponto correspondente a 5 h de cultivo do reator A. A Tabela 11 contém os valores medidos e calculados para esse ponto. As determinações para os demais períodos dos cultivos foram conduzidas da mesma forma.

Tabela 11: Aplicação do método dinâmico para determinação do  $k_L a$  em 5 h de cultivo.

Tempo (h)	Tempo (s)	N (rpm)	$pO_2$ (%)	$\ln\left(\frac{C_i - C}{C_i - C_0}\right)$	$(t - t_0)$	$(t - t_i)$
5,022	18397	600,48	88,9	-	-	-
5,024	18407	599,64	89,0	-	-	-
5,027	18418	600,36	88,8	-	-	-
5,030	18428	600,84	89,1	-	-	-
5,033	18438	600,12	89,5	-	-	-
5,036	18448 ( $t_i$ )	599,16	89,22 ( $C_i$ )	-	-	0
5,039	18458	60,84	89,6	-	-	10,16
5,041	18468	56,16	86,4	-	-	20,38
5,044	18479	55,56	84,2	-	-	30,7
5,047	18489	55,2	80,0	-	-	41,14
5,050	18499	55,08	75,0	-	-	51,3
5,053	18510	55,08	68,8	-	-	61,68
5,056	18520	55,08	62,5	-	-	71,84
5,058	18530	55,08	55,4	-	-	81,89
5,061	18540	590,64	46,8	-	-	92,33
5,064	18551 ( $t_0$ )	559,44	42,61 ( $C_0$ )	1	0,00	102,44
5,067	18561	580,8	52,6	0,24	10,27	-
5,070	18571	591,48	64,0	0,61	20,59	-
5,073	18582	595,2	73,8	1,11	31,03	-
5,076	18592	598,56	79,7	1,59	41,14	-
5,078	18602	599,28	83,1	2,03	51,41	-
5,081	18612	599,04	84,9	2,37	61,73	-
5,084	18623	599,76	86,5	2,83	72,17	-
5,087	18633	600,36	87,5	3,28	82,33	-
5,090	18643	599,4	88,3	-	-	-
5,093	18653	600,12	87,9	-	-	-
5,096	18663	601,08	87,9	-	-	-
5,098	18674	600,84	88,2	-	-	-
5,101	18684	600,96	88,8	-	-	-
5,104	18694	600	88,2	-	-	-

A curva da concentração de oxigênio dissolvido, devido à interrupção da agitação/aeração e sua posterior retomada, seguiu o comportamento típico para esse método, conforme a *Figura 21*.



*Figura 21: Concentração oxigênio dissolvido durante aplicação do método dinâmico.*

a) Determinação da OUR e  $q_{O_2}$

A seção descendente da *Figura 21* foi satisfatoriamente ajustada para uma reta na *Figura 22*. Através da regressão linear dos pontos, o coeficiente angular obtido foi de aproximadamente  $-0,61 \text{ s}^{-1}$ . Segundo a Equação (8), esse valor equivale à taxa de respiração celular (OUR), ou seja, a multiplicação entre  $q_{O_2}$  e biomassa ( $X$ ). Com os dados de biomassa para este ponto, pode ser calculado o  $q_{O_2}$  separadamente.

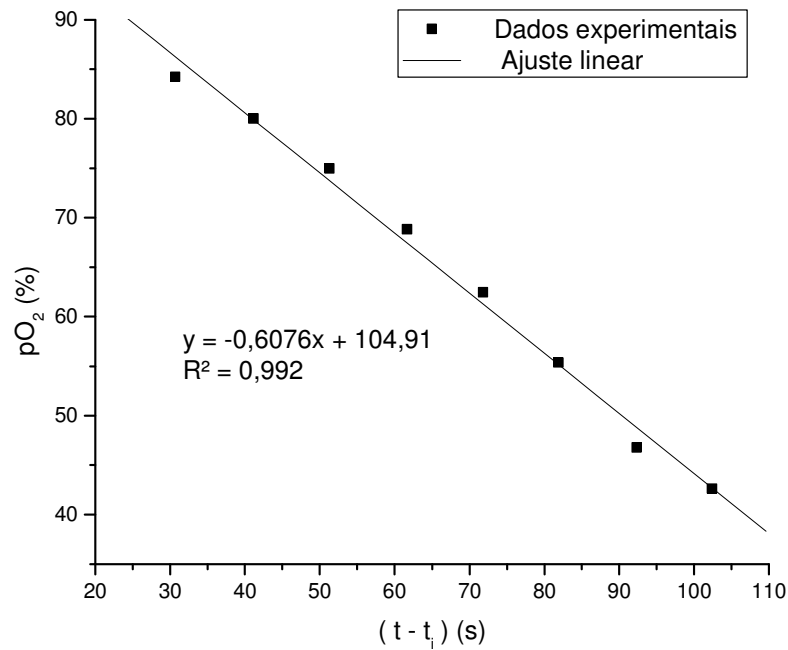


Figura 22: Determinação da OUR a partir da seção descendente da curva do método dinâmico.

#### b) Determinação do $k_L a$

Os valores de concentração de oxigênio dissolvido obtidos no trecho ascendente da Figura 21 foram aplicados para determinar os valores de  $\ln\left(\frac{C_i - C}{C_i - C_0}\right)$ , conforme a Tabela 11. De acordo com Equação (5), um gráfico desses logaritmos em função do tempo pode ser ajustado para uma reta. Realizou-se, desse modo, a regressão linear da Figura 23. O coeficiente angular fornece diretamente o valor de  $k_L a$  nesse período do cultivo. O valor obtido foi de  $0,041 \text{ s}^{-1}$ .

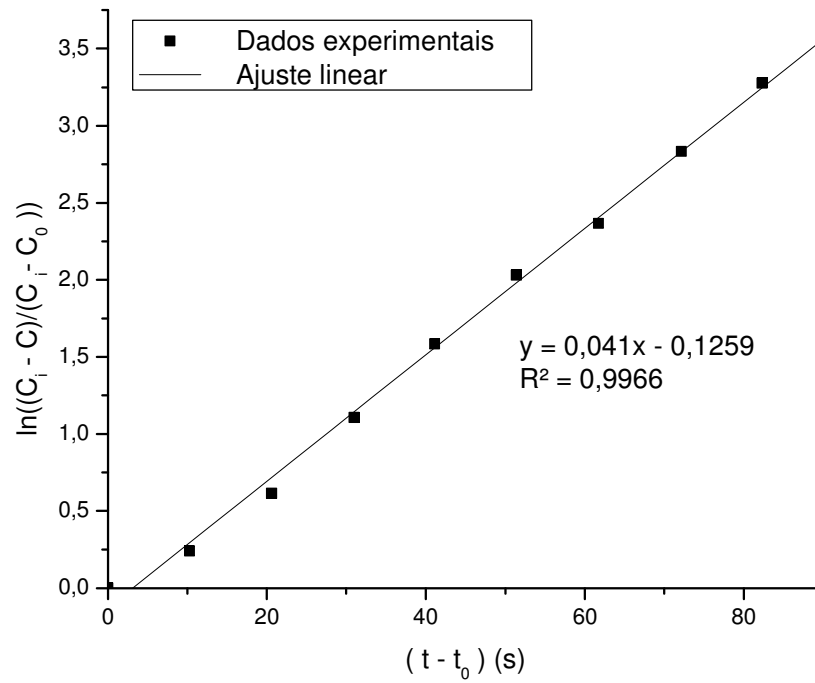


Figura 23: Determinação do  $k_La$  a partir do trecho ascendente da curva do método dinâmico.

## ANEXO A

### Correlações para o $k_L a$

Diversas correlações para o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) foram reunidas da literatura por (BADINO JÚNIOR *et al.*, 2001). Esses modelos encontram-se abaixo.

$$k_L a = 41,44 \left( \frac{P_g}{V} \right)^{0,47} v_s^{0,39} \quad (15)$$

$$k_L a = 19,89 \left( \frac{P_g}{V} \right)^{0,53} v_s^{0,43} \mu_{ap}^{-0,12} \quad (16)$$

$$Sh^* = 1,45 Re_m^{0,83} Sc^{0,43} Fr^{0,74} \left( \frac{\mu_{ap} v_s}{\sigma} \right)^{-0,02} \left( \frac{ND_i}{v_s} \right)^{-0,25} \quad (17)$$

$$k_L a \left( \frac{Q}{V_i} \right)^{-1} = 1,45 \left[ \left( \frac{P_{g_i}}{Q} \right)^* \right]^{0,53} Sc^{-0,20} \sigma^{*-0,40} \quad (18)$$

As equações (15), (16), (17) e (18) possuem coeficiente de correlação de, respectivamente, 0,90; 0,92; 0,94 e 0,96. Esses valores representam bons ajustes para os modelos, permitindo seu uso para estimativa do  $k_L a$  com boa precisão.