

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

GABRIEL OLIVO LOCATELLI

**ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE DA PECTINA PARA USO COMO
SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS**

RECIFE

2012

GABRIEL OLIVO LOCATELLI

**ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE DA PECTINA PARA USO COMO
SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof.^{ca}. Dr.^a. Christine Lamenha
Luna Finkler

Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Finkler

RECIFE

2012

Locatelli, Gabriel Olivo

Estudo das condições de hidrólise da pectina para uso como substrato na produção de polihidroxialcanoatos/ Gabriel Olivo Locatelli. – Recife: O Autor, 2012.

105 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Christine Lamenha Luna Finkler

Coorientador: Leandro Finkler

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biotecnologia Industrial, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Hidrólise 2. Pectina 3. Biopolímeros I. Finkler, Christine Lamenha Luna II. Finkler, Leandro III. Título**

547.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-075

GABRIEL OLIVO LOCATELLI

**ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE DA PECTINA PARA USO COMO
SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS**

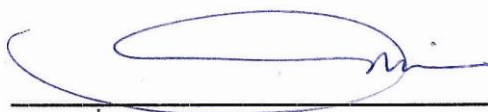
Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA



Profª Drª Christine Lamenha Luna-Finkler

UFPE



Profª Drª Ana Maria Souto-Maior

UFPE



Prof Dr Nelson Medeiros de Lima Filho

UFPE

RECIFE, 27 DE FEVEREIRO DE 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades que surgiram me trazendo de tão longe para conquistar mais essa realização na minha vida.

Agradeço imensamente a minha Família, minha Mãe Mariluci Borga Locatelli e minhas irmãs Claudriana e Luciana Locatelli, que mesmo estão distante, sempre se fizeram presentes em minha vida, me dando força e palavras de conforto nos momentos mais difíceis.

Agradeço aos meus Orientadores, Christine Lamenha Luna Finkler e Leandro Finkler, por acreditar na minha capacidade de desenvolver esse trabalho, me oferecendo esse projeto audacioso e inovador. Também agradeço por darem credibilidade às ideias inusitadas que muitas vezes acabaram rendendo bons resultados. Assim como pelo apoio na pesquisa, no desenvolvimento do trabalho, no estudo e interpretação dos resultados. Não esquecendo os lanches e chimarrão que davam força aos trabalhos nos finais de semana.

Gostaria de agradecer a todos os colegas e amigos de laboratório, Karina, Ana Carla, Lidiane, Janilton, Nizia, Elizandra, Taylline, Larissa, Fran, Dani, Rebeka, Aline e a outros tantos que passaram no laboratório durante esse período e que por ventura esqueci. Aos Técnicos do laboratório, Silvio, Micheli e Edilene, muito obrigado. Em especial gostaria de agradecer a Gabriella Dias da Silva, aluna de iniciação científica, que sempre esteve presente no desenvolvimento do trabalho, inclusive nos finais de semana e até altas horas da noite.

Agradeço a todos os colegas, amigos e professores do Programa de Pós Graduação. Ao Professor Nelson, pela disponibilidade e auxílio nas análises cromatográficas. Assim como a FACEPE, pelo apoio financeiro no desenvolvimento da pesquisa e a estrutura dos laboratórios disponibilizada pelo Centro Acadêmico de Vitória - CAV.

Muito Obrigado!!!

“Nada na Vida pode substituir a persistência. Nem o talento o fará, pois o mundo está cheio de homens talentosos fracassados. Nem a genialidade o fará, pois gênios desempregados são quase um provérbio.

Nem o conhecimento o fará, pois encontramos muitos diplomados medíocres. Apenas a persistência e a determinação são onipotentes!!! ”

CALVIN COALIDJE

RESUMO

As pectinas são hidrocolóides naturais, encontrados na parede celular primária das células vegetais e nas camadas intercelulares, contribuindo para adesão entre as células, firmeza e resistência mecânica dos tecidos. Estão presentes em grande quantidade nos subprodutos das indústrias de extração de sucos cítricos, e muitas vezes são descartados de forma inadequada, representando um grande passivo ambiental. Objetivando o aproveitamento desses resíduos como uma alternativa de baixo custo para a produção de polihidroxialcanoatos (PHAs), foi estudado o uso de ácido galacturônico e hidrolisados pécticos para crescimento celular de *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas putida*. Foram estudados métodos de hidrólise ácida e enzimática, através da aplicação de planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta. Os resultados indicaram que o método de hidrólise enzimática foi mais eficiente permitindo obter um maior rendimento de compostos redutores (CR). As variáveis investigadas foram a concentração da enzima endopoligalacturonase (endo-PG) e a agitação, mantendo-se a concentração de substrato em 1% (p/v). Os resultados obtidos foram comparados com a performance enzimática realizada com uma maior concentração de substrato (10% p/v) empregando-se diferentes concentrações de enzima. Ambos os resultados indicaram que a concentração enzimática de 10 UI/g de pectina favoreceu a obtenção de CR, permitindo atingir em média 70 g/L de CR a partir de 100 g/L de pectina. Ambos os micro-organismos cresceram na presença de ácido galacturônico, mas apenas *C. necator* apresentou crescimento satisfatório nos meios formulados com os hidrolisados pécticos, com velocidades específicas de crescimento (μ_{Max}) e taxas de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) semelhantes aos valores encontrados em estudos com outros substratos, como glicose, açúcar invertido e melaço. Essas condições de cultivo permitiram um crescimento celular acima de 10 g/L e o acúmulo intracelular de polihidroxialcanoatos.

Palavras-chave: Hidrólise ácida. Hidrólise enzimática. Pectina. *Cupriavidus necator*.

ABSTRACT

Pectins are natural hydrocolloids, found in primary cell wall of plants and in the intercellular layers, contributing to adhesion between cells, firmness and mechanical strength of tissues. Present in large amounts in byproducts of the extractive industries of citrus juices, they are often disposed improperly, representing a major environmental liability. Aiming at the use of this waste as a low cost alternative for the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs), galacturonic acid and pectin hydrolyzed were studied for cell growth of *Cupriavidus necator* and *Pseudomonas putida*. Methods of acid and enzymatic hydrolysis were studied through the application of factorial design and response surface methodology. Results indicated that the method of enzymatic hydrolysis was more efficient allowing a higher yield of reducing compounds (RC). The variables investigated were the enzyme (endo-polygalacturonase) concentration and agitation, keeping the substrate concentration on 1% (w/v). The results obtained were compared with enzymatic performance employing a higher concentration of substrate (10% w/v) and different concentration of enzyme. Both results indicated that the enzymatic concentration of 10 UI/g of pectin favored the production of RC, attaining 70 g/L of RC from 100 g/L of pectin. Both microorganisms grew in the presence of galacturonic acid, but only *C. necator* presented satisfactory growth in media formulated with pectic hydrolysates, with maximum specific growth rate (μ_{Max}) and conversion rate of substrate in cells ($Y_{X/S}$) similar to the values found in studies with other substrates, such as glucose, invert sugar and molasses. These cultivation conditions allowed a cell growth above 10 g/L and intracellular accumulation of polyhydroxyalkanoates.

Key-words: Acid hydrolysis. Enzymatic hydrolysis. Pectin. *Cupriavidus necator*.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
SUMÁRIO.....	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. OBJETIVO GERAL:	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. BIOPOLÍMEROS	4
3.2. POLIHIDROXIALCANOATOS	5
3.2.1. Histórico e Distribuição na Natureza	5
3.2.2. Características e Aplicações.....	7
3.2.3. Limitações na Produção de Polihidroxialcanoatos.....	10
3.3. MICRO-ORGANISMOS	11
3.3.1. <i>Cupriavidus necator</i>	12
3.4. PECTINA	16
3.4.1. Estrutura das Pectinas.....	17
3.4.2. Hidrólise	18
4. METODOLOGIA	24
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA PECTINA.....	24
4.2. ENSAIOS DE HIDRÓLISE DA PECTINA	25
4.2.1. Hidrólise Ácida	25
4.2.2. Hidrólise Enzimática	27
4.3. PROCEDIMENTOS DE FERMENTAÇÃO	34
4.3.1. Micro-organismos	34
4.3.2. Inóculo.....	35
4.3.3. Crescimento Celular	35
4.3.4. Produção de PHAs – Hidrolisado de Pectina e Padrão Glicose.	36

4.4.	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	37
4.4.1.	Análise da Concentração de Compostos Redutores Totais	37
4.4.2.	Curva de Crescimento Celular	38
4.4.3.	Análise do pH.....	38
4.4.4.	Análise Qualitativa de PHAs – Sudan Black	38
4.4.5.	Análise dos Monossacarídeos	39
4.4.6.	Análise da Concentração de Nitrogênio Total	40
4.4.7.	Extração e Caracterização dos Biopolímeros	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1.	RESULTADOS PRELIMINARES.....	42
5.1.1.	Caracterização da Pectina.....	42
5.1.2.	Crescimento em Caldo Nutriente - Inóculo.....	42
5.1.3.	Cultivo em Meio Mineral com Ácido Galacturônico.....	44
5.1.4.	Ensaio I de Hidrólise Ácida.....	45
5.1.5.	Ensaio II de Hidrólise Ácida	46
5.1.6.	Ensaio de Velocidade de Reação Enzimática.....	47
5.2.	ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ÁCIDA	50
5.2.1.	Planejamento Fatorial de Hidrólise Ácida.....	50
5.2.2.	Cinética Hidrólise Ácida	52
5.3.	ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	56
5.3.1.	Planejamento Fatorial de Hidrolise Enzimática I.....	56
5.3.2.	Planejamento Fatorial de Hidrólise Enzimática II	57
5.3.3.	Cinética de Hidrólise Enzimática	58
5.3.4.	Planejamento Fatorial de Hidrólise Enzimática III E IV	61
5.3.5.	Ensaio de Performance Enzimática.....	64
5.4.	PRODUÇÃO DE PHA _S – HIDROLISADO DE PECTINA E PADRÃO GLICOSE	66
5.4.1.	Extração dos Biopolímeros	70
5.4.2.	Caracterização dos PHAs	71
5.5.	DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS	72
5.5.1.	Resumos Publicados em Anais de Eventos.....	72
5.5.2.	Resumos Expandidos Publicados em Anais de Eventos	72
5.5.3.	Trabalhos Completos Publicados em Anais de Eventos	73
5.5.4.	Artigo Científico em Periódicos.....	73

6.	CONCLUSÕES.....	75
7.	REFERENCIAS	76
ANEXO A	– Curva de Calibração de CR, expresso em glicose.....	90
ANEXO B	– Curva de calibração de concentração celular, para <i>C. necator</i>	91
ANEXO C	– Curva de Calibração de Nitrogênio.	92
ANEXO D	– Perfil de RMN para o biopolímero obtido no cultivo com glicose	93
ANEXO E	– Perfil de RMN para o biopolímero obtido no cultivo com hidrolisado de pectina	94
ANEXO F	– Perfil de RMN do padrão phb	95
ANEXO G	– Trabalho publicado na revista biotechnology.	96
ANEXO H	– Artigo aceito para publicação na revista Evidência – UNOESC.	104
ANEXO I	– Artigo enviado para a publicação.....	105

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fórmula geral dos PHAs	8
Quadro 1 -	PHAs e seus respectivos grupos R	8
Quadro 2 -	Propriedades do PHB e seus copolímeros	9
Figura 2 -	Rota biossintética do PHB/HV	13
Quadro 3 -	Substratos utilizados como fonte de carbono para <i>C. necator</i>	15
Figura 3 -	Estrutura química das pectinas	18
Figura 4 -	Seqüência de hidrólise das ligações glicosídicas sob condições ácidas	19
Figura 5 -	Classificação das enzimas pectinolíticas	21
Figura 6 -	Cromatograma de uma amostra de hidrolisado.	39
Figura 7 -	Crescimento celular e variação de pH durante o cultivo de <i>C. necator</i> (A) e <i>P. putida</i> (B) em meio caldo nutritivo.	43
Figura 8 -	Crescimento celular durante o cultivo de <i>C. necator</i> e <i>P. putida</i> em meio mineral, contendo ácido galacturônico 1,5%.	44
Figura 9 -	Crescimento celular durante o cultivo de <i>C. necator</i> e <i>P. putida</i> em meio mineral, formulado com hidrolisado químico de pectina (2,20 g/L de CR).	46
Figura 10 -	Conversão de pectina esterificada e desesterificada em CR por tratamento com poligalacturonase (E.C. 3.2.1.15) (teor de substrato de 1% p/v)	48
Figura 11 -	Velocidade de reação enzimática da da endo-PG (E.C. 3.2.1.15) durante a conversão de pectina esterificada e desesterificada em CR (teor de substrato de 1% p/v).	48
Figura 12 -	Crescimento celular durante o cultivo de <i>C. necator</i> e <i>P. putida</i> em meio mineral, contendo hidrolisado enzimático de pectina (4,97g/L de CR) como única fonte de carbono.....	49
Figura 13 -	Superfície de resposta (A), diagrama de Pareto (B) e correlação entre pontos teóricos e experimentais (C), em função da temperatura e concentração de H ₂ SO ₄	51
Figura 14 -	Aspecto dos hidrolisados obtidos em cada ensaio do planejamento fatorial de hidrólise ácida.....	52
Figura 15 -	Concentração de CR (A) e concentração de grupos de carboidratos (B), durante a hidrólise de ácida com 1% de H ₂ SO ₄ e 100° C (Pectina 1% p/v).....	53
Figura 16 -	Aspecto das amostras retiradas durante a cinética de hidrólise ácida com 1% de H ₂ SO ₄ e 100° C (Pectina 1% p/v).....	54

Figura 17 -	Concentração celular, variação do pH e variação de CR, durante o cultivo de <i>C. necator</i> em meio mineral contendo hidrolisado ácido de pectina (3,82 g/L de CR) como única fonte de carbono.....	55
Figura 18 -	Curva de contorno (A) e gráfico de Pareto (B) para a concentração de CR em função da agitação e da concentração de enzima para o primeiro planejamento experimental em 24 h de hidrólise com poligalacturonase.....	56
Figura 19 -	Superfície de resposta (A), curva de contorno (B), gráfico de Pareto (C) e valores preditos <i>versus</i> valores observados (D) para a concentração de CR em função da agitação e da concentração de enzima para o segundo planejamento experimental em 24 h de hidrólise com poligalacturonase.....	57
Figura 20 -	Cinética de hidrólise enzimática com a liberação de CR, na condição otimizada de 10,01 UI/g e 230,3 rpm (Pectina 1% p/v).	59
Figura 21 -	Valores de crescimento celular, pH e consumo de CR durante o cultivo de <i>C. necator</i> meio mineral formulado com hidrolisado enzimático de pectina (5,3 g/L de CR) como única fonte de carbono.	60
Figura 22 -	Superfície de resposta para as variáveis, agitação x concentração de pectina (A), enzima x agitação (B) e concentração de pectina x enzima (C), em função da variável resposta concentração de CR para o terceiro planejamento experimental em 24 h de hidrólise com poligalacturonase.....	61
Figura 23 -	Gráfico de Pareto (A) e valores preditos <i>versus</i> valores observados (B) para a concentração de CR em função das variáveis estudadas para o terceiro planejamento experimental em 24 h de hidrólise com poligalacturonase.....	62
Figura 24 -	Superfície de resposta (A), gráfico de Pareto (B) e valores preditos <i>versus</i> valores observados (C) para a concentração de CR em função das variáveis concentração enzimática e concentração de substrato para o quarto planejamento experimental em 24 h de hidrólise com poligalacturonase.....	63
Figura 25 -	Gráfico de <i>performance</i> enzimática de poligalacturonase por 24 horas hidrólise com 10% de substrato em todas as concentrações de enzima.	65
Figura 26 -	Valores de crescimento celular, pH, consumo de CR e Nitrogênio, durante o cultivo de <i>C. necator</i> meio mineral formulado com hidrolisado glicose (A) e hidrolisado enzimático de pectina (B), como fonte de carbono.....	67
Figura 27 -	Visualização do acúmulo intracelular de PHAs, em cultivo com glicose 36 horas (A) e 42 horas (B) e, cultivo com hidrolisado de pectina 36 horas (C) e 42 horas (D).	69
Figura 28 -	Visualização das fases formadas durante a extração dos PHAs, antes (A) e ao final da remoção do clorofórmio (B).	70
Figura 29 -	Visualização das etapas de precipitação dos PHAs em etanol (A) e material obtido após a secagem (B).	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Níveis codificados e valores reais das variáveis estudadas para os ensaios de hidrólise ácida.....	27
Tabela 2 -	Níveis codificados e valores reais das variáveis estudadas para o primeiro planejamento experimental nos ensaios de hidrólise enzimática	30
Tabela 3 -	Níveis codificados e valores reais das variáveis estudadas para o segundo planejamento experimental nos ensaios de hidrólise enzimática	31
Tabela 4 -	Níveis codificados e valores reais das variáveis estudadas para o terceiro planejamento experimental nos ensaios de hidrólise enzimática	32
Tabela 5 -	Níveis codificados e valores reais das variáveis estudadas para o quarto planejamento experimental nos ensaios de hidrólise enzimática	33
Tabela 6 -	Valores de concentração enzimática estudados no ensaio de performance	34
Tabela 7 -	Composição do meio mineral para cultivo de <i>C. necator</i>	36
Tabela 8 -	Resultado de compostos redutores (CR) obtidos no ensaio I de hidrólise ácida e crescimento celular de <i>C. necator</i> e <i>P. putida</i> com MM formulado com esses hidrolisados.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CR – Compostos Redutores	PMG – polimetilgalacturonase
GalA – Ácido Galacturônico	PMGE – polimetilgalacturonato esterase
Gli – Glicose	PGL – poligalacturonato liase
Gal – Galactose	PG – poligalacturonase
Xi – Xilose	endo-PGs – endo-poligalacturonases
Fru – Frutose	EC – Enzyme Commission
PHAs – Polihidroxialcanoatos	UI – Unidade de atividade enzimática
PHB / P-3HB – Polihidroxibutirato	rpm – Rotação por minuto
PHBV – poli(hidroxibutirato-co-valerato)	Abs – Absorbância
PP – Polipropileno	PCCR – Planejamento Composto Central Rotacional
3-HV – 3-hidroxivalerato	CN – Caldo Nutriente
3-HHx – 3-hidroxihexanoato	MM – Meio Mineral
HAs – Hidroxialcanoatos	p/v – Peso por Volume
R – Grupos radicais	v/v – Volume por volume
SCL – Short-Chain-Length (monômeros de cadeia curta)	DNS – Ácido dinitrosalicílico
MCL – Medium-Chain-Length (monômeros de cadeia média)	RMN – Ressonância Magnética Nuclear
DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	ES – Enzima/Substrato
DE – Grau de Esterificação	ICI – Imperial Chemical Industrie
HMP – Alto grau de metoxilação da pectina	P&G – Procter & Gamble
LMP – Baixo grau de metoxilação da pectina	IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo
HMF – Hidroximetilfurfural	ICB – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
PMGL – polimetilgalacturonato liase	UNOESC – Universidade do Oeste de Santa Catarina.

1. INTRODUÇÃO

Na década de 40 a descoberta dos materiais plásticos revolucionou a indústria e a sociedade, devido as suas características de flexibilidade, versatilidade, praticidade, e principalmente durabilidade, tudo isso atribuído a um material de baixo custo, que rapidamente substituiu produtos e embalagens de outros materiais, como papel, vidro e metais, assumindo posição relevante na sociedade e tornando-se cada vez mais presente no nosso dia a dia.

Sua aplicação em materiais de rápida circulação, aliado ao descarte inadequado, fez de uma de suas principais características – durabilidade – a grande causadora de graves danos ambientais. Além de se encontrarem espalhados nos grandes centros urbanos, também se acumulam por todos os ambientes onde há presença do homem, e com as águas das chuvas são levados aos córregos e rios, chegando ao mar. Nos oceanos se acumulam em grandes manchas de material parcialmente degradado, sendo que atualmente já são conhecidas cinco dessas manchas de plásticos, calculando-se cobrirem mais de 40% da superfície dos oceanos ou ¼ do globo terrestre (O GLOBO, 2010), causando a morte de muitos animais marinhos, que o confundem com o alimento.

Em decorrência aos danos ambientais, tem aumentando a conscientização global da sociedade pela minimização dos resíduos gerados; em contrapartida, a comunidade científica busca alternativas tecnológicas para esse problema. Os polímeros biodegradáveis vêm ganhando destaque nesse cenário, como os polihidroxialcanoatos (PHAs) que são acumulados por diversos microrganismos como reserva de carbono e energia.

A bactéria *Cupriavidus necator* é um dos mais interessantes para aplicação industrial, pois em condições desfavoráveis de crescimento e na presença de excesso de fonte de carbono, pode acumular mais de 80% de sua massa seca em PHAs, utilizando diversas fontes de substrato (RAMSAY, 1994). Dentre as espécies do gênero *Pseudomonas* várias possuem a capacidade de acumular PHAs, e apesar de acumularem menor quantidade intracelular, conseguem utilizar uma extensa variedade de substratos, como alcanos e ácido alcanóico, produzindo PHAs de cadeias médias e longas (HAYWOOD *et al.*, 1988, apud ANDERSON & DAWES, 1990).

Esses biopolímeros possuem todos os atributos para substituírem os plásticos de origem petroquímica, mas seu entrave comercial está relacionado ao alto custo de produção. Este chega a ser de 5 a 10 vezes mais oneroso que os polímeros de síntese química (POIRIER

et al., 1995; GOMES & BUENO, 1997), o que em parte está relacionado ao substrato utilizado como fonte de carbono, que pode representar 40% do custo de produção (KIM, 2000). Muitos trabalhos têm buscado fontes alternativas de matéria prima, como a utilização de resíduos agroindustriais, que além do baixo custo, muitas vezes não são tratados adequadamente.

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de laranja e maracujá, respondendo por mais da metade do suco de laranja produzido no Mundo. A industrialização de ambas as frutas gera grandes volumes de resíduos, que chegam a representar mais da metade do peso dos frutos. Resíduos agroindustriais, como farelos, cascas e bagaços de frutas são ricos em pectina e outros componentes, podendo ser fontes de carbono e energia viáveis para processos de biotransformação (PINTO *et al.*, 2006).

Poucos trabalhos têm sido feitos visando à sacarificação da pectina, sendo o ácido D-galacturônico uma importante matéria-prima na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos, podendo ser usado na fabricação de vitamina C, agentes acidificantes e tensoativos (JÖRNEDING *et al.*, 2002). Não há relatos na literatura sobre o uso de pectina ou seus produtos de hidrólise para a produção de biopolímeros por via microbiana.

A pectina é susceptível a degradação por métodos de hidrólise ácida ou enzimática. Métodos ácidos geralmente são empregados em procedimentos analíticos, mas as divergências nos resultados sugerem que as técnicas devem ser significativamente melhoradas (LEITÃO *et al.*, 1995). Condições fortemente ácidas por tempos prolongados acarretam em taxas de destruição dos GalA's livres, maiores do que as taxas de liberação do polímero (GARNA *et al.*, 2006).

Já os métodos enzimáticos são mais empregados na indústria para aumentar o rendimento nos processos de extração e clarificação de sucos. Entre as pectinases as endo-PGs (E.C.3.2.1.15) são provavelmente os biocatalisadores mais importantes, sendo capazes de hidrolisar tanto pectina como ácidos pécticos. No entanto, do ponto de vista cinético poucos trabalhos tem sido feitos para entender o modo de ação dessas enzimas (KISS *et al.*, 2008).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar os métodos de hidrólise ácida e enzimática da pectina para obtenção de ácido galacturônico e outros monossacarídeos constituintes, e utilizá-los como substrato para crescimento celular e produção de polihidroxialcanoatos por *C. necator*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Investigar métodos de hidrólise ácida e enzimática de pectina para obtenção de altos rendimentos de compostos redutores visando utilizar os hidrolisados como substrato para crescimento celular e produção de polihidroxialcanoatos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Investigar as condições de hidrólise ácida e enzimática de uma pectina comercial por meio de planejamento fatorial;
- Avaliar a capacidade de crescimento celular de *C. necator* e *P. putida* utilizando ácido galacturônico e hidrolisado péctico como fontes de carbono;
- Definir o método de hidrólise que possibilite a obtenção de altos rendimentos de compostos redutores a partir da pectina;
- Selecionar o micro-organismo mais adequado para crescimento celular utilizando o hidrolisado péctico;
- Comparar o crescimento celular e a produção de polihidroxialcanoatos, pelo micro-organismo selecionado, utilizando glicose e hidrolisado péctico como substratos na formulação do meio de cultivo;
- Realizar a extração dos polihidroxialcanoatos e comparar os polímeros obtidos com os diferentes substratos utilizados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. BIOPOLÍMEROS

Os biopolímeros são macromoléculas de alto peso molecular, sintetizados por diversos organismos vivos, presentes como constituintes estruturais, sendo em sua maioria, de origem orgânica. De acordo com sua estrutura química podem ser classificados como poliaminoácidos, polissacarídeos e poliésteres.

Poliaminoácidos são formados por ligações polipeptídicas, com estrutura majoritariamente protéica, podendo variar de polímeros solúveis a estruturas extremamente resistentes, como os fios das teias de aranhas. Como bioplástico de origem polipeptídica, podemos citar o poly- γ -glutamato, produzido por fermentação (RAMSAY & RAMSAY, 1999). Esses polipeptídios têm despertado o interesse para uso em copolímeros, como relatado por Zhu *et al.* (2010), na síntese de poli(etileno glicol)-*bloco*-poli(benzil *L*-glutamato)-*graft*-poli(etileno glicol) (PEG-*b*-PBLG-*g*-PEG).

Os polissacarídeos são produzidos por uma ampla variedade de micro-organismos e plantas, com diferentes estruturas e composições. Celulose, hemicelulose, amido e pectina, produzidos por plantas, são os mais abundantes na natureza, mas muitos outros biopolímeros produzidos por algas e micro-organismos, como ágar, alginato, xantana, gelana e dextrana, possuem propriedades interessantes (GLAZER & NIKAIDO, 2007). Pectina e alginato têm sido estudadas na obtenção de biofilmes reticulados com cálcio, para aplicação em embalagens ativas (SILVA *et al.*, 2009; BIERHALZ, 2010).

Dentre os polissacarídeos, os polímeros de amido vêm sendo os mais estudados para a produção de biofilmes. O amido pode ser submetido a modificações químicas de esterificação, dando origem ao amido modificado; ou ser extrudado, dando origem a um material termoplástico denominado amido desestruturado. Ambos podem ser blendados com polímeros advindos do petróleo, ou outros biopolímeros, dando origem ao amido complexado (PRADELLA, 2006). Pellicano e colaboradores (2009) obtiveram excelentes taxas de degradação em um composto polimérico formado por poli(hidroxibutirato-co-valerato)-PHBV (Biocycle®), poli(butileno adipato-tereftalato)-Ecoflex® e amido de mandioca, mantendo as propriedades físico-mecânicas a um custo viável para aplicação comercial.

A outra classe de biopolímeros são os poliésteres, formados por ligações ésteres entre moléculas de ácidos orgânicos. Dentre eles temos os polilactatos, que são produzidos por síntese química a partir do ácido láctico, e os polihidroxialcanoatos, compostos por ácidos hidroxialcanóicos e produzidos por diversos micro-organismos (RAMSAY & RAMSAY, 1999; PRADELLA, 2006).

3.2. POLIHIDROXIALCANOATOS

3.2.1. HISTÓRICO E DISTRIBUIÇÃO NA NATUREZA

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres de ácidos carboxílicos acumulados como material de reserva energética por mais de uma centena de espécies de micro-organismos (LAI *et al.*, 2005; GLAZER & NIKAIDO, 2007), mas novas descobertas e estudos recentes vêm comprovando sua ampla distribuição na natureza, indicando a sua presença em uma infinidade de organismos vivos.

Oligômeros de polihidroxibutirato (PHB) de baixo peso molecular, com 120 a 200 unidades monoméricas, podem ser encontrados como constituintes de membranas celulares, o que em Escherichia coli permite que as células sejam competentes às transformações genéticas. Podem ainda ser encontrados em tecidos vegetais, em órgãos de animais (como coração de boi, fígado de galinha, rim de suíno) e no plasma do sangue humano (KESSLER & WITHOLT, 1999).

Esse grupo de polímeros foi descoberto em 1926, quando o microbiologista francês Maurice Lemoigne do Instituto Pasteur descobriu e caracterizou o poli(3-hidroxibutirato) (P-3HB) em bactérias do gênero Bacillus megaterium (GLAZER & NIKAIDO, 2007). Em 1958, Macrae e Wilkinson, estudando a mesma espécie de Bacillus, verificaram que este micro-organismo armazenava o PHB, principalmente quando as proporções de carbono/nitrogênio no meio estavam altamente elevadas, concluindo que este polímero era armazenado como material de reserva de carbono e energia (SLEPECKY & LAW, 1960).

Ainda na década de 60 a descoberta de propriedades termoplásticas aumentou o interesse sobre os plásticos biodegradáveis, levando em 1962 a ser depositada nos EUA, por J.N. Baptisti, a primeira patente sobre a produção industrial de PHAs, apesar de a produção

industrial só vir a ocorrer 20 anos mais tarde (BRANDL *et al.*, 1990; ANDERSON & DAWES, 1990).

A partir da década de 70, motivados pela crise do petróleo, diversas pesquisas começaram a serem desenvolvidas. Em 1974, a ocorrência de PHAs em lodo ativado de esgoto mostrou a inclusão de outros monômeros ao polímero, além do já conhecido 3-hidroxibutirato, como o 3-hidroxivalerato (3-HV) e 3-hidroxihexanoato (3-HHx). Em 1983, análises de PHAs em sedimentos marinhos revelaram a presença de outros 11 monômeros de hidroxicanoatos (GLAZER & NIKAIDO, 2007).

A produção industrial de PHAs só teve início em 1982, quando a empresa inglesa Imperial Chemical Industrie (ICI) reconheceu o potencial do PHB como substituto dos plásticos de origem petroquímica, passando a produzir e comercializar um poliéster biodegradável com o nome comercial de Biopol® (ANDERSON & DAWES, 1990), um copolímero de PHBV produzido por bactérias a partir de uma mistura de glicose e ácido propiônico (PRADELLA, 2006). O produto não teve grande sucesso comercial na época, principalmente pelo seu alto custo, e somente em 1990 uma empresa alemã (Wella®) passou a comercializar um shampoo em embalagens de Biopol® (KESSLER & WITHOLT, 1999).

Nesse período, a ZENECA Bioprodutos (antiga ICI) iniciou o desenvolvimento do processo de produção de PHB e PHBV em plantas transgênicas, que continuou a ser desenvolvido após ser incorporada pela Monsanto (EUA) em 1996 (PRADELLA, 2006). Em 2001 a Monsanto vendeu sua marca Biopol® para a Metabolix dos EUA, porém continuou trabalhando para a produção de PHB e PHBV em plantas geneticamente modificadas (KESSLER & WITHOLT, 1999).

Em 2004, a Procter & Gamble dos EUA (P&G®) emergiu com um polímero de propriedades físicas superiores ao PHB e PHBV, um copolímero de PHB com 3-hidroxihexanoato (PHB/HHx) denominado Nodax®, produzido por processo de fermentação utilizando micro-organismos geneticamente modificados, a partir de glicose e óleos vegetais, sobretudo óleo de palma. A P&G® licenciou a empresa japonesa Kaneka Co para produção de Nodax® em escala industrial (PRADELLA, 2006).

O PHB também foi explorado comercialmente pelas empresas W.R. Grace e Chimie Linz, que foi sucedida pela Biomer, localizada na Alemanha, que produz este homopolímero por bactérias em biorreatores de pequena escala a partir de sacarose. A Mitsubishi Gas Chemical Company, no Japão, também produz o PHB a partir de metanol, com o nome de Biogreen® (PRADELLA, 2006).

No Brasil em 1992, uma parceria entre Coopersucar, IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo) e ICB (Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo), deu início às atividades de pesquisa nessa área, com a seleção de uma nova espécie *Burkholderia sacchari*, isolada de solos de canaviais, possuindo uma boa capacidade de acúmulo de PHB, a partir de sacarose (SILVA *et al.*, 2007). Em 1995 a tecnologia de produção desenvolvida foi transferida para a indústria PHB – Industrial, com planta piloto implantada na Usina da Pedra em Serrana – SP, com capacidade de produção nominal de 5 ton/ano. Em 2000 a planta foi remodelada, inserindo algumas alterações no processo, e aumentando sua capacidade para 50 ton/ano. Hoje a empresa, controlada pelo Grupo Balbo, é proprietária da marca Biocycle®, através da qual comercializa seus produtos (PHB e PHBV) para o Brasil e mercado externo (BIOCYCLE, 2011).

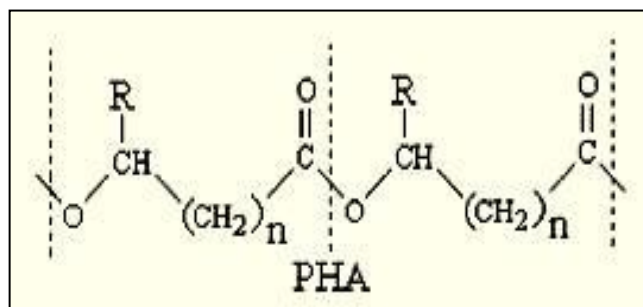
3.2.2. CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES

Os PHAs são armazenados na forma de corpos de inclusão (grânulos), com peso molecular na faixa de 2×10^5 a 3×10^6 Da, variando de acordo com a espécie de micro-organismo e as condições de crescimento (BYROM, 1994). Esses grânulos são insolúveis em água e ficam localizados no citoplasma da célula bacteriana, com a vantagem de armazenar excesso de nutrientes sem afetar o seu condicionamento fisiológico (VERLINDEN *et al.*, 2007).

A superfície do grânulo é revestida com uma camada de fosfolipídios e proteínas, predominantemente PHAsins, uma classe de proteínas que é capaz de influenciar o número e tamanho dos grânulos de PHA (PÖTTER *et al.*, 2002). A esterioespecificidade das enzimas biossintéticas garantem a configuração estereoquímica R, apresentada por todos os PHAs que têm sido caracterizados até o momento (KESSLER & WITHOLT, 1999; VERLINDEN *et al.*, 2007).

Atualmente são conhecidos mais de 150 ácidos hidroxialcanóicos que podem compor os PHAs (REHM, 2003; SILVA *et al.*, 2007), entre as diferentes espécies de micro-organismos, dependendo das fontes de carbono utilizadas na suplementação dos meios de cultura. Esses monômeros indicados na Figura 1 como radicais (R), freqüentemente encontram-se na forma de 3-hidroxialcanoatos (3-HAs) com cadeias de 3 a 14 átomos de carbono, mas podem se encontrar na forma de 4-HAs ou 5-HAs, com cadeias saturadas e insaturadas, podendo conter grupos alifáticos e aromáticos (DOI *et al.*, 1992; STEINBUCHER & VALENTIN, 1995).

Figura 1 - Fórmula geral dos PHAs



Fonte: Silva *et al.*, 2007.

Por essa ampla variedade de radicais (R) as possíveis combinações de poliésteres são praticamente infinitas, sendo que as propriedades físico-químicas são regidas pela disposição e pelos diferentes tipos de monômeros que compõem a cadeia polimérica (SIM *et al.*, 1997). Com base no tamanho da cadeia carbônica dos seus monômeros, os PHAs podem ser divididos em dois grupos: os polímeros com monômeros de cadeia curta (SCL – Short-Chain-Length), que possuem resíduos de 3 a 5 átomos de carbono, e os polímeros com monômeros de cadeia média (MCL – Medium-Chain-Length), com resíduos de 6 a 14 átomos de carbono (STEINBÜCHEL & LÜTKE, 2003). No Quadro 1 temos alguns exemplos de radicais monoméricos.

Quadro 1 - PHAs e seus respectivos grupos R

Abreviatura	Nome do Composto	Radical (R)
PHB	Poli (3-hidroxibutirato)	CH ₃
P(4HB)	Poli (4-hidroxibutirato)	H
PHV	Poli (3-hidroxivalerato)	CH ₂ CH ₃
P(4HV)	Poli (4-hidroxivalerato)	CH ₃
PHHx	Poli (3-hidroxihexanoato)	(CH ₂) ₂ CH ₃
P(5HHx)	Poli (5-hidroxihexanoato)	CH ₃
PHO	Poli (3-hidroxioctanoato)	(CH ₂) ₄ CH ₃
PHD	Poli (3-hidroxidecanoato)	(CH ₂) ₆ CH ₃
PHDD	Poli (3-hidroxidodecanoato)	(CH ₂) ₈ CH ₃

Fonte: Adaptado pelo Autor.

O PHB foi o primeiro PHA a ser descoberto, sendo, portanto, o mais bem estudado e conhecido. Caracteriza-se por ser frágil, possuir pouca elasticidade e alto grau de cristalinidade (SUDESH, 2000), com temperatura de fusão perto de 180° C (DOI *et al.*, 1990). A fim de melhorar essas características e expandir suas aplicações, diversos trabalhos têm

sido desenvolvidos buscando descobrir novas combinações de monômeros que melhorem as suas características termoplásticas (DOI *et al.*, 1995). Algumas das propriedades físicas do PHB e seus copolímeros podem ser comparadas ao polipropileno e são mostradas no Quadro 2.

Quadro 2 - Propriedades do PHB e seus copolímeros

PHB/Copolímero (%)	PHB	PHB/HV	PHB/HV	PHB/4HB	PHB/Hx	PP
Parâmetros	(100)	(97/03)	(80/20)	(84/16)	(90/10)	
Temperatura de Fusão (° C)	177	169	145	150	127	176
Temperatura de Transição Vítrea (° C)	2	--	-1	-7	-1	-10
Cristalinidade (%)	60	--	56	45	34	50 – 70
Resistência a Tração (MPa)	43	38	20	26	21	38
Extensão de ruptura (%)	5	--	50	444	400	400

PHB – poli(3-hidroxibutirato); PHB/HV – poli(3-hidroxibutirato-3-hidroxivalerato); PHB/4HB – poli(3-hidroxibutirato-4-hidroxibutirato); PHB/Hx – poli(3-hidroxibutirato-hidroxihexanoato); PP – Polipropileno).

Fonte: Adaptado de Verlinden *et al.*, 2007; Ojumu *et al.*, 2004.

Entre os diversos polímeros biodegradáveis em desenvolvimento, os PHAs têm atraído a atenção graças às propriedades semelhantes com os plásticos convencionais, o que é devido a esta ampla diversidade química dos seus radicais (POLI *et al.*, 2011). Esses polímeros podem variar desde plásticos rígidos e quebradiços, até macios, elastômeros, borrachas e colas, dependendo de sua composição monomérica (KESSLER & WITHOLT, 1999). Alguns filmes de PHAs apresentam propriedades de barreira a gás comparáveis ao poli(cloreto de vinilo) e ao poli(tereftalato de etileno), com a vantagem de serem biodegradáveis (CHOI *et al.* 1999; QUILLAGUAMÁN *et al.* 2010).

A presença de monômeros aromáticos no PHA pode mudar significativamente suas propriedades físicas, levando a novas aplicações biomédicas e biotecnológicas (GARCIA *et al.*, 1999). As propriedades de biocompatibilidade identificadas em certos poliésteres possibilitam sua aplicação na área médica, principalmente por serem atóxicos, sendo que a degradação de P-3HB produz o ácido 3-hidroxibutírico, que é constituinte normal do sangue humano (ASRAR & HILL, 2002). Podem ser empregados na forma de fios de sutura, microcápsulas para liberação controlada de fármacos, moldes para próteses utilizadas na ortopedia, placas ósseas, válvulas cardíacas, telas e parafusos cirúrgicos, suportes para cultura de fibroblastos, além de outros dispositivos terapêuticos (SUDESH *et al.*, 2000; ANDERSON & WYNN, 2001; ZINN *et al.*, 2001; RÉ & RODRIGUES, 2006).

Na indústria de tintas, vem sendo usados nas misturas como um aditivo ecologicamente correto (VAN DER WALLE, *et al.*, 1999). Possibilitam ainda inúmeras

outras aplicações, tais como: copos, pratos e talheres descartáveis, revestimento de embalagens alimentícias, tampas de embalagens Tetra Park, tubetes para a produção de mudas vegetais, embalagens de agrotóxicos, fibras têxteis, componentes de equipamentos eletrônicos, entre outras.

3.2.3. LIMITAÇÕES NA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS

Estes biopolímeros possuem todos os atributos básicos para substituírem os plásticos de origem petroquímica, como resistência a solventes orgânicos, a termoplasticidade e a facilidade de processamento industrial em equipamentos já existentes para os plásticos convencionais (BYROM, 1987 apud FORMOLO *et al.*, 2003).

No entanto, a produção desses biopolímeros ainda chega a ser de 5 a 10 vezes mais dispendiosa do que os polímeros de síntese química (POIRIER *et al.*, 1995). Por serem acumulados como corpos de inclusão intracelulares, são necessárias etapas de extração e purificação dos biopolímeros, com o rompimento das células e eliminação dos resíduos celulares por meio de solventes e outros produtos químicos. Essas etapas, conhecidas como “*downstream*”, contribuem significativamente para o aumento nos custos de produção (OLIVEIRA *et al.* 2004).

Visando viabilizar esse processo, alguns fatores podem contribuir para tornar os PHAs mais competitivos no mercado, tais como o desenvolvimento de melhores cepas, que possibilitem a obtenção de altas concentrações celulares, além do acúmulo de grande quantidade de biopolímeros, crescendo em substrato de baixo custo; além de processos de extração e recuperação mais eficientes, com poucas etapas e menor emprego de solventes orgânicos (CHOI & LEE, 1999).

Desta forma, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos buscando o crescimento das linhagens produtoras de PHAs em fontes de carbono renováveis e resíduos agroindustriais (BONATTO *et al.*, 2004). Também tem se mostrado promissora a produção de PHAs em plantas geneticamente modificadas, estabelecendo um novo ciclo de carbono utilizando apenas a luz como fonte de energia (ARAI *et al.*, 2004). Entretanto as células vegetais só podem acumular baixos níveis de PHAs (<10% do peso seco), pois níveis superiores influenciam negativamente sobre o crescimento vegetal (BOHMERT *et al.*, 2002).

3.3. MICRO-ORGANISMOS

Hoje são conhecidas mais de 250 espécies de bactérias, incluindo Gram-negativas e Gram-positivas, que podem acumular vários tipos de PHAs (STEINBÜCHEL, 1991; STEINBÜCHEL *et al.*, 1992). Entre elas se incluem bactérias heterotróficas aeróbicas e anaeróbicas, como: *Azotobacter beijerinckii*, *Zoogloea ramigera* e *Clostridium butylicum*; fototróficas aeróbicas e anaeróbicas, como: *Cholorogloea fritschii*, *Rhodospirillum rubrum* e *Chromatium okenii*; quimiolitotróficas, como *Cupriavidus necator* (GLAZER & NIKAIDO, 2007). Também são produzidos por algumas eubactérias, membros da família *Halobacteriaceae* pertencente ao domínio *Archaea*, entre os gêneros *Haloferax*, *Haloarcula*, *Natrialba*, *Haloterrigena*, *Halococcus*, entre outros (REHM & STEINBÜCHEL, 1999, POLI *et al.*, 2011).

Várias espécies do gênero *Pseudomonas* também foram examinadas quanto a sua capacidade de acumular PHAs, dentre elas *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens* e *P. testosteroni*. As bactérias desse gênero conseguem utilizar uma extensa variedade de substratos, como alcanos e ácido alcanóico, produzindo PHAs de cadeias médias e longas (HAYWOOD *et al.*, 1988, apud ANDERSON & DAWES, 1990).

A capacidade de acúmulo intracelular de PHAs em percentagem de peso seco varia amplamente de um organismo para outro (GLAZER & NIKAIDO, 2007) e geralmente está associada a condições de crescimento limitantes em algum nutriente e na presença de excesso de fonte de carbono (MADISON & HUISMAN, 1999).

Algumas dessas espécies já estão estabelecidas em processos industriais, como a já comentada *Burkholderia sacchari*, com a capacidade de acumular PHB a partir de sacarose (SILVA *et al.*, 2007), utilizada pela empresa PHB Industrial; *Alcaligenes latus*, empregada no processo desenvolvido pela Biotechnologische Forschungsgesellschaft, empresa austríaca, que também possui a capacidade de consumir sacarose para a produção de PHB; e a espécie *Cupriavidus necator*, empregada para a produção de PHB utilizando glicose como fonte de carbono, no processo industrial desenvolvido pela empresa ZENECA Bioprodutos (KESSLER & WITHOLT, 1999). No entanto, vale ressaltar que mesmo esses processos já bem estabelecidos encontram dificuldades comerciais pelo alto custo de seus processos, principalmente pelos substratos utilizados como fonte de carbono.

Desta forma, a seleção do micro-organismo deve levar em consideração o crescimento em substratos de baixo custo, além da capacidade de produção em escala industrial, nível de segurança do micro-organismo, facilidade de extração do polímero, produção em alta

densidade celular e acúmulo em porcentagens elevadas de PHAs em relação a sua massa seca (BYROM, 1992; RAMSAY, 1994). Por algumas dessas características e pela capacidade de utilizar diversos substratos como fonte de carbono para a produção de PHAs, a bactéria *Cupriavidus necator* vem sendo amplamente estudada para essa finalidade.

3.3.1. CUPRIAVIDUS NECATOR

Foi descrita por Makkar e Casida em 1987, isolada a partir de solo nas imediações do University Park, PA, EUA. Foi primeiramente classificada como *Alcaligenes eutrophus* (LAFFERTY *et al.*, 1988), pois foram observadas várias características compartilhadas com o gênero *Alcaligenes*. Porém foi reclassificada à *Ralstonia eutropha* (YABUUCHI *et al.*, 1995) e posteriormente à *Wautersia eutropha* (VANEECHOUTTE *et al.* 2004). Entretanto, novos estudos filogenéticos levaram a uma nova reclassificação sendo hoje conhecida como *C. necator*. Embora sejam inconvenientes duas alterações na nomenclatura para uma bactéria dentro de um ano, tais reclassificações taxonômicas são justificadas pelo surgimento de novos dados (VANDAMME & COENYE, 2004).

É uma bactéria Gram-negativa, com crescimento estimulado pelo cobre, sendo resistente a altas concentrações desse elemento. Em processo de predação esta linhagem produz sinais químicos, um dos quais quelatos de cobre (MAKKAR & CASIDA, 1987). Possui habilidade de crescer em diferentes fontes de carbono, com temperatura ótima de crescimento em 30° C, em condições de aerobiose, podendo atingir altas densidades celulares, até 100 g/L (BYROM, 1990) e acumular até 80% do seu peso seco em PHAs (DOI *et al.*, 1990).

A forma de cultivo mais empregada é a fermentação submersa sob agitação, que até pouco tempo era o único processo estudado, mas de acordo com Kim (2000), 40% do custo de produção é referente à matéria-prima utilizada como fonte de carbono, e como revisado por Oliveira *et al.* (2004), outros 40% podem ser atribuídos as etapas de “*downstream*”. Nesse contexto, a fermentação em estado sólido tem se tornado uma alternativa interessante, pois além de possibilitar a utilização de matérias-primas de baixo custo, como resíduos agroindustriais, também pode diminuir etapas de “*downstream*” (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

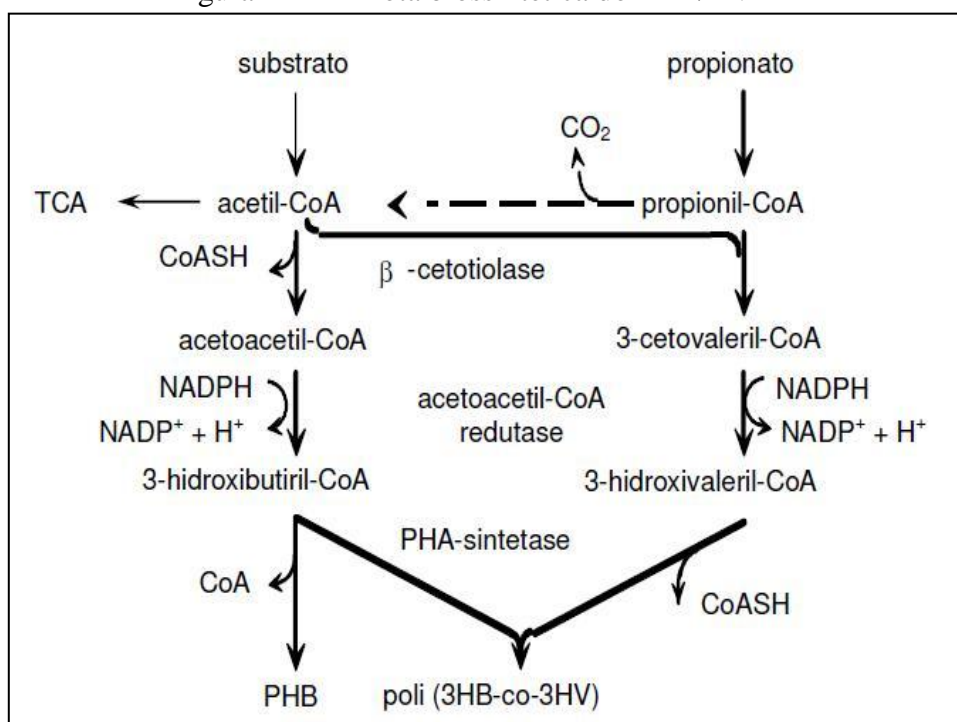
O processo industrial ocorre por fermentação submersa, sendo compreendido por duas etapas: inicialmente ocorre a fase de crescimento celular, com o objetivo de geração de biomassa, em meio de cultura balanceado, e em seguida procede-se uma fase com limitação de um nutriente essencial (DAWES & SENIOR, 1973). No processo industrial geralmente o

nutriente limitante é o fósforo, mantendo a alimentação de glicose ou glicose + ácido propiônico até aproximadamente 48 horas, quando se atinge o nível máximo de concentração celular e acúmulo de biopolímero (KESSLER & WITHOLT, 1999).

3.3.1.1. Vias biossintéticas

As vias bioquímicas da síntese de PHB são bem conhecidas, e na maioria das bactérias, como *Cupriavidus necator*, a biossíntese independe da fonte de carbono utilizada, sendo realizada em três estágios a partir da formação de acetil-CoA pela via de degradação dos carboidratos. Primeiramente a enzima β -cetotilase promove a condensação de duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA; em seguida, essa molécula é reduzida, por uma reação estereoseletiva, à R-3-hidroxi-butiril-CoA pela ação de uma acetoacetil-CoA redutase (NADPH-dependente) e; por último, a polimerização é catalisada pela PHA-sintetase (HAYWOOD *et al.*, 1989; RODRIGUES, 2005). A Figura 2 mostra a rota biossintética do PHB/HV.

Figura 2 - Rota biossintética do PHB/HV



Fonte: DOI *et al.*, 1990.

Como já comentado, o acúmulo ocorre na maioria das bactérias quando a fonte de carbono é fornecida em excesso com limitação de algum nutriente, como nitrogênio, fósforo, potássio ou oxigênio (STEINBÜCHEL & SCHLEGEL, 1989; VERLINDEM *et al.*, 2007). A síntese de PHB é regulada a nível enzimático pela disponibilidade de substrato adequado para as rotas de síntese do PHB, o que resulta de um desequilíbrio no fornecimento de alguns nutrientes, sendo que a concentração intracelular de acetil-CoA e coenzima-A livre desempenham um papel central na regulação da síntese (HAYWOOD *et al.*, 1988).

Sob condições de crescimento equilibrado o acetil-CoA é oxidado através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, liberando a coenzima-A livre que inibe a enzima β -cetotiolase, não formando o acetoacetil-CoA e inibindo a síntese do PHB e o NADH gerado, utilizado para fins de biossíntese. Quando o crescimento cessa, o NADH aumenta a concentração, o que reduz a atividade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, como resultado o acetil-CoA não é oxidado e entra na via de síntese do PHB (KESSLER & WITHOLT, 1999; RATLEDGE & KRISTIANSEN, 2001).

Para a formação do copolímero PHBV, uma mistura de substrato tem que ser fornecida como precursor do 3-hidroxivalerato. No caso do cultivo de *C. necator*, isso é fornecido pela mistura de glicose e ácido propiônico. Nesse caso praticamente a mesma rota bioquímica é utilizada, sendo o propionil-CoA e o acetil-CoA condensados pela β -cetotiolase, levando à formação do 3-cetovaleiril-CoA, que leva à incorporação do 3-hidroxivalerato ao polímero (KESSLER & WITHOLT, 1999).

3.3.1.2. Substratos utilizados como fonte de carbono

Como já exposto, um dos obstáculos para a viabilidade comercial dos PHAs é o alto custo de produção, representado em grande parte pela fonte de carbono utilizada em processos industriais. Portanto, vários estudos têm tentado minimizar os custos dos componentes do meio, e mesmo em alguns casos demandando tratamentos específicos, os resíduos agroindustriais parecem ser economicamente atrativos, com estudos já demonstrando resultados satisfatórios (MARANGONI *et al.*, 2001). Marconi e colaboradores (2001) testaram frente a diferentes fontes de carbono, água de maceração de milho como fonte de nitrogênio em substituição aos atuais sais de amônia que são utilizados, concluindo que é uma alternativa viável para essa finalidade (SILVA *et al.*, 2007). Diversos outros substratos já foram testados como fontes de carbono para *C. necator*, como apresentado no Quadro 3.

Quadro 3 - Substratos utilizados como fonte de carbono para *C. necator*

Linhagem	Substrato	Referência
<i>C. necator</i>	Frutose Formiato Acetato Propionato Lactato Glutamato Succinato	FORMOLO <i>et al.</i> , 2003
<i>C. necator</i> DSMZ 545	Galactose Hidrolisado de Lactose Açúcar Invertido	MARANGONI <i>et al.</i> , 2001
<i>C. necator</i> DSMZ 81 (Geneticamente modificado)	Lactose Soro de Leite Hidrolisado e permeado	POVOLO <i>et al.</i> , 2010
<i>C. necator</i> H16 (ATCC17699)	Óleo de colza e propanol Óleo de Oliva Óleo de Milho Óleo de Soja Óleo de Girassol Óleo de Girassol Usado	OBRUCA <i>et al.</i> , 2010
<i>C. necator</i> (Geneticamente modificado)	Óleo de Palma Bruto	CHIA <i>et al.</i> , 2010
<i>C. necator</i> H16 (ATCC17699)	Óleo de Palma usado e 1,4 butanodiol	RAO <i>et al.</i> , 2010
<i>C. necator</i>	Ácido Oléico	EGGINK <i>et al.</i> , 1993
<i>C. necator</i> DSMZ 545	Ácido Lático	TSUJE <i>et al.</i> , 1999
<i>C. necator</i> DSMZ 545	Ácido Acrílico	FINKLER, 2006
<i>C. necator</i> DSMZ 545	Glicerol	CAVALHEIRO <i>et al.</i> , 2009
<i>C. necator</i> H16 (ATCC17699)	Resíduos de Alimentos	HAFUKA <i>et al.</i> , 2010
<i>C. necator</i> DSMZ 545	Melaço Cítrico	FARIAS, 2009
<i>C. necator</i> DSMZ 545	Melaço de Cana-de-açúcar	BAEI <i>et al.</i> , 2009
<i>C. necator</i> DSMZ 545	Hidrolisado de Amido de Arroz e Óleo de Soja	DALCANTON <i>et al.</i> , 2010
<i>C. necator</i> DSMZ 545	Hidrolisado de Bagaço de Cana	LOPES, 2010

Fonte: Adaptado pelo Autor.

Como podemos observar os mais variados substratos já foram testados como fonte de carbono para crescimento celular e produção de PHAs por *C. necator*. No entanto, até o momento, nenhum trabalho foi encontrado na literatura utilizando a pectina ou seu monômero principal, o ácido galacturônico, para essa finalidade. Estando a pectina presente em grande quantidade nos resíduos das indústrias de produção de sucos de frutas, caracteriza-se, portanto

como um substrato de baixo custo e grande disponibilidade, tornando interessante sua aplicação em processos industriais.

3.4. PECTINA

O Brasil, com forte aptidão para o setor agroindustrial, vem se destacando no mercado mundial de produção de frutas e sucos, sendo hoje o maior produtor mundial de laranja, com 17.618.450 toneladas produzidas em 2009 (BRASIL, 2009). A maior parte desta produção destina-se à industrialização, com geração de grandes volumes de resíduos, que representam em torno de 50% do peso dos frutos (DARROS-BARBOSA & CURTOLO, 2005).

A porção sólida desses resíduos, composta basicamente pela casca e bagaço, pode ser utilizada em diversas finalidades, mas a maior parte acaba sendo disposta de forma inadequada ou aproveitada em aplicações de pouco interesse econômico. A pectina representa a maior parte desse material, correspondendo a mais de 40% do peso das cascas de laranja (RIVAS *et al.*, 2008).

Pectinas são hidrocolóides naturais presentes em plantas superiores que formam um grupo heteromolecular de polissacarídeos estruturais encontrados na parede celular primária das células vegetais e nas camadas intercelulares (lamela média), contribuindo para adesão entre as células, firmeza e resistência mecânica do tecido (PAIVA *et al.*, 2009).

Geralmente são isoladas de plantas de importância econômica, como tomate, citrus, beterraba e maçã, mas está presente na maioria das plantas (RIDLEY *et al.*, 2001) e principalmente nos frutos, variando em quantidade e composição (MAY, 2000). Industrialmente são extraídas de subprodutos da indústria de suco de frutas (maçã e cascas de frutas cítricas), em condições ácidas e quimicamente modificadas, para se obter pectinas de baixa e alta metoxilação (RIDLEY *et al.*, 2001).

As pectinas são utilizadas nas indústrias alimentícia e farmacêutica devido às suas propriedades geleificantes e estabilizantes (KIM; TENG & WICKER, 2005). Suas diversas aplicações estão associadas à sua capacidade de conferir firmeza, retenção de sabor e aroma, bem como ao seu papel hidrocolóide na dispersão e estabilização de diversas emulsões (PAIVA *et al.*, 2009) Estão também associadas à promoção da saúde através de algumas propriedades funcionais.

3.4.1. ESTRUTURA DAS PECTINAS

As pectinas normalmente se encontram associadas à estrutura de outros polissacarídeos, como a celulose, hemicelulose e lignina (PAIVA *et al.*, 2009). São insolúveis em água, e por mecanismos enzimáticos ou hidrólise ácida tornam-se solúveis (BERK, 1976 apud FERTONANI, 2006). De acordo com suas diferenças estruturais são classificadas pela Sociedade Americana de Química (American Chemical Society) em (UENOJO & PASTORE, 2007):

- Protopectina: forma natural da pectina, quando associada à celulose, hemicelulose e lignina;
- Ácidos pécticos: são cadeias de ácidos galacturônicos totalmente livres de metoxilas e pouco solúveis em água;
- Ácidos pectínicos: termo usado para designar ácidos poligalacturônicos que contém uma proporção insignificante de grupos metil éster;
- Pectina: são ácidos pectínicos solúveis em água, com diferentes graus de esterificação por grupos metil éster.

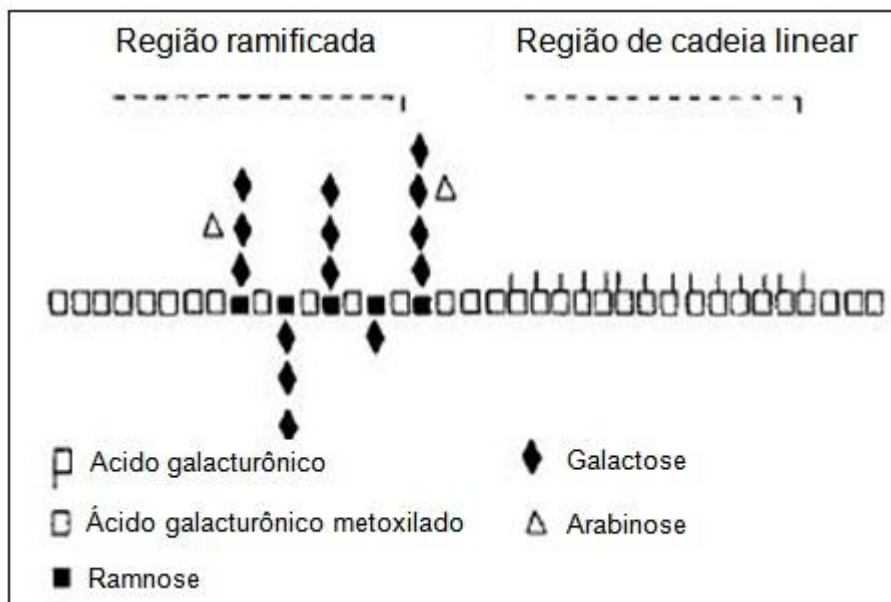
As pectinas são heteropolímeros com alto peso molecular, contendo majoritariamente (em torno de 65%) unidades de ácido galacturônico, podendo o grupo ácido estar livre (ou na forma de um sal), ou naturalmente esterificado com metanol (MAY, 2000). De acordo com o grau de esterificação, as pectinas são classificadas como HMP (grau de metoxilação >50%) e LMP (grau de metoxilação <50%), sendo que neste último grupo podem também possuir grupos amida (WASCHECK, 2008; BRANDÃO & ANDRADE, 1999). O grau de esterificação afeta significativamente as características de solubilidade, gelificação e propriedades reológicas, sendo que as pectinas HMP possuem maior poder de geleificação, principalmente em meio ácido e na presença de co-soluto, como sacarose (BRANDÃO & ANDRADE, 1999).

Sua estrutura pode variar de acordo com o material de origem e ainda não foi completamente elucidada, pois de acordo com a forma de isolamento as características estruturais podem se modificar.

Um modelo geral foi proposto por Novosel'Skaya *et al.* (2000) para pectinas de maçã, frutas cítricas e de beterraba, que tipicamente consiste de alternância linear de cadeias homogalacturonanas, formadas por unidades repetidas de (1→4)- α -D-ácido galacturônico, interrompidas por regiões ramificadas formadas por unidades de (1→2)- α -L-ramnose, às quais estão ligadas a cadeias laterais de açúcares neutros (MAY, 2000) em proporções

variáveis, tais como D-galactose, L-arabinose, D-xilose, L-ramnose, L-fucose, sendo que traços de 2-O-metilfucose também podem ser encontrados (BRANDÃO & ANDRADE, 1999; YAPO *et al.*, 2006). Na Figura 3 podemos observar esta estrutura.

Figura 3 - Estrutura química das pectinas



Fonte: adaptado de NOVOSEL'SKAYA *et al.* (2000)

3.4.2. HIDRÓLISE

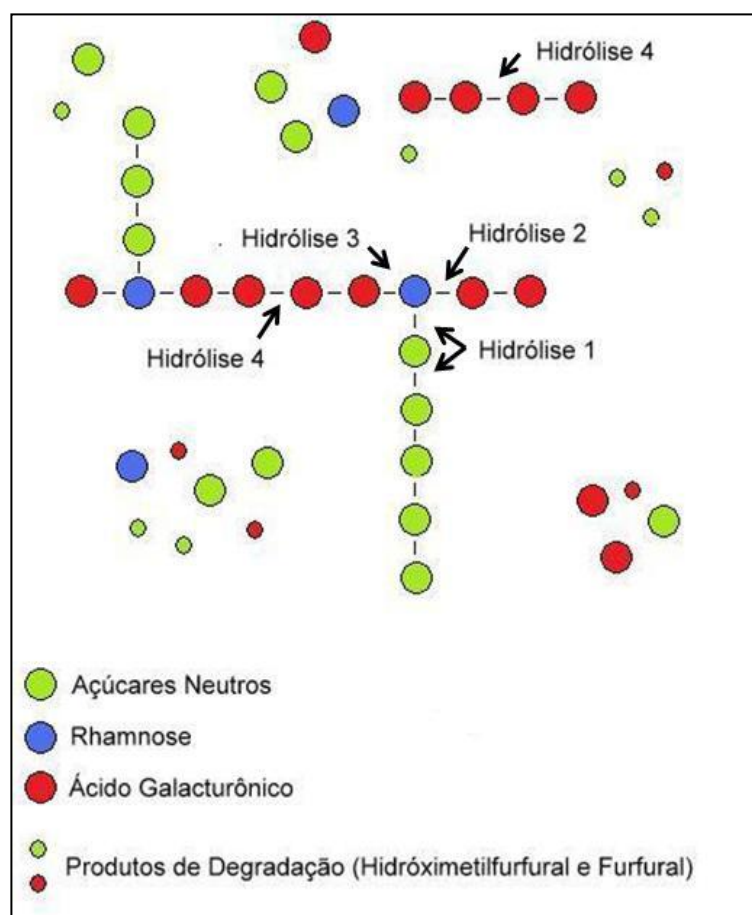
Vários procedimentos têm sido propostos para a hidrólise de substâncias pecticas em seus componentes monossacarídicos, desde métodos enzimáticos, através da ação de um complexo de enzimas pectinolíticas; ou métodos de hidrólise ácida, com diferentes ácidos em diversas condições. Mas os resultados obtidos sugerem que as técnicas devem ser significativamente melhoradas (GARNA *et al.*, 2006).

3.4.2.1. Hidrólise ácida

As pectinas podem ser degradadas por hidrólise ácida levando à formação de CR. Mas as diferentes ligações glicosídicas ao longo da cadeia apresentam variações na sensibilidade à

hidrólise ácida, sendo em ordem crescente de resistência a hidrólise: açúcar neutro - açúcar neutro < ramnose - ácido galacturônico < ácido galacturônico - ramnose < ácido galacturônico - ácido galacturônico (THIBAUT *et al.*, 1993), o que permite que a região homogalacturônica seja purificada por hidrólise sob condições controladas e seu comprimento mínimo seja estimado (NOVOSEL'SKAYA *et al.*, 2000). A sequência da hidrólise ácida da pectina, de acordo com a sensibilidade das ligações glicosídicas e a formação de produtos de degradação, pode ser observada na Figura 4.

Figura 4 - Sequência de hidrólise das ligações glicosídicas sob condições ácidas



Fonte: o Autor.

Sob condições ácidas a taxa de hidrólise da pectina também pode variar de acordo com o grau de metilação da pectina, ocorrendo um declínio na taxa de hidrólise com o aumento do grau de metilação (KRALL & McFEETERS, 1998). Os mesmos autores relatam que em condições fortemente ácidas ($\text{pH} < 1$) ocorre um declínio na taxa de hidrólise da pectina, em comparação às condições mais amenas ($\text{pH} 2,5$ a $4,5$). Segundo Garna e colaboradores (2006),

condições ácidas por tempos prolongados acarretam em taxas de destruição dos ácidos galacturônicos livres, maiores do que as taxas de liberação do polímero.

Os ácidos galacturônicos livres estão sujeitos à degradação formando lactonas (BLAKE & RICHARDS, 1968) ou furfural (MEDINA *et al.*, 1942). Compostos furânicos são produtos da degradação dos açúcares: furfural, da degradação das pentoses (xilose e arabinose) e 5-hidroximetilfurfural (HMF), da degradação das hexoses (glicose, manose e galactose). São geralmente considerados tóxicos para muitos organismos, como as células de mamíferos (JANZOWSKI *et al.*, 2000), fungos (SZENGYEL & ZACCHI 2000), leveduras (TAHERZADEH *et al.*, 1999) e bactérias (ZALDIVAR *et al.*, 1999). Portanto, a formação desses produtos é indesejável no meio.

3.4.2.2. Hidrólise enzimática

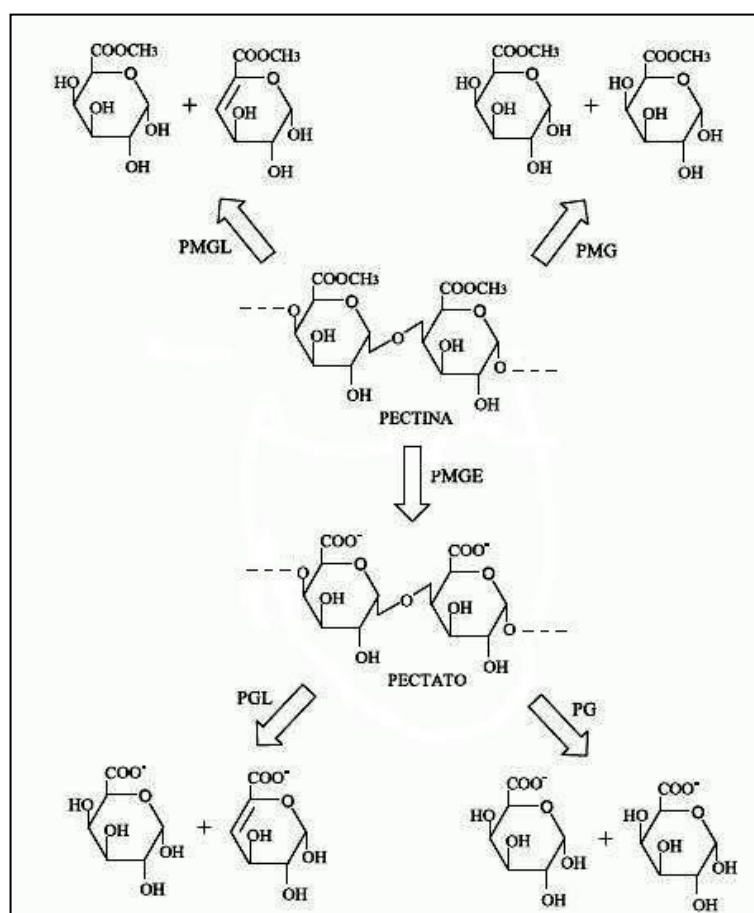
As substâncias pécticas também podem ser degradadas por enzimas pectinolíticas, que são conhecidas como pectinases. Essas enzimas há muitos anos vem sendo estudadas para aplicações industriais em alimentos, bebidas, têxteis e na indústria de papel e celulose, estando entre as primeiras enzimas aplicadas comercialmente (BHAT, 2000; KASHYAP *et al.*, 2000).

São empregadas principalmente na indústria de alimentos para clarificação de sucos de frutas (reduzindo a viscosidade, melhorando a filtração e aumentando o rendimento dos sucos), no tratamento prévio do suco de uva em indústrias vinícolas, extração de polpa de tomate, tratamento de resíduos vegetais, na extração de óleos vegetais, entre outras aplicações. Preparações comerciais de pectinases são facilmente disponíveis no mercado, e estima-se que essas enzimas correspondem a cerca de 25% do mercado mundial de enzimas (UENOJO & PASTORE, 2007).

As pectinases são produzidas em plantas, onde são responsáveis pelo amadurecimento dos frutos, e por inúmeros micro-organismos, entre bactérias, fungos e leveduras, que se alimentam através da degradação de substâncias pécticas (WHITAKER, 1990). Para a produção industrial os fungos tem se destacado, pois secretam até 90% das enzimas produzidas no meio de cultura, facilitando as etapas de extração e purificação (BLANDINO *et al.*, 2001).

As enzimas podem ser classificadas sob sua forma de ação, o que varia de acordo com a fonte de onde foram extraídas, sendo classificadas em três grupos: i) pectina esterases (desesterificantes ou desmetoxilantes), que removem os grupos metil éster; ii) despolimerases (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases), que catalisam a clivagem das ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) de ácidos D-galacturônicos das substâncias pécticas; iii) e as protopectinases, que degradam a protopectina insolúvel para formar pectina solúvel (SAKAI *et al.*, 1993; GAINVORS *et al.*, 1994). A classificação das enzimas de acordo com o substrato que catalisam pode ser observada na Figura 5.

Figura 5 - Classificação das enzimas pectinolíticas



PMGL: polimetilgalacturonato liase; PMG: polimetilgalacturonase; PMGE: polimetilgalacturonato esterase; PGL: poligalacturonato liase; PG: poligalacturonase. Fonte: Adaptado de UENOJO e PASTORE, 2007.

No grupo das despolimerases estão as enzimas endo-PGs, que estão entre as enzimas pectinolíticas mais estudadas. Seu modo de ação varia com a origem, podendo agir aleatoriamente na cadeia de pectina ou a partir de um grupamento final não redutor e

prosseguir a hidrólise ao longo da cadeia (FOSTER, 1988), estando presente em praticamente todos os preparos comerciais.

Com a ação desse complexo grupo de enzimas ocorre a degradação da pectina, obtendo-se um hidrolisado rico em ácido galacturônico e açúcares neutros. Como a hidrólise enzimática ocorre em condições mais brandas de pH e temperatura, os produtos da hidrólise não são facilmente degradados, não havendo a formação de inibidores, o que torna o meio mais interessante para ser utilizado como substrato em diversos processos biotecnológicos para a obtenção de bioprodutos com baixos custos de produção, entre eles os PHAs.

3.4.2.3. Enzima: performance, eficiência e custo

Em muitos processos industriais as enzimas são aplicadas em sistemas heterogêneos, onde há altas concentrações de substrato sólido, possibilitando apenas o contato da enzima com a parte externa do substrato. Quando altas concentrações de enzima são usadas, ocorre a saturação dos sítios exteriores dos substratos com a enzima, sem acarretar em grandes incrementos nas taxas de biotransformação (CAVACO-PAULO, 2011).

Nesses sistemas industriais as curvas clássicas de Michaelis-Menten não se aplicam. Para a otimização dos processos de biocatálise industrial, a concentração ideal de enzima pode ser medida pela performance da enzima sobre o seu substrato, onde uma redução efetiva na dosagem enzimática pode representar pouco efeito sobre o seu desempenho (CAVACO-PAULO, 2011).

A performance enzimática pode ser afetada por diversos fatores, tais como: eficácia da própria enzima, tipo de matéria prima, aplicação e eficiência de pré-tratamento, presença de inibidores e condições do processo de hidrólise. As condições específicas do processo de hidrólise, como temperatura e pH, podem afetar a atividade enzimática por inativação dos constituintes da enzima. Esses parâmetros são freqüentemente difíceis de monitorar com precisão e principalmente difíceis de controlar em processos com altas concentrações de sólidos (TAHERZADEH & KARIMI, 2007; HAAGENSEN, 2009).

Esses fatores incidem diretamente sobre o custo do processo de hidrólise, pois afetam o tempo de reação, a taxa de hidrólise e a dose de enzima necessária para alcançar o nível desejado de hidrólise. Portanto, é importante levar em consideração, que por esses diversos fatores, existe uma relação não linear entre dose de enzima, rendimento e conversão

enzimática. Onde, muitas vezes, um dramático incremento da dose enzimática implica em um pequeno aumento na taxa de hidrólise (HAAGENSEN, 2009).

4. METODOLOGIA

4.1. CARACTERIZAÇÃO DA PECTINA

Para os ensaios de hidrólise foi utilizada uma pectina cítrica comercial (Vetec[®]), caracterizada quanto ao grau de esterificação por titulometria (em triplicata), de acordo com a metodologia proposta por Bocek *et al.* (2001), descrita por Andrade (2010). Uma massa de 0,2 g de pectina foi colocada em frasco Erlenmeyer de 250 mL e umedecida com etanol 95% (v/v). Em seguida, foi adicionado um volume de 20 mL de água destilada (aquecida a 40° C), agitando-se até dissolver completamente por cerca de 2 horas. A solução resultante foi titulada com NaOH (0,1 N), na presença de fenolftaleína, e o percentual de grupos carboxilas livres (K_f) foi calculado pela Equação 1.

A análise dos grupos esterificados foi feita após a saponificação, de acordo com o seguinte procedimento: à amostra já neutralizada, foi adicionado 10 mL de NaOH (0,1N). Após agitação da amostra por 2 horas, adicionou-se 10 mL de HCl (0,1N) e titulou-se o excesso de HCl com NaOH (0,1N) na presença de fenolftaleína. O número de grupos carboxilas esterificados (K_e) (em percentagem) também foi determinado pela Equação 1.

$$\% K_f \text{ ou } K_e = \frac{N_{NaOH} * V_{NaOH} * 0,045}{a} * 100 \quad (1)$$

Onde:

K_f – Grupos carboxilas livres;

V_{NaOH} – Volume de NaOH gasto na titulação (mL);

K_e – Grupos carboxilas esterificados;

N_{NaOH} – Normalidade do NaOH;

a - Peso da amostra (g).

O grau de esterificação (em percentagem), foi calculado pela Equação 2:

$$\% DE = \frac{Tf}{Ti + Tf} * 100 \quad (2)$$

Onde:

DE – Grau de Esterificação;

Tf – Volume da titulação final (mL);

Ti – Volume da titulação inicial (mL).

4.2. ENSAIOS DE HIDRÓLISE DA PECTINA

Inicialmente, alguns protocolos descritos na literatura para as hidrólises ácida e enzimática foram seguidos. Visando melhorar ambas as condições de hidrólise, estudar os parâmetros envolvidos e obter uma maior concentração de CR no meio, foi utilizada a ferramenta analítica de planejamento fatorial, através de diferentes tipos de planejamento aplicados em ambos os casos. Os ensaios foram realizados randomicamente, e os dados foram analisados por meio do *software* Statistica 8.0 (Statsoft®) a 95% de confiança. O erro experimental foi obtido por meio da média e desvio padrão dos pontos centrais.

4.2.1. HIDRÓLISE ÁCIDA

4.2.1.1. Ensaio I de hidrólise ácida

Inicialmente foi utilizada a metodologia de hidrólise ácida descrita por Wenzel (2001). A uma massa de 5,0 g de pectina disposta em um balão de destilação, foram adicionados 13,7 mL de água destilada e 36,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após a solução ser mantida em repouso durante 1 h, foi adicionado um volume de 450 mL de água destilada e a mistura colocada em refluxo no rotaevaporador (Marconi®) à 100° C por 4 h, sem vácuo. A solução foi mantida em repouso por 24 h, sendo posteriormente filtrada em sistema a vácuo.

O hidrolisado obtido foi analisado quanto ao teor de CR e, em seguida, foi concentrado em rotaevaporador à 100° C. Após ajuste do pH a 7,0 com NaOH 50% (v/v), o hidrolisado foi separado em duas porções: uma apenas esterilizada e outra porção submetida a detoxificação com a adição de carvão ativo na proporção de 1g de carvão ativo para 40g de hidrolisado, com posterior agitação em mesa incubadora à 200 rpm e 30° C por 1 hora (MUSSATO & ROBERTO, 2004), ao final filtrado para remoção dos sólidos e esterilizado em autoclave. Os hidrolisados foram utilizados para a formulação dos meios de cultura visando o cultivo dos micro-organismos *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas putida*, para verificar o crescimento celular com o meio obtido nessas condições de hidrólise.

4.2.1.2. Ensaio II de hidrólise ácida

Com o objetivo de melhorar as condições de hidrólise e de se obter uma maior concentração de CR, foram feitas algumas modificações no método descrito por Wenzel (2001). A uma massa de 5,0 g de pectina disposta em um balão de destilação, foram adicionados 500 mL de uma solução de H_2SO_4 (7,2% p/v). O mesmo procedimento descrito acima foi realizado, e ao final das 4 horas de hidrólise a mistura foi resfriada em banho de gelo, neutralizada a pH 7,0 com NaOH 50% (v/v) e submetida à filtração a vácuo. O hidrolisado obtido foi analisado quanto ao teor de CR e, em seguida, foi concentrado em rotaevaporador à 100° C. O hidrolisado concentrado obtido foi esterilizado em autoclave e utilizado na formulação dos meios de cultura para os cultivos de *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas putida*.

4.2.1.3. Estudo das condições de hidrólise ácida

4.2.1.3.1. Planejamento fatorial da hidrólise ácida

As condições experimentais do ensaio II de hidrólise ácida foram mantidas, visando avaliar a influência da temperatura e da concentração de ácido (variáveis independentes) sobre a concentração final de CR (variável dependente). Foi utilizado um planejamento experimental completo do tipo 2^2 , com concentração de substrato (pectina) de 1% (p/v). Ao final de cada ensaio o hidrolisado foi resfriado em banho de gelo, imediatamente neutralizado com NaOH 50% (p/v) e diluído para análise dos CR.

Foram realizadas cinco repetições no ponto central, totalizando 9 ensaios, os quais foram realizados randomicamente. A Tabela 1 mostra as condições experimentais empregadas, acompanhadas dos valores experimentais para cada ensaio.

Tabela 1 - Níveis codificados e valores reais das variáveis estudadas para os ensaios de hidrólise ácida

Ensaio	Concentração de H ₂ SO ₄ (%v/v)	Temperatura (°C)
1	7,0 (+1)	100 (+1)
2	7,0 (+1)	70 (-1)
3	4,0 (0)	85 (0)
4	4,0 (0)	85 (0)
5	4,0 (0)	85 (0)
6	4,0 (0)	85 (0)
7	4,0 (0)	85 (0)
8	1,0 (-1)	70 (-1)
9	1,0 (-1)	100 (+1)

4.2.1.3.2. Cinética da hidrólise ácida

Com os resultados obtidos pelo planejamento, foi definida a condição de hidrólise que favoreceu a obtenção de CR. Esta condição foi repetida em triplicata, retirando-se amostras iniciais e a cada 15 minutos durante a primeira hora, e a cada 30 minutos até o tempo final de 5 horas. As amostras foram imediatamente neutralizadas com NaOH 50% (p/v), resfriadas em banho de gelo e diluídas para análise dos CR. O hidrolisado final obtido foi neutralizado, esterilizado em autoclave e utilizado como substrato para a formulação do meio de cultivo do micro-organismo selecionado no ensaio II.

4.2.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados utilizando uma endo-PG comercial obtida da Sigma®, classificada de acordo com “Enzyme Commission” (EC) como E.C. 3.2.1.15, que possui atividade despolimerizante (enzima endo – liquificadora). A enzima possui atividade enzimática de 1,32 UI por mg de enzima.

4.2.2.1. Ensaio de velocidade de reação enzimática

Visando verificar a velocidade de reação da enzima sobre as moléculas de pectina esterificada e não esterificada, foi realizado um ensaio de hidrólise enzimática empregando-se as duas formas da pectina. Pesou-se 1 g de pectina em frasco Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 100 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8) e 4,24 mg de enzima (5,6 UI/g) e incubou-se a 45° C, sob agitação de 200 rpm por 24 horas.

Para os ensaios com a pectina saponificada (ou desesterificada), pesou-se 1 g de pectina em frasco Erlenmeyer de 250 mL, umedeceu-se com etanol e adicionou-se 25 mL de NaOH 0,1 N. Após agitação por 2 horas, o pH foi ajustado para 4,8 com HCl 1,0 N e o volume corrigido para 50 mL. Após esta etapa foi adicionado 50 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4,8) e seguido o procedimento descrito acima.

Os ensaios foram acompanhados retirando-se amostras iniciais e a cada 15 minutos durante a primeira hora, e em intervalos de 1 hora até 24 horas. Os experimentos foram conduzidos em duplicata e ambos os tratamentos (pectina desesterificada ou não) foram acompanhados de seus respectivos controles, sem enzima. Ao se retirar cada amostra, a reação enzimática foi imediatamente paralisada colocando-se a amostra por 5 minutos em água fervente (inclusive para os controles), sendo em seguida armazenadas a 4 °C para as análises de CR.

A velocidade de reação enzimática expressa em (UI/mL), foi calculada pela Equação 3, de acordo com Santos (2007), sendo uma unidade de endo-PG a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido galacturônico por minuto.

$$Veloc = \frac{(Abs_a - Abs_b) * f * D}{212,16 * t} \quad (3)$$

Onde:

Veloc – Velocidade de reação (UI/mL);

Abs_a – Absorbância da amostra;

Abs_b – Absorbância do branco;

f - Fator de conversão da curva padrão do ácido galacturônico (g/L);

D – Diluição da enzima no meio reacional;

212,16 - Massa molecular do ácido galacturônico (g/mol);

t – Tempo de hidrólise (min)

4.2.2.2. Ensaio I de hidrólise enzimática

Baseado no resultado do ensaio de velocidade de reação enzimática foi realizado um ensaio preliminar de hidrólise da pectina em triplicata, pesando-se 2 g de pectina (sem realizar a saponificação) em frasco Erlenmeyer de 500 mL e adicionando-se 200 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8). Foi realizado o mesmo procedimento descrito no item anterior, e o hidrolisado obtido teve seu pH ajustado para 7,0 com KOH 5 M, sendo posteriormente esterilizado em autoclave e reservado para a formulação do meio de cultura.

4.2.2.3. Estudo das condições de hidrólise enzimática

Conforme descrito no item anterior, os ensaios iniciais de hidrólise enzimática foram realizados a temperatura de 45° C, pH 4,8, agitação de 200 rpm e concentração da enzima de 5,6 UI por grama de pectina. Esses parâmetros foram baseados em trabalhos que descreveram o uso de enzimas endo-PGs. Mas uma nova busca sobre as condições ótimas para a atividade enzimática da enzima E.C 3.2.1.15 revelou que as melhores condições para ensaios experimentais com essa enzima eram de pH 4,0 e temperatura de 50° C, parâmetros estes estabelecidos pela Sigma®.

Visando melhorar o rendimento final da hidrólise e obter uma maior concentração de CR, novos ensaios de hidrólise foram realizados mantendo-se constante sua condição ótima de temperatura (50° C) e pH (4,0), sendo os demais parâmetros (concentração da enzima e agitação) estudados através da ferramenta analítica de planejamento fatorial.

Todos os ensaios de hidrólise foram realizados em frasco Erlenmeyers de 125 mL de capacidade contendo 50 mL de tampão acetato de sódio (50 mM) e concentração de substrato (pectina) variável de acordo com cada planejamento, sendo os frascos incubados em mesa agitadora sob agitação orbital durante 24 horas. Ao final da reação a amostra era submetida a um banho em água fervente por 5 minutos para interrupção da reação enzimática.

4.2.2.3.1. Planejamento fatorial de hidrólise enzimática I

Foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 , com três pontos centrais (nível 0) e quatro axiais (níveis $\pm \alpha$, onde $\alpha = 1,4142$), totalizando 11 ensaios (Planejamento Composto Central Rotacional – PCCR, Tabela 2). As variáveis estudadas foram a concentração de enzima e a agitação, mantendo-se constante a concentração de substrato (pectina) em 1% (p/v), tendo como variável resposta a concentração final de CR. A faixa de estudo das variáveis foi determinada com base nos ensaios anteriores.

Tabela 2 - Níveis codificados e valores reais das variáveis estudadas para o primeiro planejamento experimental nos ensaios de hidrólise enzimática

Ensaios	Conc. Enzima (UI/g)	Agitação (rpm)
1	4,2 (-1)	150 (-1)
2	7,0 (+1)	150 (-1)
3	4,2 (-1)	250 (+1)
4	7,0 (+1)	250 (+1)
5	3,6 (-1,41)	200 (0)
6	7,6 (+1,41)	200 (0)
7	5,6 (0)	130 (-1,41)
8	5,6 (0)	270 (+1,41)
9	5,6 (0)	200 (0)
10	5,6 (0)	200 (0)
11	5,6 (0)	200 (0)

4.2.2.3.2. Planejamento fatorial de hidrólise enzimática II

Baseado nos resultados do primeiro planejamento pode-se observar que ainda havia a possibilidade de aumentar o rendimento de CR. Desta forma, elaborou-se um segundo planejamento fatorial completo 2^2 , com três pontos centrais (nível 0) e quatro axiais (níveis $\pm \alpha$, onde $\alpha = 1,4142$), totalizando 11 ensaios (Planejamento Composto Central Rotacional – PCCR, Tabela 3). As variáveis estudadas foram as mesmas descritas anteriormente.

Tabela 3 - Níveis codificados e valores reais das variáveis estudadas para o segundo planejamento experimental nos ensaios de hidrólise enzimática

Ensaio	Conc. Enzima (UI/g)	Agitação (rpm)
1	6,9 (-1)	211,6 (-1)
2	11,1 (+1)	211,6 (-1)
3	6,9 (-1)	268,4 (+1)
4	11,1 (+1)	268,4 (+1)
5	6,0 (-1,41)	240 (0)
6	12,0 (+1,41)	240 (0)
7	9,0 (0)	200 (-1,41)
8	9,0 (0)	280 (+1,41)
9	9,0 (0)	240 (0)
10	9,0 (0)	240 (0)
11	9,0 (0)	240 (0)

4.2.2.3.3. Cinética da hidrólise

Com os resultados obtidos pelo segundo planejamento, estabeleceu-se a melhor condição de hidrólise enzimática, sendo esta repetida em triplicata retirando-se amostras iniciais e a cada 15 minutos durante a primeira hora, e em intervalos de 1 hora até o final das 24 horas, analisadas quanto à liberação de CR. O hidrolisado final obtido foi neutralizado, esterilizado em autoclave e utilizado como substrato para a formulação do meio de cultivo.

4.2.2.3.4. Planejamentos fatoriais de hidrólise enzimática III e IV

Para obtenção de uma maior concentração celular, seria necessária a suplementação do meio de cultura com uma maior concentração de CR. Desta forma visando aumentar a concentração de CR, dois novos planejamentos fatoriais foram realizados incluindo-se a variável concentração de substrato.

Foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 , com seis pontos centrais (nível 0) e quatro axiais (níveis $\pm \alpha$, onde $\alpha = 1,68$), totalizando 20 ensaios (Planejamento Composto Central Rotacional – PCCR, Tabela 4). As três variáveis estudadas foram concentração de enzima, agitação e concentração de substrato.

Tabela 4 - Níveis codificados e valores reais das variáveis estudadas para o terceiro planejamento experimental nos ensaios de hidrólise enzimática

Ensaios	Conc. Enzima (UI/g)	Agitação (rpm)	Substrato (%)
1	22 (-1)	220 (-1)	2,2 (-1)
2	58 (+1)	220 (-1)	2,2 (-1)
3	22 (-1)	280 (+1)	2,2 (-1)
4	58 (+1)	280 (+1)	2,2 (-1)
5	22 (-1)	220 (-1)	5,8 (+1)
6	58 (+1)	220 (-1)	5,8 (+1)
7	22 (-1)	280 (+1)	5,8 (+1)
8	58 (+1)	280 (+1)	5,8 (+1)
9	10 (-1,68)	250 (0)	4,0 (0)
10	70 (+1,68)	250 (0)	4,0 (0)
11	40 (0)	200 (-1,68)	4,0 (0)
12	40 (0)	300 (+1,68)	4,0 (0)
13	40 (0)	250 (0)	1,0 (-1,68)
14	40 (0)	250 (0)	7,0 (+1,68)
15	40 (0)	250 (0)	4,0 (0)
16	40 (0)	250 (0)	4,0 (0)
17	40 (0)	250 (0)	4,0 (0)
18	40 (0)	250 (0)	4,0 (0)
19	40 (0)	250 (0)	4,0 (0)
20	40 (0)	250 (0)	4,0 (0)

Baseado nos resultados obtidos pelo terceiro planejamento observou-se a possibilidade de aumentar a concentração de CR, elevando-se a níveis superiores a concentração de substrato. Tendo em vista a limitação de equipamento para promover a elevação da agitação, essa variável foi fixada em 300 rpm.

Foi realizado um novo planejamento fatorial completo 2^2 , com três pontos centrais (nível 0) e quatro axiais (níveis $\pm \alpha$, onde $\alpha = 1,4142$), totalizando 11 ensaios (Planejamento Composto Central Rotacional – PCCR, Tabela 5). As variáveis estudadas foram concentração de enzima e concentração de substrato.

Tabela 5 - Níveis codificados e valores reais das variáveis estudadas para o quarto planejamento experimental nos ensaios de hidrólise enzimática

Ensaio	Conc. Enzima (UI/g)	Substrato (%)
1	18,7 (-1)	5,7 (-1)
2	61,3 (+1)	5,7 (-1)
3	18,7 (-1)	9,3 (+1)
4	61,3 (+1)	9,3 (+1)
5	10,0 (-1,41)	7,5 (0)
6	70,0 (+1,41)	7,5 (0)
7	40,0 (0)	5,0 (-1,41)
8	40,0 (0)	10,0 (+1,41)
9	40,0 (0)	7,5 (0)
10	40,0 (0)	7,5 (0)
11	40,0 (0)	7,5 (0)

4.2.2.4. Ensaio de Performance Enzimática

Com os planejamentos fatoriais realizados foi possível definir as condições de hidrólise para as variáveis agitação e concentração de substrato, mas não foi possível estabelecer a concentração de enzima ótima para os ensaios de hidrólise.

Para definir a variável concentração de enzima, um ensaio de performance enzimática foi realizado, mantendo-se a agitação máxima de 300 rpm e a concentração de substrato em 10% (100 g/L). As concentrações de enzima investigadas estão apresentadas na Tabela 6. Os ensaios foram realizados em frasco Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de tampão acetato de sódio (pH 4,0, 50 mM) e 5 g de pectina, incubados a 50° C, por 24 horas em mesa incubadora agitadora (Marconi®).

Tabela 6 - Valores de concentração enzimática estudados no ensaio de performance

Ensaio	Conc. Enzima (UI/g)
1	0
2	1
3	2
4	10
5	20
6	40
7	60
8	80
9	100
10	150
11	200

4.3. PROCEDIMENTOS DE FERMENTAÇÃO

4.3.1. MICRO-ORGANISMOS

Foi empregada a bactéria *Cupriavidus necator*, cultura obtida junto ao *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ 545) e mantida na coleção de culturas do Departamento de Antibióticos/UFPE (UFPEDA 0604). Em ensaios iniciais também foi utilizada a bactéria *Pseudomonas putida*, obtida na coleção de culturas da Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Nos estudos iniciais as culturas foram mantidas em ágar nutriente e estocadas em geladeira (2° a 6° C), com repiques periódicos a cada 3-4 semanas. Posteriormente a bactéria *C. necator* foi liofilizada, dando-se continuidade aos procedimentos de fermentação apenas com essa cultura, como indicado em cada ensaio.

4.3.2. INÓCULO

O inóculo foi preparado em meio caldo nutriente (CN), de composição, em g/L: extrato de carne 3,0; peptona de carne 5,0. O micro-organismo em estudo, mantido em ágar nutriente, foi primeiramente repicado para um novo tubo. Em seguida, as células foram transferidas, com o auxílio de uma alça de platina, para frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio CN, sob agitação de 300 rpm, a 30°C por 24 h.

Ensaio iniciais foram realizados acompanhando-se a fase de crescimento celular dos micro-organismos pela retirada de amostras a cada 2 horas para medida da absorbância a 600 nm. Com base nesses dados, foi definido o tempo para o final da fase exponencial de crescimento de cada micro-organismo, sendo este o ponto ideal para a transferência do inóculo para a fase posterior de crescimento celular em meio mineral (MM – etapa 2). A curva de crescimento em caldo nutriente para *C. necator* também foi realizada a partir da cultura mantida liofilizada.

4.3.3. CRESCIMENTO CELULAR

Nesta etapa foi empregado o meio MM descrito por RAMSAY *et al.* (1990) e modificado por ARAGÃO *et al.* (1996) (Tabela 7). Um ensaio preliminar foi realizado utilizando como fonte exclusiva de carbono o ácido galacturônico (Sigma®) a 1,5% (p/v), visando avaliar o consumo deste substrato para crescimento celular de *C. necator* e *P. putida*. Posteriormente, nos ensaios realizados com os hidrolisados, a concentração de CR variou de acordo com o obtido em cada ensaio de hidrólise da pectina.

Inicialmente, as soluções foram preparadas e tiveram seu pH ajustado a 7,0 com KOH 5,0 M. Em seguida, foram esterilizadas separadamente e misturadas assepticamente para a formulação do meio. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio MM, sob agitação de 300 rpm, a 30° C por 24 h, e concentração de inóculo de 5,0% (v/v).

As etapas de crescimento celular foram acompanhadas pela retirada de amostras a cada 2 horas para medida da absorbância a 600 nm, pH e análise de CR.

Tabela 7 - Composição do meio mineral para cultivo de *C. necator*

Soluções	Reagentes	Concentração (g/L)
Solução de Oligoelementos	H ₃ BO ₃	0,30
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,20
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,10
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,03
	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01
Solução 01	Ácido nitrolacético	0,19
	Citrato ferroso de amônia	0,06
	Sulfato de magnésio heptahidratado	0,50
	Cloreto de cálcio dihidratado	0,01
	Solução de oligoelementos	1,00 (mL/L)
Solução 02	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	8,95
	KH ₂ PO ₄	1,50
Solução 03	Fonte de Carbono	*
Solução 04	Sulfato de amônia	5,00

*Dependente de cada ensaio de hidrólise

4.3.4. PRODUÇÃO DE PHAS – HIDROLISADO DE PECTINA E PADRÃO GLICOSE.

Com as condições de hidrólise definidas que favoreceram a obtenção de alta concentração de CR, foi realizado um ensaio de cultivo e produção de PHAs, no meio formulado com o hidrolisado de pectina e um ensaio comparativo em meio formulado com glicose. Os ensaios, em triplicata, foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio MM, sob agitação de 300 rpm, a 35°C por 24 h, e concentração de inóculo de 10,0% (v/v).

A concentração inicial de CR foi de 30 g/L para todos os ensaios, obtidas a partir de solução concentrada de glicose (300 g/L) e solução concentrada de hidrolisado (70 g/L). No período de limitação de nitrogênio foi realizado um pulso a partir das soluções concentradas, visando elevar a concentração de CR para 30 g/L.

As alterações na temperatura de 30° C para 35° C e a elevação da concentração de inóculo foram baseadas no trabalho de Farias (2009), que utilizando essas condições obteve maior concentração celular e produção de PHAs.

Durante o cultivo foram retiradas amostras para monitoramento do pH, medidas de absorbância, análise de CR, análise de nitrogênio e coloração através da metodologia de *Sudam Black* (SHEEHAN & STOREY, 1947), visando verificar a presença intracelular de PHAs. O material celular final obtido foi centrifugado e submetido à metodologia de extração para a obtenção dos PHAs.

4.4. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Os ensaios de hidrólise da pectina e os procedimentos de fermentação foram acompanhados pelos parâmetros descritos em cada ensaio, sendo estes determinados de acordo com os métodos analíticos descritos a seguir.

4.4.1. ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS REDUTORES TOTAIS

A medida de concentração de CR foi realizada pelo método colorimétrico de DNS, como descrito por MILLER (1959), em espectrofotômetro a 540 nm. Juntamente com cada procedimento de análise era realizada uma curva de calibração com diferentes concentrações (0,2 a 2,0 g/L) de uma solução padrão de glicose, e a concentração de CR na amostra era calculada pela curva de calibração de absorbância *versus* concentração de CR. Um exemplo de curva de calibração, realizada em cada procedimento analítico, encontra-se no Anexo A.

Para o ensaio de velocidade de reação enzimática os CR foram expressos em concentração de ácido galacturônico, medida realizada através do mesmo método de DNS, mas com base em uma curva de calibração com diferentes concentrações (0,2 a 2,0 g/L) de uma solução padrão de ácido galacturônico.

4.4.2. CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR

Foi determinada pelo método espectrofotométrico a 600 nm, a partir de uma curva de calibração com diferentes concentrações celulares (peso seco x absorbância), e procedendo-se a análise pela leitura dos diferentes meios de cultivo, a partir de um branco do próprio meio de cultura sem células. Um exemplo de curva de calibração, realizada em cada procedimento analítico, encontra-se no Anexo B.

Para se obter a concentração celular em peso seco, amostras em triplicata foram retiradas da solução mãe, filtradas em membrana com porosidade de 0,22 µm (previamente secas e taradas) e secas em estufa à 80° C até peso constante.

4.4.3. ANÁLISE DO PH

Foi realizada em potenciômetro Marconi®, previamente calibrado.

4.4.4. ANÁLISE QUALITATIVA DE PHAS – SUDAN BLACK

Para a análise qualitativa da presença de PHAs intracelular, utilizou-se a técnica de coloração *Sudan Black*, descrita pelo método de SHEEHAN & STOREY (1947).

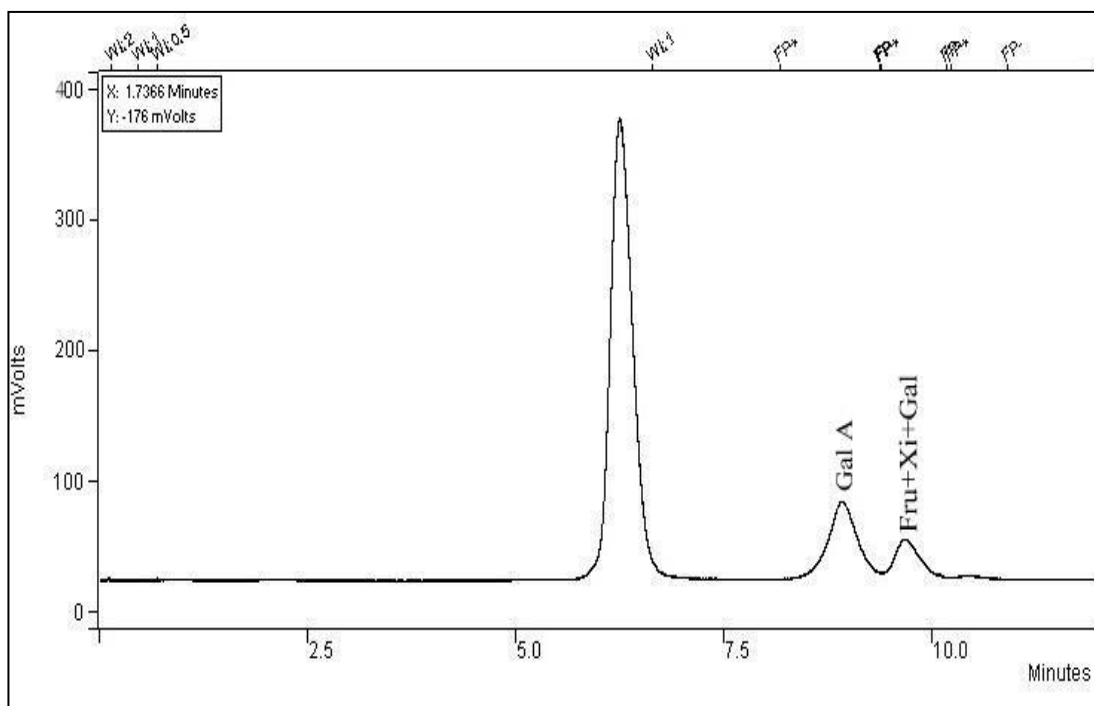
Preparou-se uma solução de safranina a 10% (v/v) em álcool 95% (v/v) e uma solução de *Sudan Black* a 0,3% (p/v) em álcool 70% (v/v). Para a análise seguiu-se o seguinte procedimento: faz-se um esfregaço de biomassa em uma lâmina, sendo este seco e fixo à chama. Em seguida, cobre-se o material com a solução de *Sudan Black* por 15 min, deixando-se escorrer e secar ao ar. Descolore-se com xileno (tempo de contato 20 s), seca-se ao ar e cobre-se com a solução de safranina (tempo de contato 5 s). Posteriormente, lava-se suavemente com água e seca-se levemente para observação microscópica da presença dos grânulos de PHAs, que ficam tingidos de preto, enquanto que o restante da célula se cora de vermelho.

4.4.5. ANÁLISE DOS MONOSSACARÍDEOS

Foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, em equipamento Varian, ligado a um detector de índice de refração. Foi utilizada uma coluna para ácidos orgânicos (Aminex HPX – 87H, 300 x 780 mm, Bio Rad), à 65° C, sendo a fase móvel uma solução aquosa de H₂SO₄ (8,0 mM) e taxa de fluxo de 0,6 mL/min. As soluções padrões de ácido galacturônico, frutose, galactose, xilose e arabinose (Sigma®) foram preparadas na faixa de 0,2 a 10 g/L, para comparação dos tempos de retenção. A concentração dos monossacarídeos nas amostras foi calculada por curva de calibração da área x concentração (g/L). As análises foram realizadas no Laboratório de Processos Catalíticos do Departamento de Engenharia Química da UPFE.

A separação ocorreu em dois grupos: ácido galacturônico (GalA) e frutose+xilose+galactose (Fru+Xi+Gal), onde cada grupo apresentou um único pico e, portanto, a área total de cada pico representa a soma das concentrações dos compostos, como pode ser observado em um exemplo de cromatograma apresentado na Figura 6. As concentrações de arabinose foram abaixo de 0,2 g/L, valor mínimo da curva padrão.

Figura 6 - Cromatograma de uma amostra de hidrolisado.



Fonte: o Autor.

4.4.6. ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL

Nos cultivos em que foi realizada a restrição de nitrogênio como fator limitante para o acúmulo intracelular de PHAs, foram retiradas amostras para o acompanhamento do consumo de nitrogênio e verificação do momento em que ocorre a restrição total no meio de cultura. Essas análises foram realizadas através de um kit colorimétrico (ALFAKIT[®]), que emprega o método Brucina, onde a amostra é submetida à digestão em meio ácido, para a liberação do nitrogênio total, que é posteriormente convertido a nitrato e medido por espectrometria à 415 nm. Os valores de absorbância (Abs) são convertidos em g/L de nitrogênio, através de uma curva de calibração, apresentada no Anexo C.

4.4.7. EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS

Foi utilizado o método de extração com clorofórmio, de acordo com a metodologia descrita por Ramsay e colaboradores (1994). O método se baseia na lise celular, seguido de etapas de lavagem com diferentes solventes, para a remoção dos *debris* celulares, e por último a solubilização dos PHAs em clorofórmio, que é posteriormente recuperado pela precipitação em etanol gelado, seguido de secagem. Os passos da extração estão descritos a seguir. Sendo que as condições de centrifugação, utilizada em todas as etapas, foi de 4000 rpm, 10°C, por 20 minutos e, o volume dos solventes usado nas etapas de ressuspensão do material foi sempre a metade do volume inicial de meio de cultura.

A suspensão bacteriana foi primeiramente centrifugada, o sobrenadante desprezado e o *pellet* (material precipitado) ressuscitado em NaOH 0,2 N. O material foi colocado em mesa agitadora a 200 rpm, 30°C por 2 horas. Em seguida novamente centrifugado, desprezando o sobrenadante, e ressuscitado em etanol. Novamente o material foi centrifugado, desprezado o sobrenadante e ressuscitado em acetona. Descartado o sobrenadante, o material foi ressuscitado em clorofórmio, na proporção de 20 vezes o volume de material celular, e mantido em agitação por 24 horas a 200 rpm. Em seguida, foi adicionado volume de água igual ao volume de clorofórmio e novamente levado à agitação por 24 horas a 200 rpm.

Após esse período houve a formação de três fases, sendo a primeira (de cima) água, a do meio impurezas e a terceira clorofórmio. Com auxílio de um funil de separação, a terceira fase (do clorofórmio) foi removida e transferida para uma bureta, sendo gotejada em volume

igual de etanol gelado (mantido em banho de gelo). Por fim, os PHAs (precipitado) foram colocados em placas de Petri e levado à estufa a 80°C até a evaporação total do etanol.

Após a secagem os PHAs foram caracterizados em comparação com padrão de PHB, através da técnica de RMN, realizada na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RESULTADOS PRELIMINARES

5.1.1. CARACTERIZAÇÃO DA PECTINA

A caracterização da pectina quanto ao seu grau de esterificação apresentou valores de $67,3 \pm 1,0$ %, desta forma, sendo classificada como pectina com alto grau de esterificação. Segundo May (2000) as pectinas são divididas em duas classes, uma com alto grau de esterificação ($>50\%$), HMP, e a outra com baixo grau de esterificação ($<50\%$), LMP. Comercialmente, as pectinas com alto grau de esterificação apresentam teores na faixa 55 a 75%, já nas de baixo grau de esterificação, esses teores variam na faixa 15 a 45% (BRANDÃO & ANDRADE, 1999).

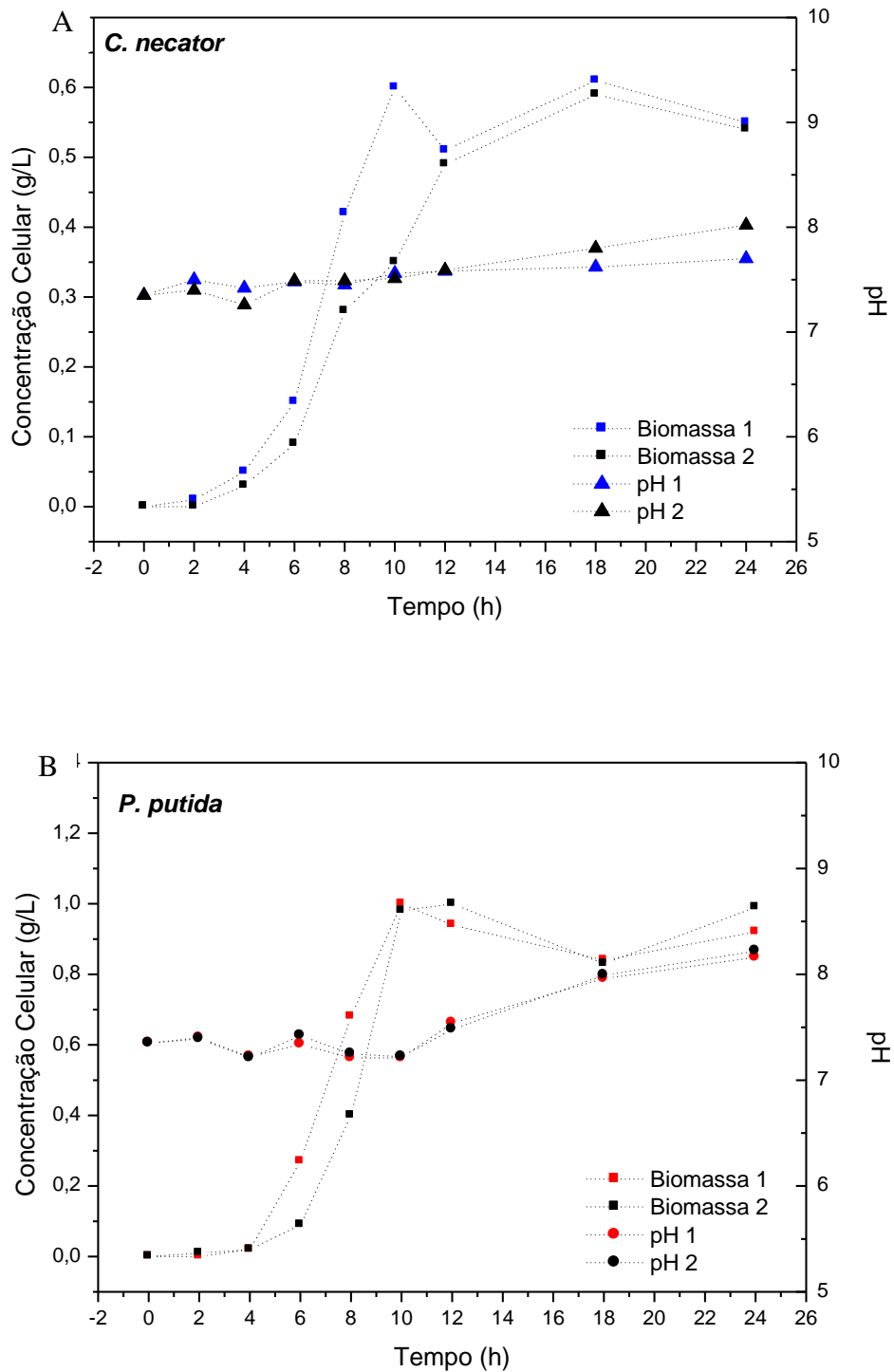
O conhecimento do grau de esterificação da pectina é um dado importante para análise do estudo, pois como demonstrado nos trabalhos de Krall & McFeeters (1998), em condições de pH 3,0 a 100° C, o aumento do grau de esterificação das pectinas leva a uma redução na taxa de hidrólise, com a liberação mais lenta de CR. De acordo com ANDRÉ-LEROUX *et al.* (2009), o grau de substituição também influencia na atividade das endo-PGs.

5.1.2. CRESCIMENTO EM CALDO NUTRIENTE - INÓCULO

O primeiro ensaio de cultivo em caldo nutriente foi realizado a partir das culturas de *C. necator* e *P. putida*, mantidas em Agar inclinado. A Figura 7 mostra o crescimento celular e a variação de pH em relação ao tempo de cultivo. *C. necator* apresentou uma fase adaptativa (lag) de 2 horas, enquanto, *P. putida* apresentou 4 horas de fase lag, ambos os micro-organismos cresceram exponencialmente até 10 horas de cultivo, com taxas de crescimento máxima (μ_{Max}) de 0,43 e 0,62 h⁻¹, para *C. necator* e *P. putida*, respectivamente. Os valores de pH aumentaram ao final da fase exponencial de crescimento para ambas as culturas. A partir desse monitoramento, pela alta concentração celular do inóculo no período de 10 horas de

cultivo, foi estabelecido esse tempo como um momento favorável para a transferência do inóculo para a segunda etapa de cultivo em meio mineral.

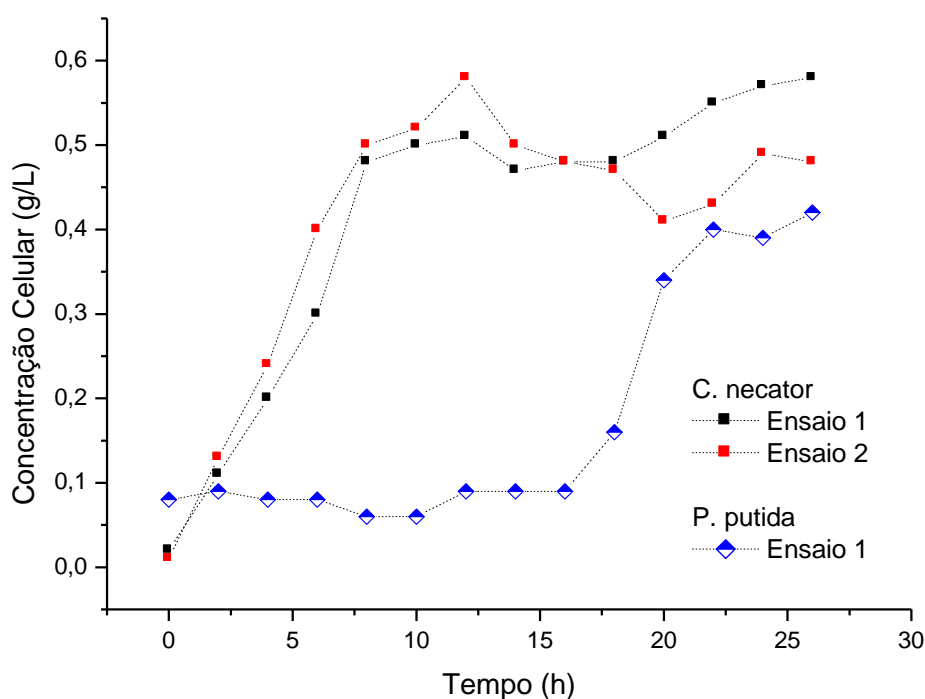
Figura 7 - Crescimento celular e variação de pH durante o cultivo de *C. necator* (A) e *P. putida* (B) em meio caldo nutriente.



5.1.3. CULTIVO EM MEIO MINERAL COM ÁCIDO GALACTURÔNICO

Visando verificar se o ácido galacturônico era usado como fonte de carbono para crescimento celular de *C. necator* e *P. putida*, foi realizado um ensaio utilizando 1,5% (p/v) de ácido galacturônico como única fonte de carbono. Como podemos observar pela Figura 8, ambas as culturas demonstraram essa capacidade, sendo que *P. putida* apresentou uma fase de adaptação mais lenta, somente iniciando sua fase exponencial de crescimento após 16 horas de cultivo e crescendo apenas 1 dos ensaio, enquanto *C. necator* não apresentou nenhuma fase adaptativa, crescendo linearmente até 8 horas de cultivo.

Figura 8 - Crescimento celular durante o cultivo de *C. necator* e *P. putida* em meio mineral, contendo ácido galacturônico 1,5%.



A bactéria *P. putida* é conhecida, assim como as demais bactérias de seu gênero, pela sua ampla capacidade de assimilar diversos substratos como fonte de carbono, além da glicose, compostos aromáticos e ácidos alcanóicos (ácido octanóico, ácido undecenóico), produzindo PHAs aromáticos e de cadeia média (TOBIN & O'CONNOR, 2005; HARTMANN *et al.*, 2006; WARD & O'CONNOR, 2005). Da mesma forma, *C. necator* apresenta uma ampla diversidade no uso de substratos como fonte de carbono, mas a única

espécie do seu gênero conhecida em assimilar ácido galacturônico para crescimento celular é a *C. taiwanensis*, mas que tem a síntese de PHAs inibida por esse substrato (WEI *et al.*, 2011). Desta forma, não foram encontrados na literatura relatos do uso de ácido galacturônico por ambos os micro-organismos.

5.1.4. ENSAIO I DE HIDRÓLISE ÁCIDA

Baseado na metodologia descrita por Wenzel (2001) foi realizada a hidrólise ácida da pectina, e o hidrolisado obtido foi concentrado e detoxificado com carvão ativo, e ambos utilizados na formulação do meio mineral para crescimento celular de *C. necator* e *P. putida*. Os resultados de CR obtidos em cada etapa e de crescimento celular de ambas as culturas podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultado de compostos redutores (CR) obtidos no ensaio I de hidrólise ácida e crescimento celular de *C. necator* e *P. putida* com MM formulado com esses hidrolisados.

Tratamento	CR no Hidrolisado (g/L)	CR no Meio Mineral (g/L)	<i>C. necator</i>	<i>P. putida</i>
Hidrolisado	0,66 ($\pm 0,03$)	---	---	---
Hidrolisado Concentrado	3,67 ($\pm 0,05$)	2,55 ($\pm 0,05$)	Não Houve Crescimento	Não Houve Crescimento
Hidrolisado Concentrado e Detoxificado	3,26 ($\pm 0,08$)	2,25 ($\pm 0,04$)	Não Houve Crescimento	Não Houve Crescimento

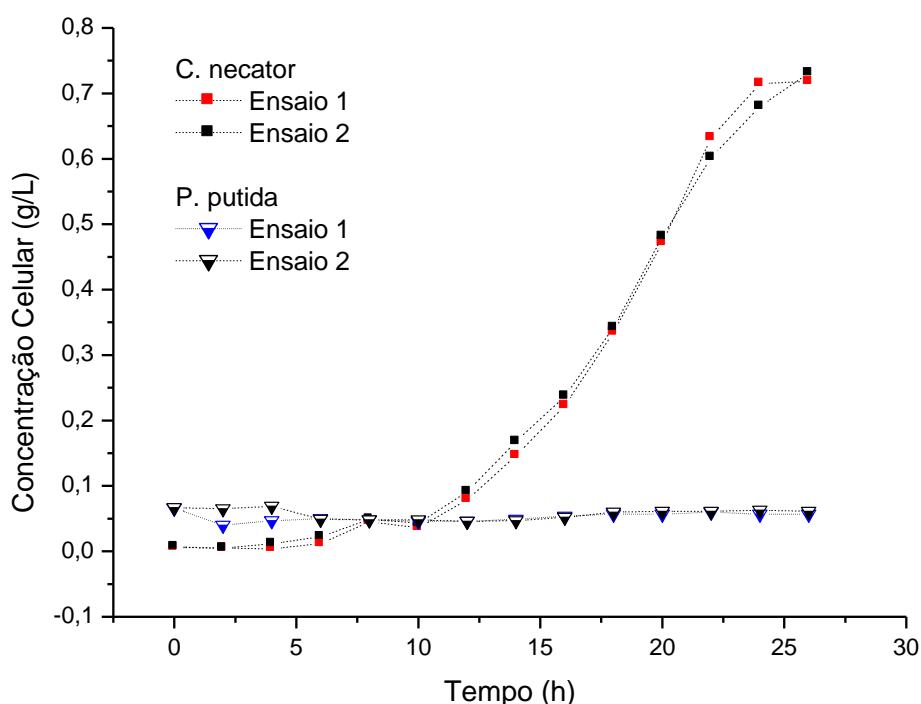
Não houve crescimento em nenhuma das condições testadas. As condições fortemente ácidas e altas temperaturas favorecem a formação de produtos de degradação das pentoses e hexoses. Esses compostos têm atividade inibidora sobre o crescimento celular, sendo considerados tóxicos para a maioria dos organismos e bactérias (ZALDIVAR *et al.*, 1999).

5.1.5. ENSAIO II DE HIDRÓLISE ÁCIDA

Visando melhorar as condições de hidrólise, foram realizadas algumas adaptações no sistema proposto por Wenzel (2001), obtendo-se 1,97 ($\pm 0,06$) g/L de CR diretamente no hidrolisado, e após a etapa de concentração o valor de CR aumentou para 3,15 ($\pm 0,05$) g/L. As condições experimentais modificadas, com a eliminação da etapa de repouso em ácido sulfúrico concentrado por 1 hora e a eliminação da etapa de repouso por 24 horas após a hidrólise, podem explicar este resultado. O hidrolisado concentrado foi utilizado na formulação do meio mineral, obtendo-se 2,20 ($\pm 0,08$) g/L. O resultado do crescimento celular de *C. necator* e *P. putida*, podem ser observados na Figura 9.

C. necator apresentou uma fase adaptativa de 10 horas de cultivo, crescendo exponencialmente até 22 horas e apresentando μ_{Max} de 0,2 h⁻¹, enquanto *P. putida* não apresentou crescimento celular nessas condições de hidrólise. Provavelmente ainda há presença de produtos de degradação no meio e a bactéria *P. putida* apresentou-se mais sensível a esses inibidores.

Figura 9 - Crescimento celular durante o cultivo de *C. necator* e *P. putida* em meio mineral, formulado com hidrolisado químico de pectina (2,20 g/L de CR).



5.1.6. ENSAIO DE VELOCIDADE DE REAÇÃO ENZIMÁTICA

Os resultados de liberação de CR apresentados na Figura 10 mostram que ao final das 24 horas de hidrólise o ensaio com pectina esterificada apresentou 5,53 ($\pm 0,05$) g/L de CR e o ensaio com pectina desesterificada apresentou 5,18 ($\pm 0,05$) g/L de CR. A concentração de CR aumenta rapidamente nas primeiras 6 horas, para ambas as condições, período que coincide com a diminuição da velocidade de reação enzimática mostrada na Figura 11.

A poligalacturonase utilizada nesse trabalho é classificada como endo-PG (E.C. 3.2.1.15), e seu substrato preferencial são as cadeias homogalacturonanas, hidrolisando as ligações glicosídicas α 1 \rightarrow 4 entre dois resíduos de ácidos galacturônicos. Esses resíduos podem ser metil-esterificados no grupo carboxílico e acetil-esterificados nos grupos hidroxilas, e com o aumento do grau de substituição, as endo-PGs frequentemente diminuem sua atividade (NEUKOM *et al.*, 1963 apud ANDRÉ-LEROUX *et al.*, 2009)

No entanto, algumas endo-PGs têm sua atividade reforçada em substratos ligeiramente metilados. Este é o caso das PG-A e PG-B de *Aspergillus niger*, para as quais foi encontrada uma relação específica de atividade com o grau de metilação (PARENICOVA *et al.*, 2000 apud BONNIN *et al.*, 2002). Já no caso das PG-C e PG-E de *A. niger*, um fraco grau de metilação parece inativar a atividade dessas enzimas (HUANG & MAHONEY, 1999 apud BONNIN *et al.*, 2002). Como a endo-PG utilizada nesse trabalho é isolada de *A. niger*, isso explica a variação inicial da velocidade de reação entre os ensaios com pectina esterificada e desesterificada.

No ensaio com a pectina desesterificada, que a velocidade inicial foi $> 19 \times 10^3$ UI/mL, agem preferencialmente as PG-C e PG-E, mas também agem as PG-A e PG-B, que não são inativadas por substratos desesterificados. Já no ensaio com pectina esterificada, que a velocidade inicial foi $< 5 \times 10^3$ UI/mL, apenas a PG-A e PG-B tem atividade, que é reforçada pela presença de substratos metilados, sendo a PG-C e PG-E inativada por esse substrato.

Já a diminuição da velocidade enzimática, caracterizada de forma mais acentuada após 6 horas de hidrólise, para ambas as condições do ensaio, pode estar associada à diminuição da disponibilidade de substrato para a formação do complexo enzima-substrato (ES), passando a ser o substrato o fator limitante para a reação enzimática (ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

Figura 10 - Conversão de pectina esterificada e desesterificada em CR por tratamento com endo-PG (E.C. 3.2.1.15) (teor de substrato de 1% p/v)

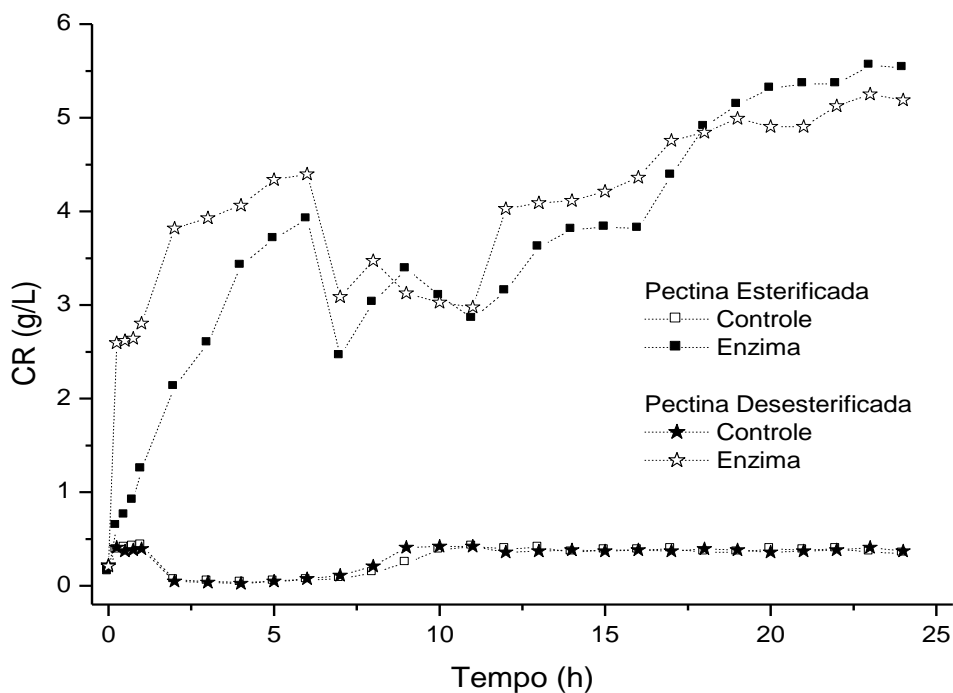
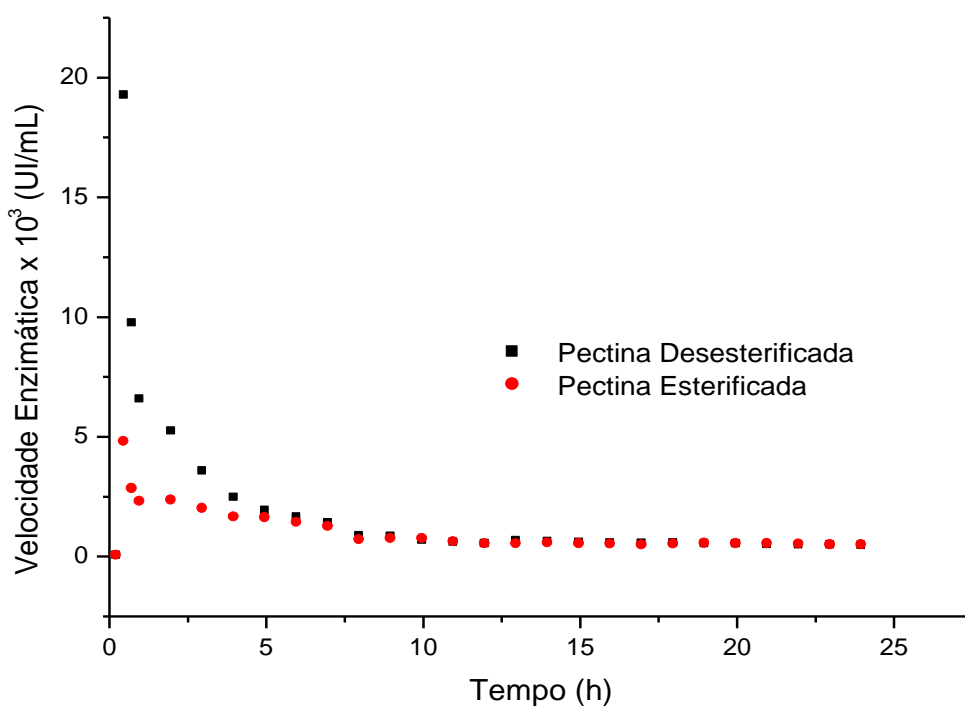
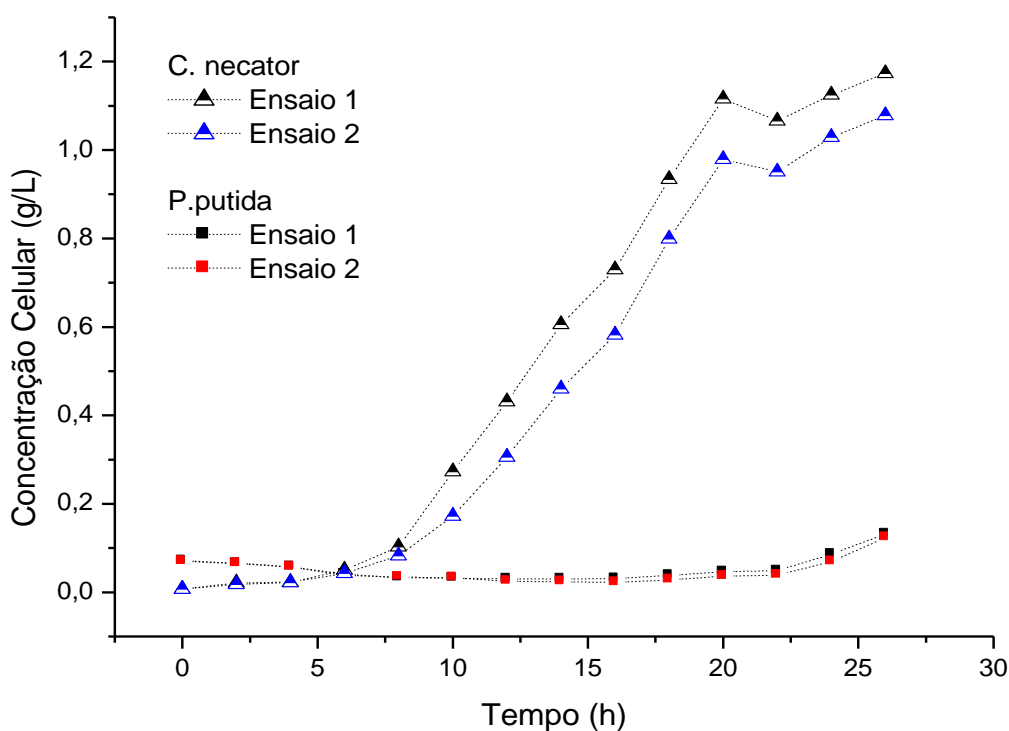


Figura 11 - Velocidade de reação enzimática da endo-PG (E.C. 3.2.1.15) durante a conversão de pectina esterificada e desesterificada em CR (teor de substrato de 1% p/v).



O hidrolisado enzimático obtido nessa condição foi utilizado na formulação do meio mineral para crescimento celular de *C. necator* e *P. putida*. De acordo com a Figura 12, *C. necator* foi capaz de crescer utilizando o hidrolisado péctico como única fonte de carbono, apresentando uma fase de adaptação de 8 horas e μ_{Max} de $0,15 \text{ h}^{-1}$. *P. putida* apresentou uma tendência de crescimento apenas após 24 horas de cultivo; desta forma, o uso desse substrato não foi viável para o crescimento celular desse micro-organismo.

Figura 12 - Crescimento celular durante o cultivo de *C. necator* e *P. putida* em meio mineral, contendo hidrolisado enzimático de pectina (4,97g/L de CR) como única fonte de carbono.



Com base nesses resultados preliminares, concluiu-se que *C. necator* é o micro-organismo mais adequado para crescimento celular visando à produção de biopolímeros a partir de hidrolisados pécticos. Dessa forma, os experimentos seguintes foram realizados apenas com essa espécie. Mas também ficou clara a necessidade de melhorar os procedimentos de hidrólise da pectina, tanto por métodos ácidos, quanto enzimáticos, visando aumentar a concentração de CR e diminuir os possíveis produtos de degradação formados durante a hidrólise. A partir desses estudos serão apresentados os resultados a seguir.

5.2. ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ÁCIDA

5.2.1. PLANEJAMENTO FATORIAL DE HIDRÓLISE ÁCIDA

A Figura 13-A mostra a superfície de resposta para a variável concentração de CR, demonstrando que essa variável aumenta em função do acréscimo da temperatura e da redução na concentração de ácido sulfúrico. Foi obtida uma concentração máxima de 5,9 g/L no ensaio com 1,0% (v/v) de ácido sulfúrico à 100°C.

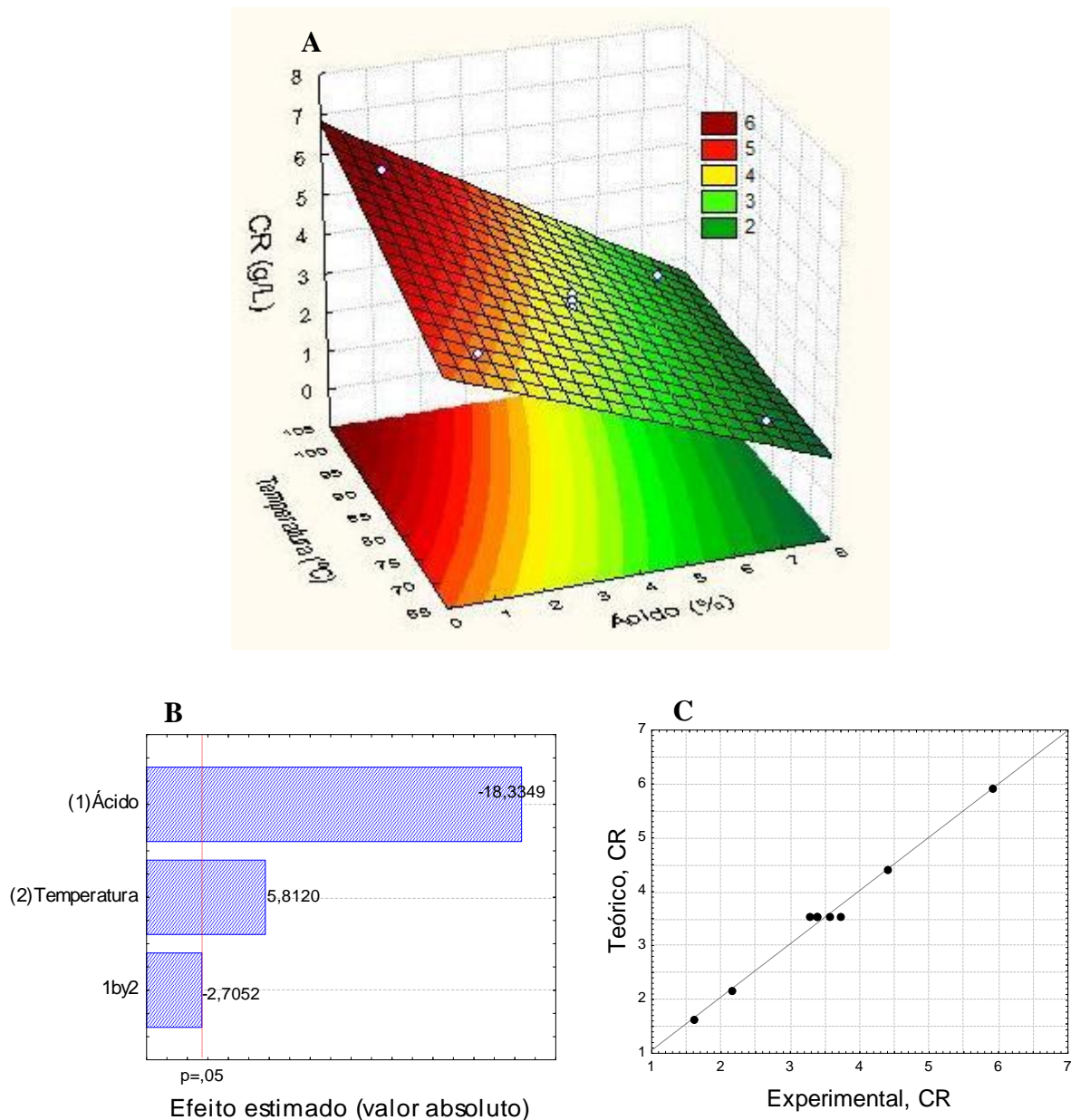
Na Figura 13-B temos o diagrama de Pareto, no qual podemos observar que ao contrário da temperatura, um aumento na concentração de ácido tem um efeito negativo sobre a variável resposta. A interação das variáveis estudadas não apresentou significância estatística. Smidsrod e colaboradores (1966) relataram que em condições fortemente ácidas ($\text{pH} < 1,0$), polipectato foi hidrolisado mais lentamente a polissacarídeos neutros, em comparação com condições mais brandas de acidez ($\text{pH} 2,5 - 4,5$).

Os resultados experimentais foram em concordância com o modelo de previsão tendo em vista a correlação satisfatória entre os dados teoricamente previstos e os valores experimentais (Figura 13-C). O aspecto dos hidrolisados obtidos em cada ensaio pode ser visualizado pela Figura 14. A Equação 4 apresenta o modelo empírico, sendo o valor de R^2 correspondente a 0,99. O termo da interação (temperatura- H_2SO_4) foi descartado porque o valor de p foi maior que 0,05 ($p=0,054$), enquanto para temperatura e H_2SO_4 , os valores de p foram 0,00436 e 0,0005, respectivamente, para um nível de confiança de 95%.

Garna e colaboradores (2006), estudando a cinética de hidrólise da pectina com diferentes concentrações de ácido sulfúrico, obtiveram os melhores resultados com concentrações de ácido sulfúrico em torno de 1,0 M. Concentrações de 0,2 M e 2,0 M apresentaram menores taxas de hidrólise. Os mesmos autores também investigaram o efeito da temperatura, fazendo o mesmo estudo a 80 e 100° C, obtendo maiores rendimentos em percentagem de ácido galacturônico nas condições mais drásticas de temperatura. Resultados semelhantes foram encontrados por Leitão e colaboradores (1995), que trabalhando com diferentes ácidos, estudaram temperaturas de hidrólise da pectina de girassol a 100 e 120° C. Este comportamento pode ser explicado devido à maior resistência das ligações glicosídicas, entre as unidades de ácido galacturônico, às condições mais amenas de hidrólise (BIERMANN, 1988; DE RUITER *et al.*, 1992).

$$CR = 0,9273 - (0,0894 \times H_2SO_4) + 0,0560 \times T \quad (4).$$

Figura 13 - Superfície de resposta (A), diagrama de Pareto (B) e correlação entre pontos teóricos e experimentais (C), em função da temperatura e concentração de H_2SO_4



Os resultados indicam que há uma relação ótima de hidrólise com o aumento da temperatura e concentração controlada de ácido em faixas de até 1% (v/v). Tendo em vista as limitações de equipamento para promover um aumento da temperatura em valores maiores que 100° C, e sendo a melhor condição de hidrólise obtida nesse estudo a essa temperatura, foi definida a concentração de 1,0% (v/v) de ácido sulfúrico à 100° C como a condição ótima

entre as variáveis estudadas. Esta condição foi empregada para a realização da cinética de liberação de CR e obtenção de substrato para formulação de meio de cultivo.

Figura 14 - Aspecto dos hidrolisados obtidos em cada ensaio do planejamento fatorial de hidrólise ácida.



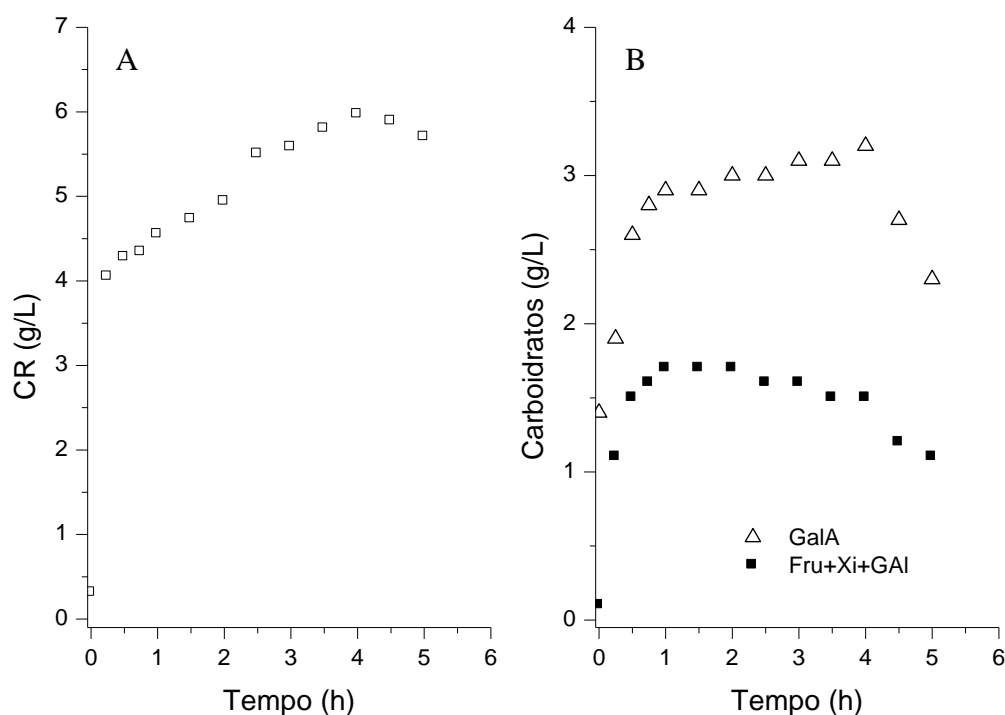
5.2.2. CINÉTICA HIDRÓLISE ÁCIDA

O acompanhamento da liberação de CR está demonstrado na Figura 15-A, onde é possível observar que nos primeiros 15 minutos de hidrólise ocorre a maior liberação, com um aumento acentuado até 4 horas, seguido de uma ligeira queda até o final das 5 horas de hidrólise. O perfil de liberação dos grupos de carboidratos, apresentados na Figura 15-B, está correlacionado com os resultados encontrados para CR, com uma alta taxa de liberação inicial para ambos os grupos. Após 2 horas foi observada uma queda no teor de frutose+xilose+galactose e após 4 horas essa redução foi acentuada para os dois grupos.

O aspecto das amostras retiradas durante o acompanhamento da hidrólise pode ser visualizado na Figura 16. No período de 4 horas de hidrólise, onde é atingida a maior concentração de CR, temos em média 6,0 g/L. Considerando que partimos de uma

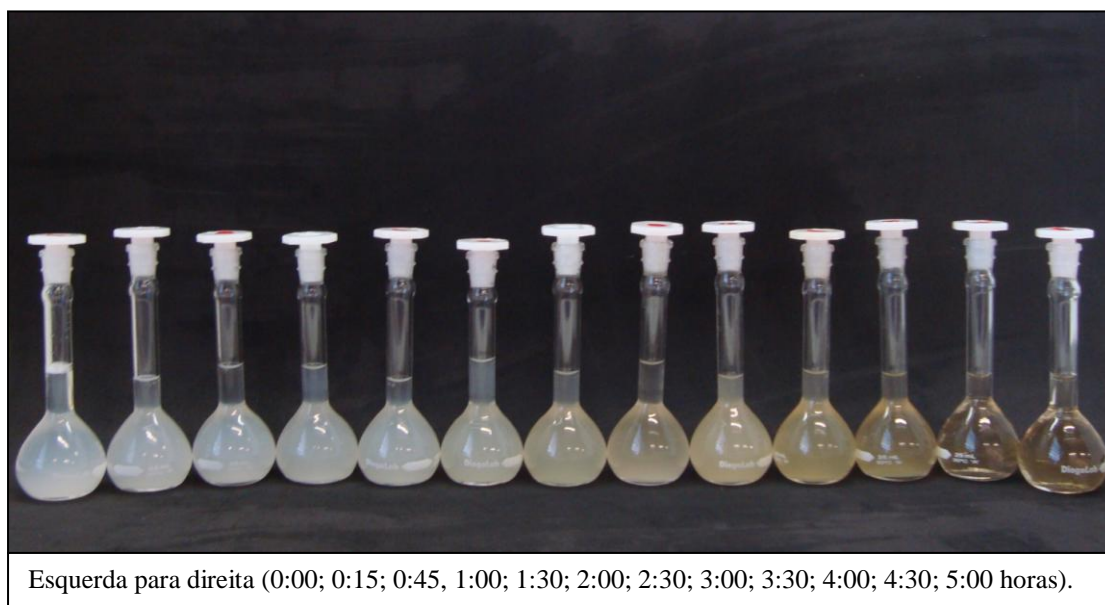
concentração inicial de pectina 10,0 g/L (1,0% p/v), obtivemos um rendimento de hidrólise de 60,0%, satisfatório para a formulação do meio de cultivo.

Figura 15 - Concentração de CR (A) e concentração de grupos de carboidratos (B), durante a hidrólise de ácida com 1% de H_2SO_4 e 100° C (Pectina 1% p/v).



A liberação inicial de uma alta concentração de CR pode ser explicada levando em consideração que as pectinas comerciais com alto grau de esterificação são geralmente extraídas em condições ácidas a quente. Desta forma, regiões contendo altas proporções de açúcares neutros são hidrolisadas (MAY, 2000), formando uma fração solúvel da pectina. Em adição, as condições iniciais de acidez e temperatura são suficientes para romper ligações glicosídicas mais susceptíveis à hidrólise, pois segundo Novosel *et al* (2000), a resistência à hidrólise ácida das ligações glicosídicas variam na pectina da seguinte forma: $\text{Ác.Gal} > \text{Ác.Gal} \text{---} \text{Rha} > \text{Rha} \text{---} \text{Ác.Gal} > \text{açúcar neutro} \text{---} \text{açúcar neutro}$. Essa variação na resistência também explica a liberação gradual de CR até o final do processo de hidrólise, sendo os monômeros de ácido galacturônico os últimos a serem liberados.

Figura 16 - Aspecto das amostras retiradas durante a cinética de hidrólise ácida com 1% de H_2SO_4 e 100°C (Pectina 1% p/v).



Garna e colaboradores (2006), trabalhando com pectina de alto grau de esterificação submetida à hidrólise com diferentes concentrações de ácido sulfúrico à 100°C , e quantificando apenas a liberação de monômeros de ácido galacturônico, também obtiveram liberação gradual nas primeiras horas em todos os tratamentos, mas com declínio na concentração de ácido galacturônico livre, a partir de diferentes tempos para cada tratamento. Segundo os autores, as condições da hidrólise por longo tempo levam a taxas de destruição dos ácidos galacturônicos livres, maiores do que as taxas de liberação do polímero. A razão para isso seria que os ácidos galacturônicos livres estão sujeitos à degradação formando lactonas (BLAKE & RICHARDS, 1968) ou furfural (MEDINA *et al.*, 1942).

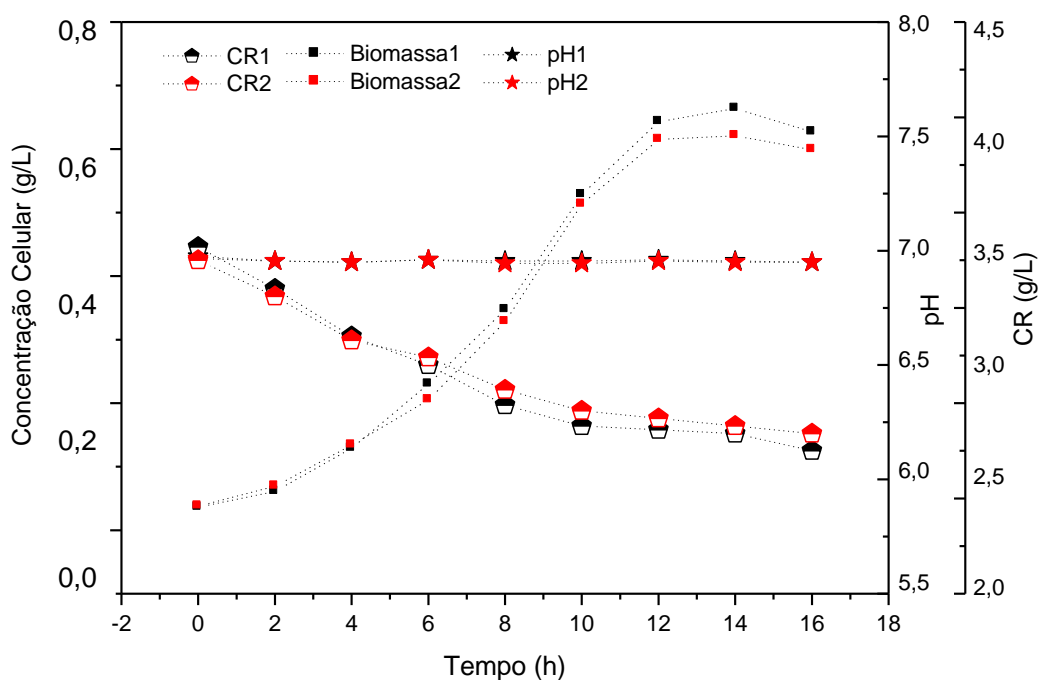
Garna e colaboradores (2004) mostraram efeito similar na liberação de açúcares neutros da pectina, estando também susceptível a degradação. Esses autores observaram o início da degradação de 2 horas para xilose e glicose e 3 horas para galactose, utilizando ácido sulfúrico 1 M a 100°C . Para a concentração de ácido sulfúrico de 2 M, na mesma temperatura, o início da degradação foi observado a partir de 1 hora para todos os açúcares, exceto a ramnose.

Na verdade todas as pentoses presentes na pectina, além dos monômeros de ácido galacturônico, podem sofrer degradação formando furfural (MEDINA *et al.*, 1942). A presença de aldeídos furânicos (furfural e HMF) afeta o metabolismo dos micro-organismos, sendo indesejáveis na formulação dos meios de cultivo. Os efeitos tóxicos destes compostos

parecem estar associados à sua alta reatividade para lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, além de poder causar danos à parede celular.

Os resultados sugerem que até 4 horas de hidrólise a formação de produtos de degradação é baixa. Desta forma, o hidrolisado obtido nessa condição foi utilizado na formulação do meio de cultura para crescimento celular de *C. necator*, como pode ser observado na Figura 17. O crescimento celular ocorre imediatamente após a inoculação das células, apresentando crescimento até 10 horas de cultivo, com μ_{Max} de $0,26 \text{ h}^{-1}$.

Figura 17 - Concentração celular, variação do pH e variação de CR, durante o cultivo de *C. necator* em meio mineral contendo hidrolisado ácido de pectina (3,82 g/L de CR) como única fonte de carbono.



Dalcanton *et al.* (2010) estudaram as mesmas condições de cultivo utilizando amido de arroz hidrolisado e obtiveram resultados semelhantes ($0,22$ e $0,24 \text{ h}^{-1}$). Valores similares também foram observados por Marangoni *et al.* (2001) ($0,26 \text{ h}^{-1}$) e Finkler (2002) ($0,21 \text{ h}^{-1}$), quando investigaram o uso de açúcar invertido como fonte de carbono, e Kim *et al.* (1994) ($0,20 \text{ h}^{-1}$) usando glicose. Assim os resultados indicam que o hidrolisado de pectina é um potencial substituto da glicose para crescimento celular de *C. necator*.

Durante o cultivo os valores de pH permanecem em torno de 7,0 e a concentração inicial de CR (3,82 g/L), decresce concomitantemente com a fase de crescimento, até 10 horas

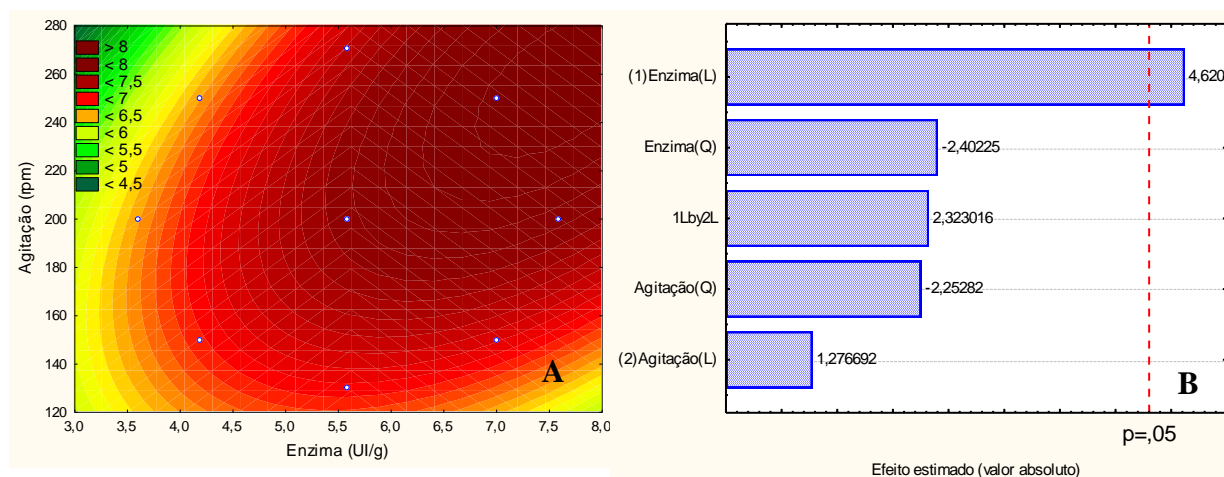
de cultivo. A concentração celular final observada foi de 0,63 g/L e o fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$) foi de 0,55 g/g. Este resultado é comparável ao valor teórico sugerido para *C. necator* (0,5 g/g), como relatado por Repaske e Repaske (1976). Após 16 horas de cultivo permaneceu uma concentração residual de CR de 2,8 g/L, o que também foi observado em outros estudos com diversas fontes de carbono, tais como acetato, melão e glicose (BAEI *et al.*, 2009).

5.3. ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

5.3.1. PLANEJAMENTO FATORIAL DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA I

A Figura 18-A mostra a curva de contorno para a variável resposta concentração de CR. Os resultados indicam que a faixa ótima para maximizar a concentração de CR situa-se para valores de concentração de enzima a partir de 6 UI/g e agitação acima de 200 rpm. O diagrama de Pareto (Figura 18-B) mostra que apenas o termo linear da concentração de enzima é significativo ($p < 0,05$). Como neste planejamento a condição máxima de CR não foi atingida, um novo planejamento foi realizado, ampliando-se as faixas de concentração de enzima e velocidade de agitação.

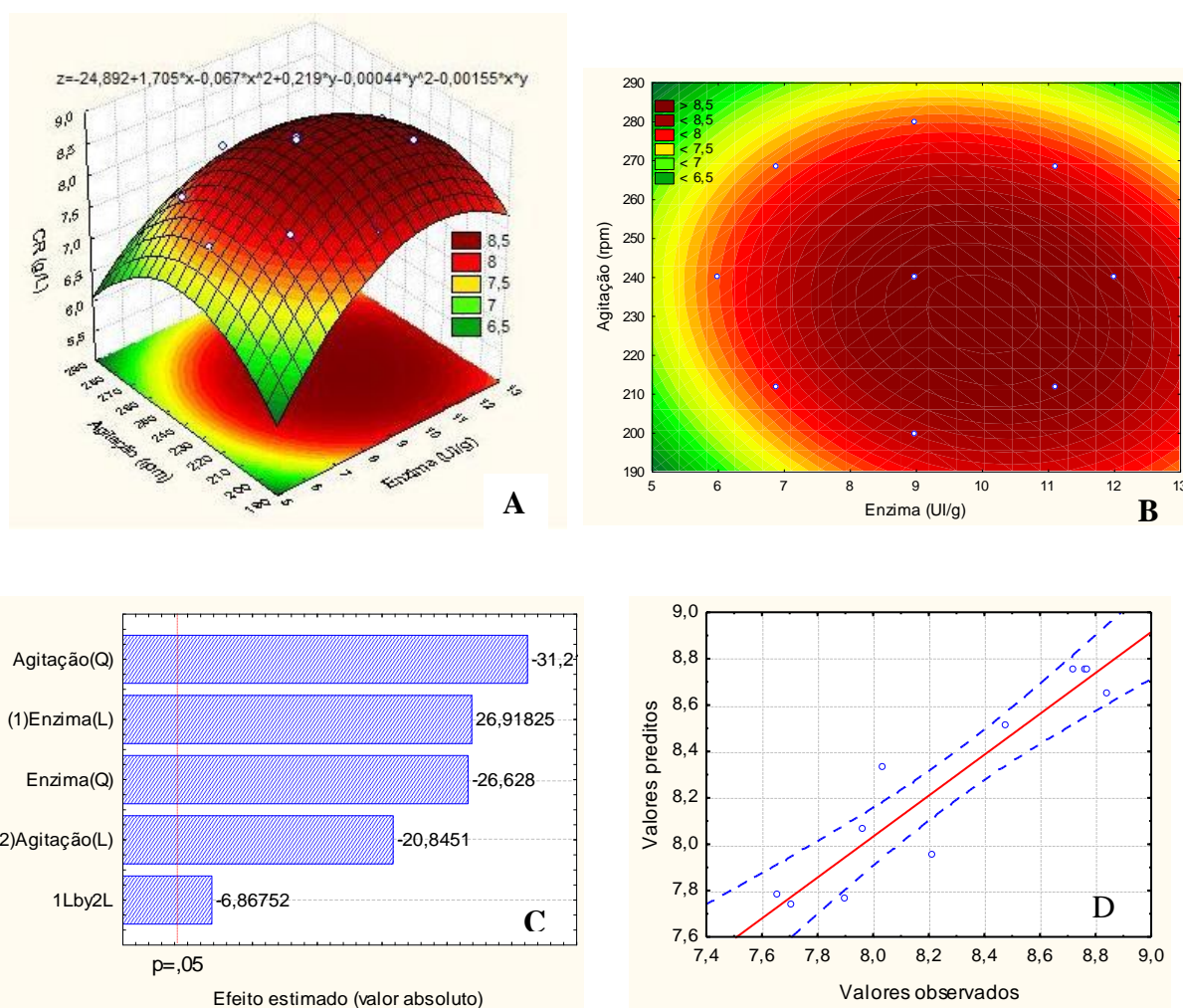
Figura 18 - Curva de contorno (A) e gráfico de Pareto (B) para a concentração de CR em função da agitação e da concentração de enzima para o primeiro planejamento experimental em 24 h de hidrólise com endo-PG.



5.3.2. PLANEJAMENTO FATORIAL DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA II

A Figura 19-A mostra a superfície de resposta e a 19-B a curva de contorno para a variável resposta concentração de CR. Como podemos observar a região ótima para a concentração de CR foi atingida. Os valores críticos do modelo que maximizam a resposta foram equivalentes a uma concentração enzimática de 10,01 UI/g e agitação de 230,3 rpm.

Figura 19 - Superfície de resposta (A), curva de contorno (B), gráfico de Pareto (C) e valores preditos *versus* valores observados (D) para a concentração de CR em função da agitação e da concentração de enzima para o segundo planejamento experimental em 24 h de hidrólise com endo-PG.



Pela análise estatística dos resultados deste segundo planejamento obtivemos o gráfico de Pareto (Figura 19-C), onde todos os efeitos apresentaram-se significativos ($p < 0,05$). A observação de que os efeitos de segunda ordem foram estatisticamente significativos e negativos sugere que há um ponto de ótimo para estas duas variáveis. A Figura 19-D mostra que há uma boa concordância entre os resultados experimentais e os resultados previstos pelo modelo.

A Equação 5 apresenta o modelo codificado otimizado para a hidrólise enzimática de pectina após 24 h de biorreação.

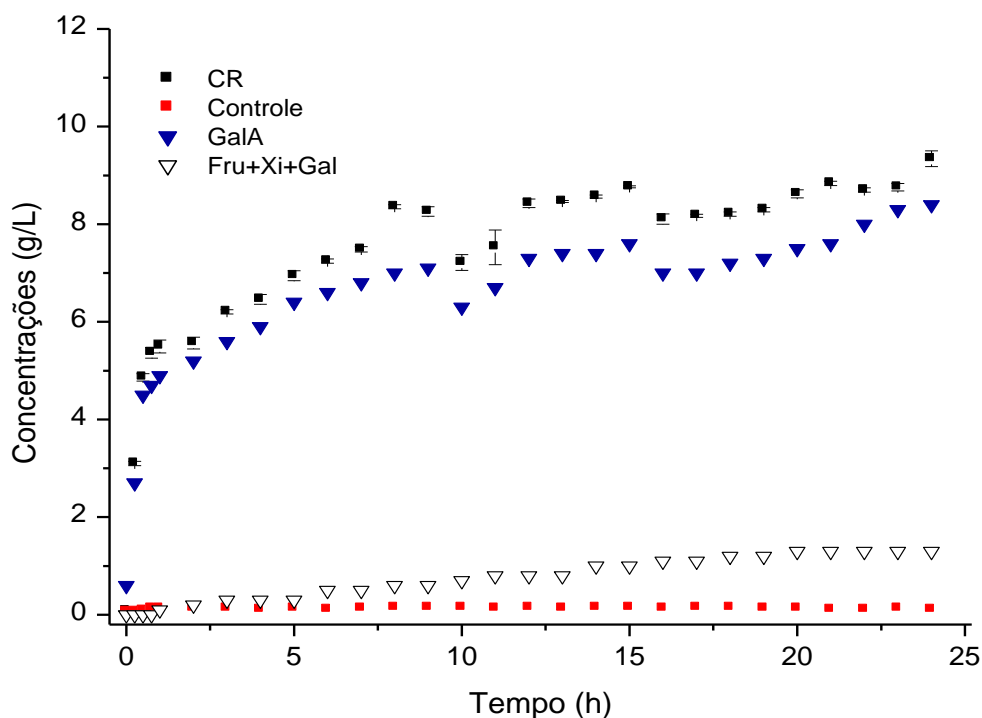
$$CR = -24,892 + 1,705 * x - 0,067 * x^2 + 0,219 * y - 0,00044 * y^2 - 0,00155 * x * y \quad (R^2 = 0,8821) \quad (5).$$

5.3.3. CINÉTICA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A condição ótima atingida pelo segundo planejamento (10,01 UI/g e 230,3 rpm) foi utilizada em um ensaio em triplicata para confirmação dos resultados e acompanhamento da cinética de liberação dos CR durante 24 horas de hidrólise, como pode ser observado na Figura 20. Pode-se observar uma elevada taxa de hidrólise nos primeiros 30 minutos, seguindo de forma acentuada até 8 horas de hidrólise. A partir desse tempo, a hidrólise é gradual até o final das 24 horas, onde é atingida uma concentração média de CR de $9,34 \pm 0,16$ g/L, maior que o valor predito pelo modelo (8,85 g/L). A diminuição na taxa de liberação de CR ao longo do processo de hidrólise também foi observada por Bélafi-Bakó e colaboradores (2007), onde trabalhando com diferentes concentrações iniciais de GalA livre foi demonstrado o efeito de inibição da atividade enzimática pelo produto da hidrólise.

O perfil de liberação dos grupos GalA e Fru+Xil+Gal está relacionado com os CR, ocorrendo uma liberação inicial maior do grupo GalA na primeira hora de hidrólise, seguindo-se de uma liberação mais lenta e gradual até o final das 24 horas. Já o grupo de Fru+Xi+Gal apresenta uma liberação gradual até 18 horas, seguindo constante até as 24 horas de hidrólise. Esses açúcares neutros que se encontram em menor concentração na pectina provavelmente são despolimerizados devido à menor resistência de suas ligações glicosídicas (NOVOSEL *et al.*, 2000), sendo as condições de acidez a pH 4,0 e a temperatura de 50°C suficientes para a sua liberação.

Figura 20 - Cinética de hidrólise enzimática com a liberação de CR, na condição otimizada de 10,01 UI/g e 230,3 rpm (Pectina 1% p/v).



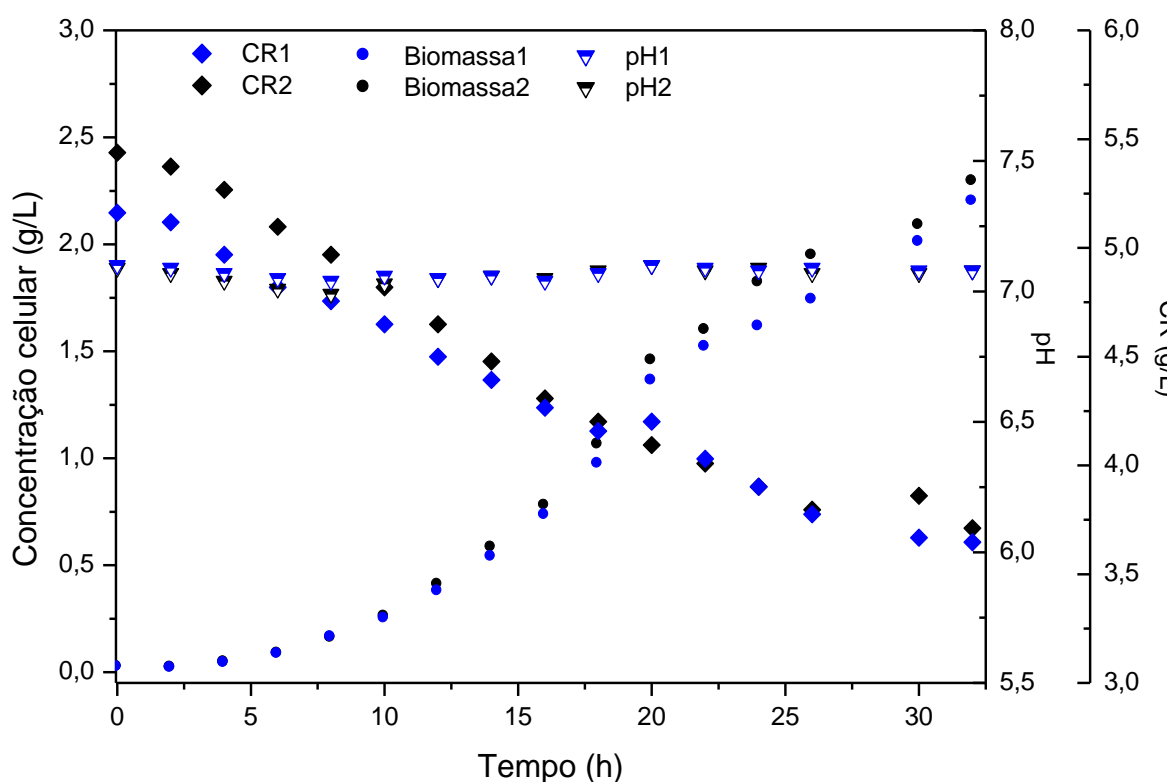
O hidrolisado final obtido foi utilizado na formulação de meio mineral para crescimento celular de *C. necator*, como pode ser observado na Figura 21. Os valores de μ_{\max} foram de 0,178 e 0,197 h^{-1} , semelhantes ao valor encontrado por MARANGONI *et al.* (2001) (0,19 h^{-1}) quando utilizou um substrato misto (glicose, frutose, hidrolisado de lactose e açúcar invertido) e por FINKLER (2002), que obteve um valor de 0,16 h^{-1} utilizando glicose. ARAGÃO *et al.* (1996), utilizando glicose e frutose, obtiveram um valor de μ_{\max} de 0,22 h^{-1} .

Durante o cultivo os valores de pH permanecem em torno de 7,0 e a concentração inicial de CR (5,3 g/L) decresce concomitantemente com a fase exponencial de crescimento celular, apresentando um consumo total de 1,6 g/L e uma concentração residual de substrato de 3,7 g/L. A concentração celular final obtida foi de 2,25 g/L, desta forma, apresentando um fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$) de 0,7 $\text{g}_{\text{cél}}/\text{g}_{\text{subs}}$, valor acima do valor teórico sugerido para *C. necator* (0,5 $\text{g}_{\text{cél}}/\text{g}_{\text{subs}}$), como relatado por Repaske e Repaske (1976). Mas outros trabalhos utilizando óleos vegetais como fonte de carbono, obtiveram valores de 0,7 à 0,8 $\text{g}_{\text{cél}}/\text{g}_{\text{subs}}$, indicando que os óleos vegetais são boas fontes para obtenção de alto peso seco

celular e acúmulo de PHAs (RAO, SRIDHAR & SEHGAL, 2010; OBRUCA *et al.*, 2010).

Outros estudos usando diferentes fontes de carbono também observaram uma concentração residual da fonte de carbono (BAEI *et al.*, 2009). Em nosso estudo essa concentração residual pode estar relacionada à presença de oligômeros, devido à atividade endo-PG da enzima utilizada. Iwasaki e colaboradores (1998) trabalhando com hidrólise de pectato de sódio por endo-PG, observaram, além de monossacarídeos, a formação de oligômeros (Di, Tri e Tetrassacarídeos), em diferentes concentrações de acordo com o tempo de hidrólise.

Figura 21 - Valores de crescimento celular, pH e consumo de CR durante o cultivo de *C. necator* meio mineral formulado com hidrolisado enzimático de pectina (5,3 g/L de CR) como única fonte de carbono.

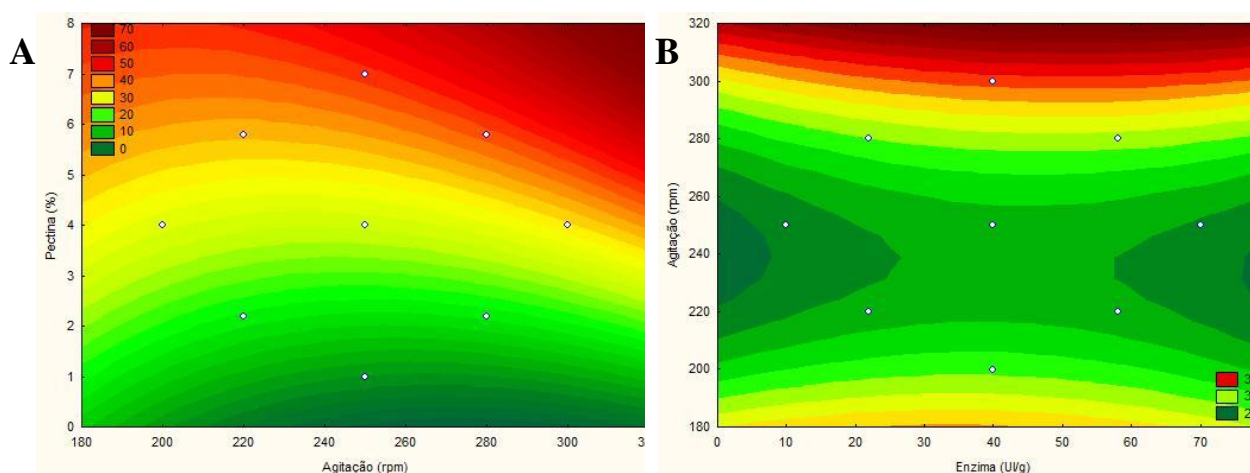


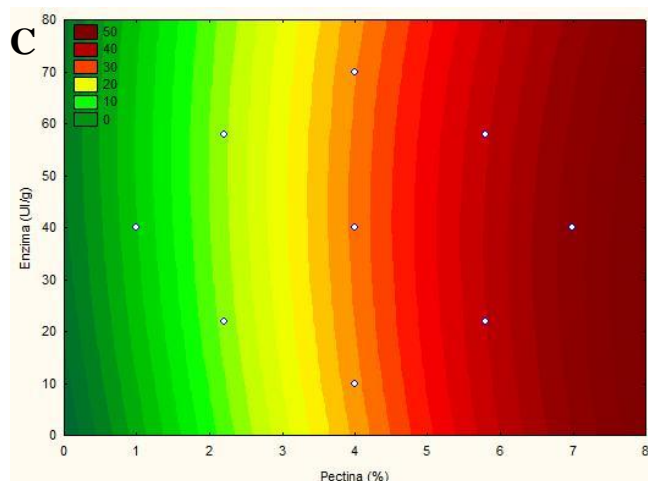
5.3.4. PLANEJAMENTO FATORIAL DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA III E IV

Pelas Figuras 22-A, 22-B e 22-C, observamos a influência significativa das variáveis agitação e concentração de pectina. Nos pontos com maiores valores para esses parâmetros, observa-se um aumento na variável resposta (concentração de CR), convergindo para a coloração fortemente vermelha observada no gráfico. Da mesma forma, observamos que a variável concentração de enzima não apresenta efeito significativo sobre a liberação de CR, pois em toda a faixa de concentração estudada, há pouca diferenciação da variável resposta.

Pela análise estatística dos resultados obtivemos o gráfico de Pareto (Figura 23-A), onde fica evidenciado que para a variável concentração de enzima, tanto o termo linear, quanto a sua interação com as outras variáveis, não apresentou significância estatística ($p < 0,05$). Já as outras variáveis estudadas, assim como a interação entre elas, apresentaram significância estatística ($p > 0,05$), confirmando os resultados observados. A Figura 23-B mostra que há uma boa concordância entre os resultados experimentais e os resultados previstos pelo modelo.

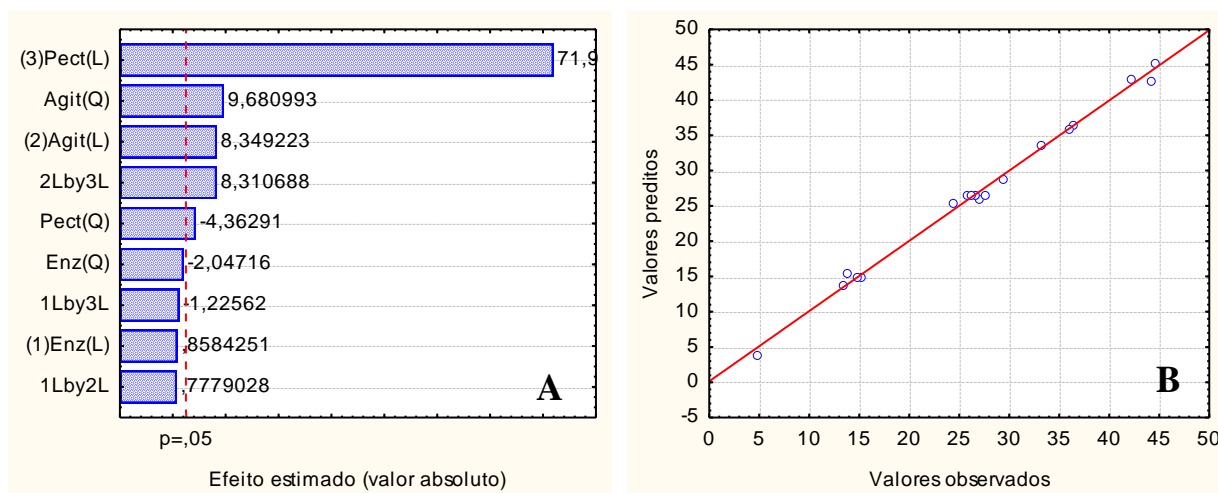
Figura 22 - Superfície de resposta para as variáveis, agitação x concentração de pectina (A), enzima x agitação (B) e concentração de pectina x enzima (C), em função da variável resposta concentração de CR para o terceiro planejamento experimental em 24 h de hidrólise com endo-PG.





Com base nesses resultados, concluiu-se que a variável agitação tem grande influência sobre a atividade enzimática. O que pode ser explicado pela alta viscosidade da pectina em solução aquosa, principalmente em concentrações superiores a 1 % (p/v). A agitação é imprescindível para promover o contato da enzima com o substrato, favorecendo a reação de hidrólise com a liberação de CR. Songpim e colaboradores (2010), trabalhando com a enzima pectato liase, estudaram o efeito da agitação em faixas de 150 a 250 rpm. Apesar de empregarem baixas concentrações de substrato (0,4%), obtiveram máxima resposta com valores de agitação de 200 rpm, demonstrando o efeito dessa variável sobre a atividade enzimática.

Figura 23 - Gráfico de Pareto (A) e valores preditos *versus* valores observados (B) para a concentração de CR em função das variáveis estudadas para o terceiro planejamento experimental em 24 h de hidrólise com endo-PG.

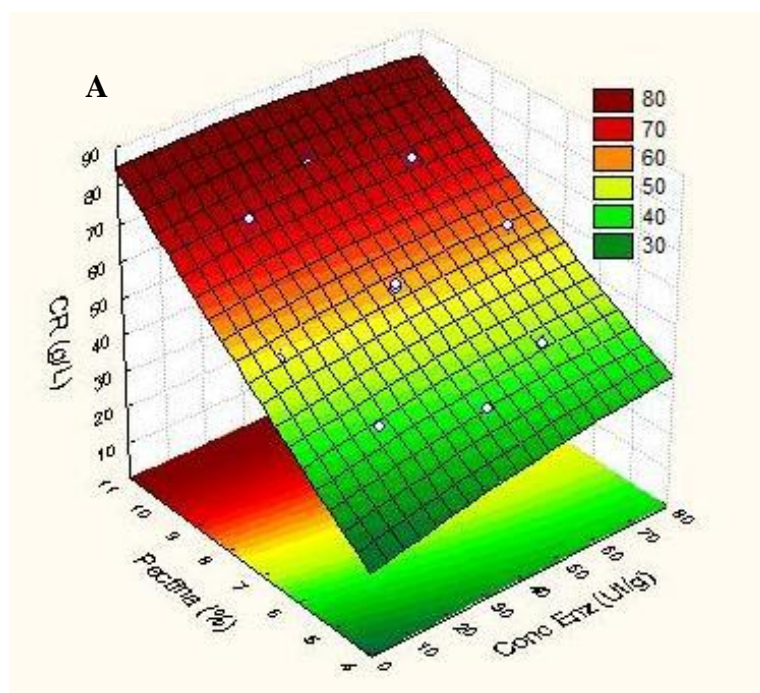


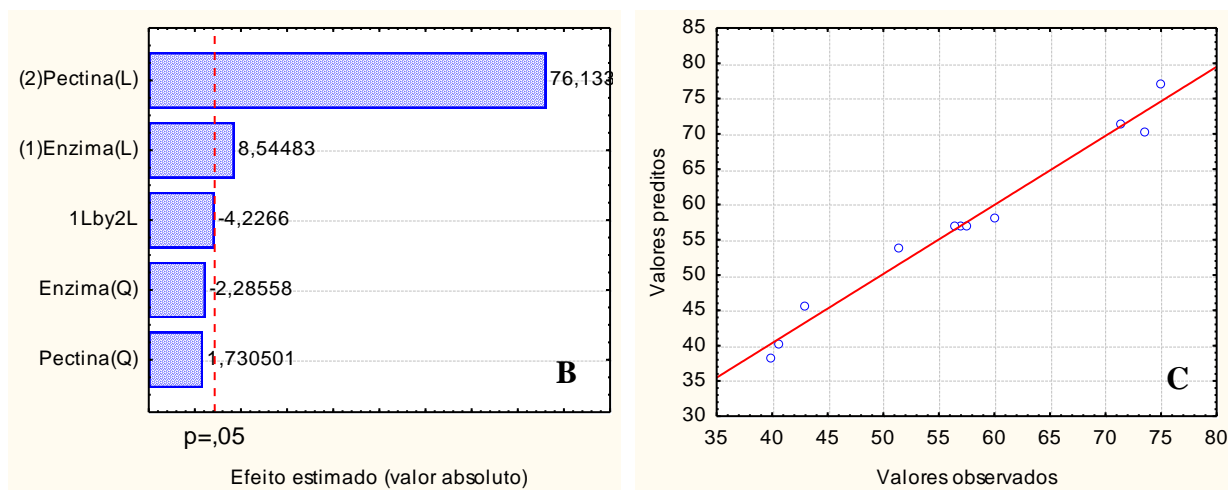
Tendo em vista a limitação de equipamento para promover agitação superior a 300 rpm, definiu-se esse valor como parâmetro para essa variável estudada. Não sendo possível, através desse planejamento, definir valores ótimos em concentração de enzima e de substrato (pectina) para a maximização da resposta (CR), um novo planejamento fatorial foi realizado, tendo como variáveis a concentração enzimática (UI/g) e a concentração de substrato (%).

Na Figura 24-A temos a superfície de resposta para a variável concentração de CR, a partir dos resultados obtidos pelo novo planejamento fatorial. Como podemos observar, o aumento na concentração de substrato influenciou diretamente a variável resposta, sendo possível atingir 74,95 g/L de CR a partir de 10% de pectina (ou 100 g/L), indicando um rendimento de hidrólise de $\approx 75\%$.

O gráfico de Pareto (Figura 24-B) contribui com os resultados observados, indicando maior efeito significativo para a variável concentração de substrato, além de indicar que ambas as variáveis estudadas apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$). Pela Figura 24-C podemos observar que os valores reais encontrados estão em concordância com os valores preditos pelo modelo.

Figura 24 - Superfície de resposta (A), gráfico de Pareto (B) e valores preditos *versus* valores observados (C) para a concentração de CR em função das variáveis concentração enzimática e concentração de substrato para o quarto planejamento experimental em 24 h de hidrólise com endo-PG.





Mesmo não sendo atingida a condição ótima para as variáveis estudadas em função da variável resposta, a concentração de CR máxima obtida é suficiente para a formulação dos meios de cultura, pois estes serão formulados para uma concentração de CR na faixa de 40 g/L. Desta forma, a concentração de substrato em 10% (ou 100 g/L) foi a condição estabelecida para os subseqüentes ensaios de hidrólise.

Pelo mesmo estudo de planejamento fatorial observa-se que apesar de apresentar significância estatística, a variável concentração enzimática, em toda a faixa estudada, não apresentou relevante diferencial na liberação de CR. Sendo assim, não foi possível através desse estudo estabelecer um valor ótimo de concentração enzimática para os ensaios de hidrólise. Portanto um novo estudo foi proposto, um ensaio de *performance* enzimática.

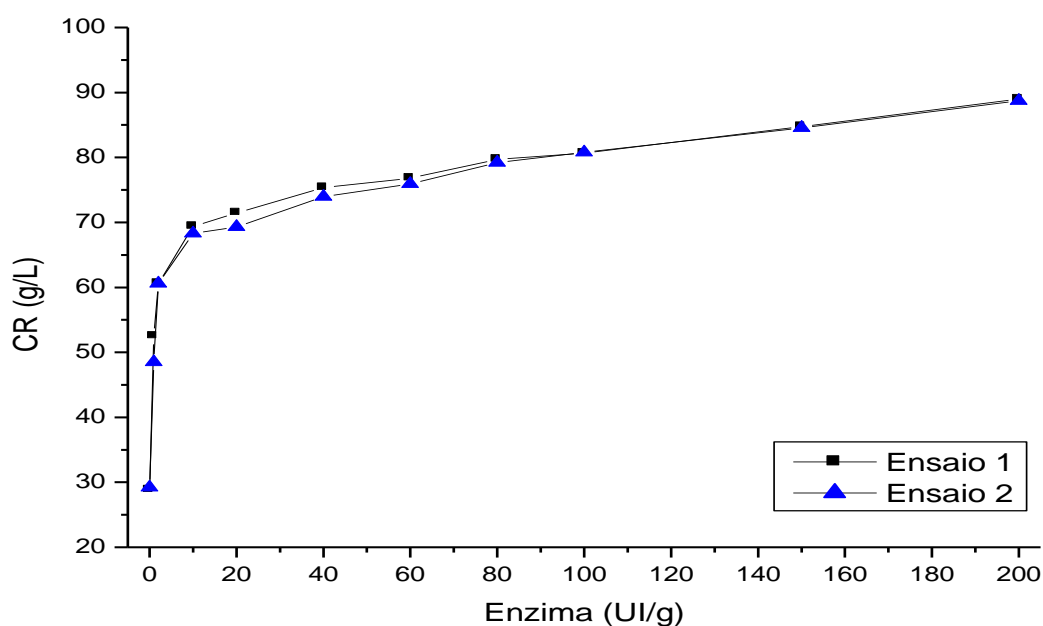
5.3.5. ENSAIO DE PERFORMANCE ENZIMÁTICA

Na Figura 25 temos o gráfico da performance enzimática, onde observamos que a taxa de hidrólise enzimática não aumenta de forma linear com o aumento da concentração de enzima. A concentração de CR aumenta da forma acentuada com o aumento da concentração enzimática até 10 UI/g de pectina, onde é possível se obter em média $68,8 \pm 0,5$ g/L de CR. A partir desse ponto, mesmo aumentando drasticamente a concentração de enzima chegando a 200 UI/g, o rendimento de hidrólise não aumenta significativamente.

De modo geral, o aumento na concentração enzimática influencia no aumento da taxa de reação da enzima. Mas segundo Cavaco-Paulo (2011) esse aumento pode ser observado até

o nível de saturação do substrato. A partir desse ponto, mesmo aumentando drasticamente a concentração da enzima, não ocorrem grandes incrementos nas taxas de biotransformação. Comportamento semelhante também pode ser observado para outras enzimas, como demonstrado por Michizoe e colaboradores (2001) estudando o efeito da concentração de lacase (0 à 15 μM) sobre a degradação de *o*-clorofenol, onde foi observado que a partir de 11 μM , a taxa de degradação foi praticamente estável.

Figura 25 - Gráfico de performance enzimática de endo-PG por 24 horas hidrólise com 10% de substrato em todas as concentrações de enzima.



A concentração enzimática de 10 UI/g de pectina representa a menor relação enzima/substrato com rendimento significativo de hidrólise. Esse valor está em concordância com o segundo planejamento fatorial de hidrólise enzimática (item 5.3.2), onde de acordo com o modelo, o valor crítico para a maximização da resposta em relação à concentração enzimática foi de 10,01 UI/g de pectina.

A partir deste resultado, foi definido em 10 UI/g de pectina o parâmetro de concentração enzimática considerada ótima para os ensaios de hidrólise. Tendo os demais parâmetros já definidos, agitação (300 rpm) e concentração de substrato (100 g/L), essas condições foram estabelecidas como valores críticos para a maximização da resposta (obtenção de CR).

Visando a confirmação desse resultado, um ensaio em triplicata foi realizado sob essas condições, obtendo-se ao final das 24 horas de hidrólise $71,5 \pm 0,8$ g/L de CR. O hidrolisado obtido foi neutralizado com KOH, esterilizado em autoclave e utilizado na formulação dos meios de cultura.

5.4. PRODUÇÃO DE PHA_S – HIDROLISADO DE PECTINA E PADRÃO GLICOSE

Com o hidrolisado obtido nas condições estabelecidas foi realizado um cultivo em meio formulado com o hidrolisado de pectina e um comparativo, em meio formulado com glicose, visando à produção de PHA's. As fases de crescimento celular e produção de PHA's foram acompanhadas por um período de 42 horas. Durante esse período o pH foi monitorado em intervalos de 1 hora e controlado em $7,0 \pm 0,5$, com a adição de KOH (1,0M e 0,1M) sob condições de esterilidade. Os demais parâmetros monitorados estão apresentados na Figura 26-A (ensaio com glicose) e Figura 26-B (ensaio com hidrolisado de pectina).

Para o cultivo com glicose a fase exponencial de crescimento celular inicia-se 2 horas após a inoculação até 10 horas de cultivo, momento em que ocorre a limitação de nitrogênio. O cultivo com hidrolisado de pectina apresenta uma fase *lag* de aproximadamente 4 horas, quando se inicia a fase de crescimento exponencial que vai até 14 horas de cultivo, momento em que ocorre a limitação total de nitrogênio. Esta fase está relacionada principalmente ao aumento da biomassa celular, apesar de ocorrer um pequeno acúmulo de biopolímero nessa fase (FARIAS, 2009).

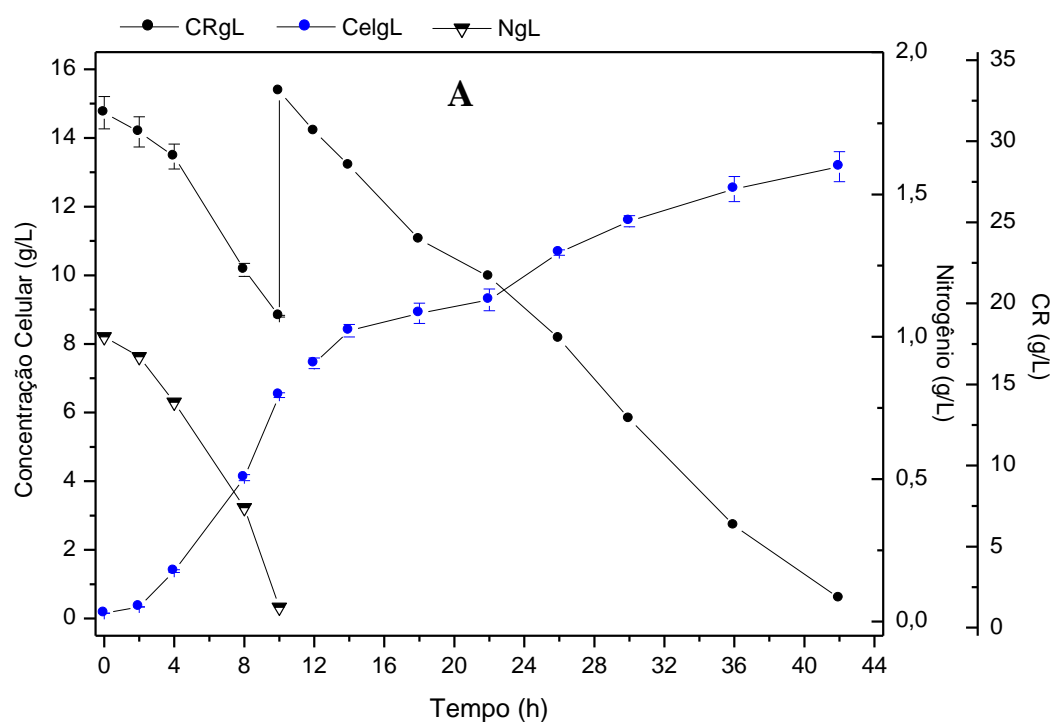
Como pode ser observado nas curvas de crescimento, para ambos os cultivos, a biomassa continua aumentando após a fase de limitação de nitrogênio, mas não de forma exponencial, o que está relacionado principalmente ao acúmulo intracelular de biopolímeros. Os valores de velocidade exponencial de crescimento não foram indicados para esses cultivos, pois a concentração inicial de inóculo foi de 10%, diferente dos 5% utilizado nos cultivos anteriores, e essa nova condição altera muito as velocidades específicas de crescimento.

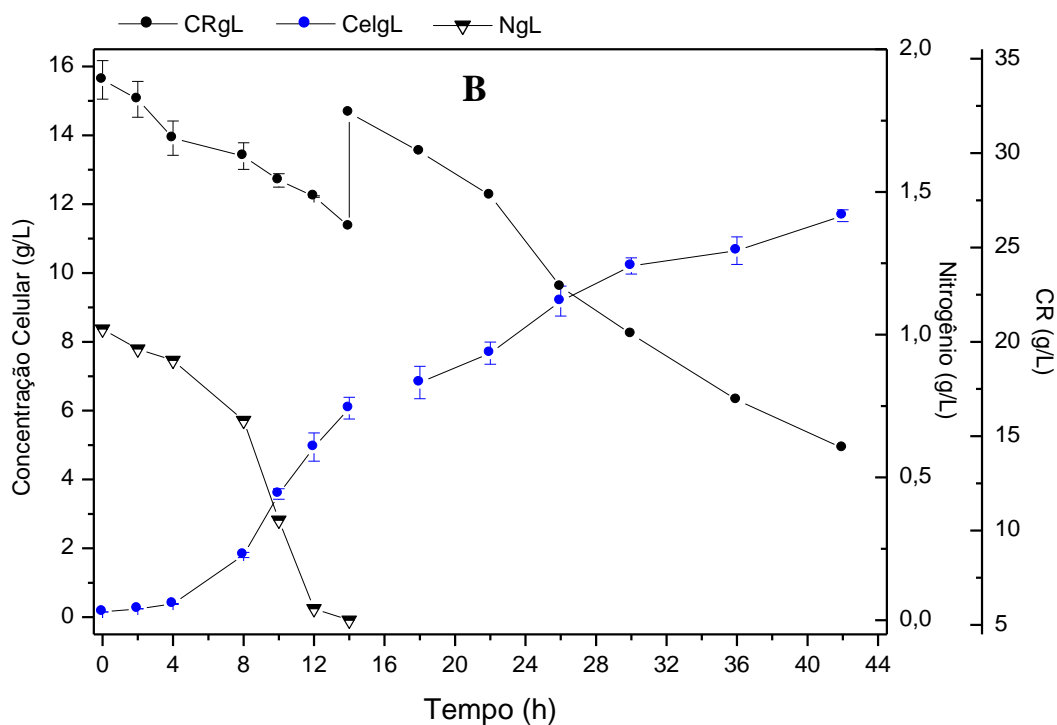
Os meios foram formulados com uma concentração média inicial de CR de 31,8 g/L para os cultivos com glicose, que decrescem até 19,2 g/L no momento da limitação, apresentando um consumo médio de 12,6 g/L de CR. Nessa fase, a curva de crescimento celular indica uma concentração de 6,5 g/L de células. Desconsiderando a concentração

inicial de células (0,16 g/L) temos uma taxa de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) de 0,50 $g_{cél}/g_{subs}$. Para o cultivo com hidrolisado de pectina a concentração média inicial de CR foi de 33,9 g/L, decrescendo até 26,1 g/L no momento da limitação, com um consumo médio de 7,8 g/L de CR e uma concentração celular de 6,1 g/L. Desconsiderando a concentração inicial de células (0,15 g/L), temos um $Y_{X/S}$ de 0,76 $g_{cél}/g_{subs}$.

O $Y_{X/S}$ obtido para o cultivo com glicose está de acordo com o teórico sugerido para *C. necator* é de 0,5 $g_{cél}/g_{subs}$ (REPASKE & REPASKE, 1976), e pode ser comparado aos valores obtidos por Farias (2009), que trabalhando com melaço cítrico obteve 0,52 e 0,48 $g_{cél}/g_{subs}$. Já o $Y_{X/S}$ obtido para o cultivo com hidrolisado de pectina está acima do teórico sugerido, mas esta de acordo com os valores encontrados nos cultivos anteriores com hidrolisados de pectina e próximo aos valores obtidos em cultivos usando óleos vegetais como fonte de carbono (RAO, SRIDHAR & SEHGAL, 2010; OBRUCA *et al.*, 2010).

Figura 26 - Valores de crescimento celular, pH, consumo de CR e Nitrogênio, durante o cultivo de *C. necator* meio mineral formulado com glicose (A) e hidrolisado enzimático de pectina (B), como fonte de carbono.





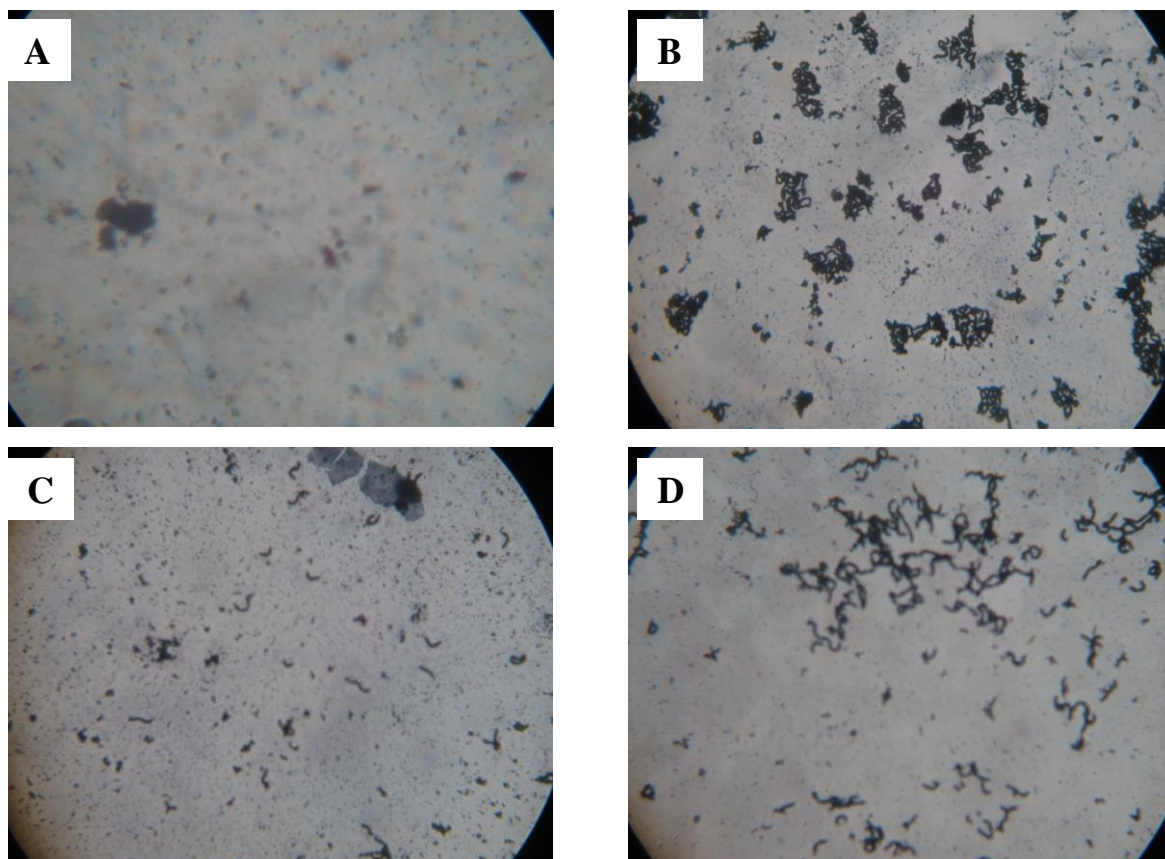
A concentração inicial de nitrogênio fornecida no meio e cultura foi em média 1,0 g/L, para ambos os cultivos. No momento da limitação, onde ocorre o consumo total do nitrogênio presente, temos uma concentração celular de 6,5 g/L e 6,1 g/L para os cultivos com glicose e hidrolisado de pectina, respectivamente. Dessa forma, a taxa de conversão de nitrogênio em célula ($Y_{S/N}$) foi de 6,5 e 6,1 g_{cel}/g_N , valores abaixo do teórico (8,33 g_{cel}/g_N) (REPASKE & REPASKE, 1976).

No momento da limitação foi realizado um pulso de glicose e hidrolisado de pectina, para os respectivos cultivos, visando à correção da concentração de CR, sendo obtido em média 33,1 e 32,1 g/L, para os cultivos com glicose e hidrolisado de pectina, respectivamente. Após a correção da concentração de compostos redutores nos cultivos, estes foram conduzidos até 42 horas visando o acúmulo intracelular de biopolímeros. Ao final dos cultivos as concentrações residuais de CR foram de 1,80 e 14,4 g/L para os cultivos com glicose e hidrolisado de pectina, respectivamente. Valores residuais da fonte de carbono são esperados e também observados em outros trabalhos (BAEI *et al.*, 2009), mas como já discutido, em nosso estudo essa concentração residual pode estar relacionada à presença de oligômeros devido à atividade endo-PG da enzima utilizada.

Sendo observada a presença intracelular do biopolímero, através da coloração com *Sudan Black*, em ambos os cultivos, e considerando o consumo quase total dos CR no meio

com glicose, os cultivos foram finalizados simultaneamente. Possivelmente, se o cultivo com hidrolisado de pectina tivesse sido estendido por um período maior, a concentração residual de CR diminuiria, com a continuidade do acúmulo de biopolímero. As imagens da coloração intracelular do PHA's podem ser observadas na Figura 27.

Figura 27 - Visualização do acúmulo intracelular de PHAs, em cultivo com glicose 36 horas (A) e 42 horas (B) e, cultivo com hidrolisado de pectina 36 horas (C) e 42 horas (D).



Como podemos observar na Figura 27, as imagens obtidas ao final dos cultivos apresentam células maiores e em formato de bastonetes em comparação com as imagens obtidas nas 36 horas de cultivo. O formato das células pode ser alterado pelo grande acúmulo intracelular PHA's. Com o material celular obtido ao final do cultivo de 42 horas, foi realizada a extração e posterior caracterização dos biopolímeros.

5.4.1. EXTRAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS

A biomassa celular obtida foi submetida à extração através de várias etapas de solubilização do conteúdo celular, onde por fim os PHA's são solubilizados em clorofórmio, conforme descrito na metodologia. Na etapa final de solubilização ocorre a formação de 3 fases distintas, sendo a primeira (de cima) a água, a do meio impurezas e a terceira o clorofórmio. Estas fases podem ser observadas na Figura 28. As etapas de precipitação em etanol e as características do material seco podem ser observadas na Figura 29.

Figura 28 - Visualização das fases formadas durante a extração dos PHAs, antes (A) e ao final da remoção do clorofórmio (B).

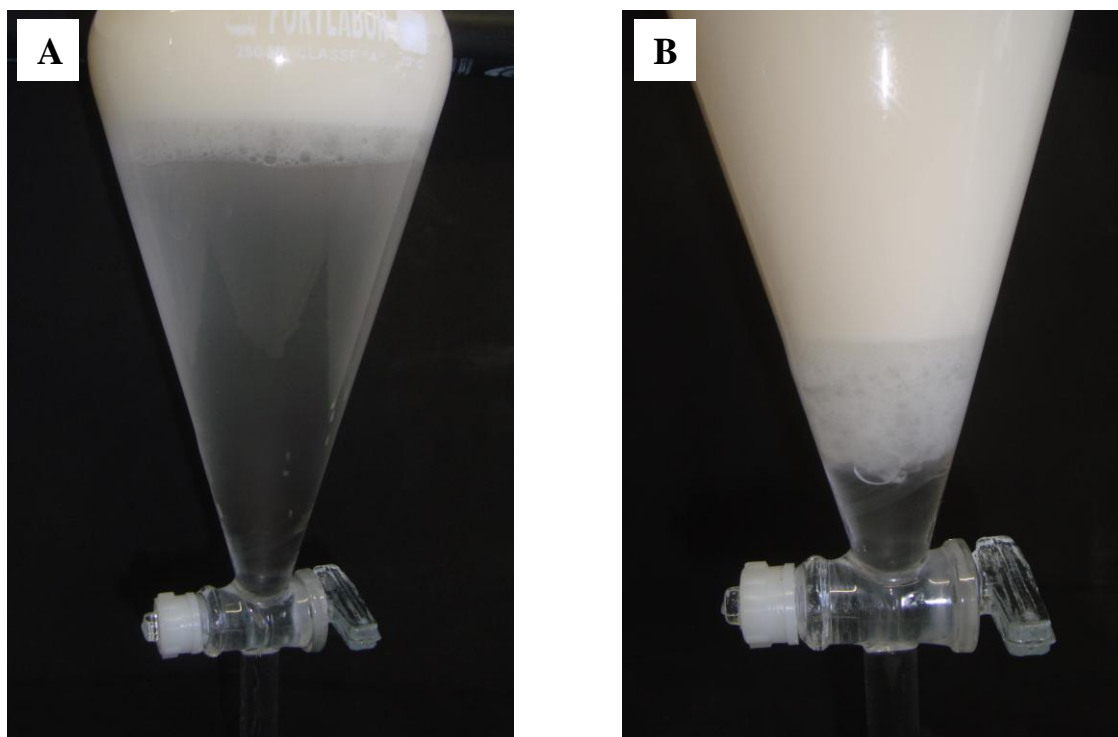
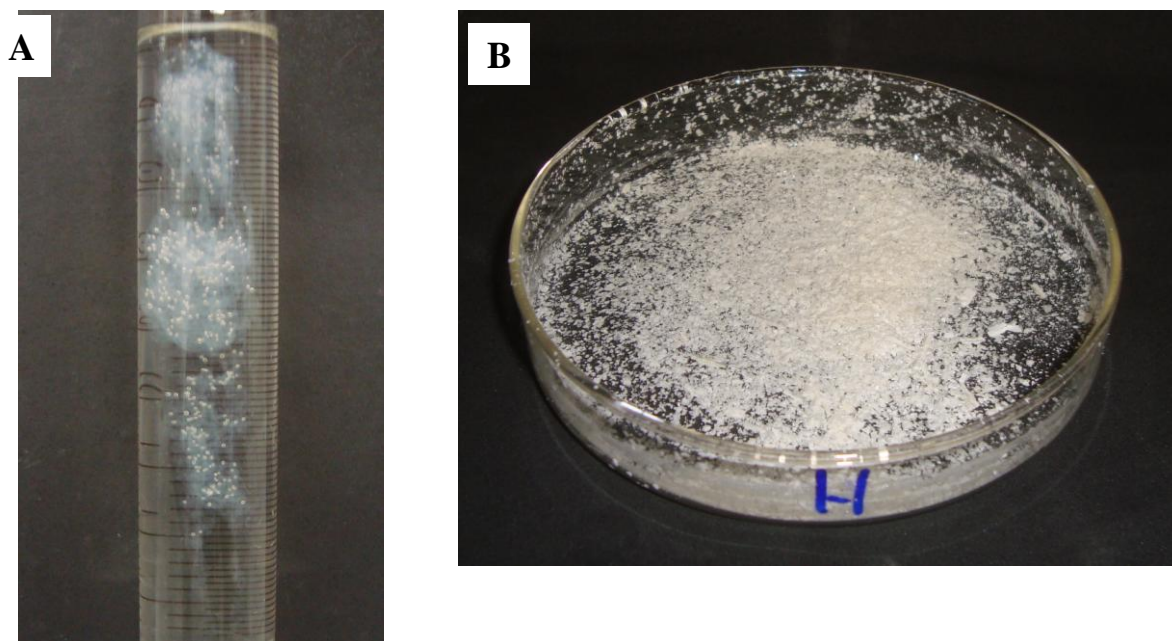


Figura 29 - Visualização das etapas de precipitação dos PHAs em etanol (A) e material obtido após a secagem (B).



5.4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS PHAS

Os dois biopolímeros obtidos, a partir do cultivo com glicose e do cultivo com hidrolisado de pectina, foram caracterizados através da técnica de RMN. Os perfis de RMN foram comparados entre si e com um padrão. Os resultados podem ser observados no ANEXO D – Biopolímero do cultivo com glicose, ANEXO E – Biopolímero do cultivo com hidrolisado de pectina e ANEXO F – Padrão PHB, onde indicam que a estrutura química dos três biopolímeros é a mesma. Como foram comparados a um padrão de PHB, podemos afirmar que ambos os biopolímeros obtidos foram PHB. Desta forma, o uso de uma nova fonte de carbono, o hidrolisado de pectina, para crescimento celular e produção de PHB por *C. necator* pode ser considerado uma alternativa em substituição a glicose, tradicionalmente utilizada em processos industriais.

5.5. DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos no desenvolvimento desse trabalho e outros resultados vinculados ao trabalho que não estão aqui apresentados foram parcialmente publicados na forma de resumos, resumos expandidos, trabalhos completos e artigos em periódicos.

5.5.1. RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

1. LOCATELLI, Gabriel Olivo, FINKLER, Leandro, FLINKER, Christine Lamenha Luma. **Cultivo de *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas putida* utilizando ácido galacturônico como fonte de carbono.** III Simpósio de Inovação em Ciências Biológicas - SICBIO 2010, Recife – PE.
2. LOCATELLI, Gabriel Olivo, FINKLER, Leandro, FLINKER, Christine Lamenha Luma hidrólise de pectina visando crescimento celular de *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas putida*. ENZITEC 2010, Rio de Janeiro – RJ.

5.5.2. RESUMOS EXPANDIDOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

1. LOCATELLI, Gabriel Olivo, SILVA, Gabriella Dias da, FINKLER, Leandro, FLINKER, Christine Lamenha Luma. **Aplicação de planejamento experimental para avaliação da influência da temperatura e concentração de ácido na hidrólise de pectina.** III SICTA - Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2011, Recife – PE.
2. LOCATELLI, Gabriel Olivo, SILVA, Gabriella Dias da, FINKLER, Leandro, FLINKER, Christine Lamenha Luma. **Extração e precipitação de pectina de laranja e maracujá.** III SICTA - Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2011, Recife – PE.

5.5.3. TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

1. LOCATELLI, Gabriel Olivo, SILVA, Gabriella Dias da, FINKLER, Leandro, FLINKER, Christine Lamenha Luma. **Hidrólise Enzimática de Extrato de Cascas de Laranja e Maracujá como Substrato para Crescimento Celular de *Cupriavidus necator***. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul – RS.
2. LOCATELLI, Gabriel Olivo, FINKLER, Leandro, FLINKER, Christine Lamenha Luma. **Otimização das Condições de Hidrólise Enzimática de Pectina para Crescimento Celular de *Cupriavidus necator***. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul – RS.
3. LOCATELLI, Gabriel Olivo, CÂNDIDO, José Hyrlleson Batista, AMORIM, Elidiane Klecia Correia de, FINKLER, Leandro, FLINKER, Christine Lamenha. **Estudo do cultivo de *Cupriavidus necator* em tubos agitados**. I SINORBIO - Simpósio Nordeste de Bioprocessos, 2011, Aracaju - SE.
4. LOCATELLI, Gabriel Olivo, SILVA, Gabriella Dias da, FINKLER, Leandro, FLINKER, Christine Lamenha Luma. **Pectin hydrolysis for cell growth of *Cupriavidus necator* and *Pseudomonas putida***. I SINORBIO - Simpósio Nordeste de Bioprocessos, 2011, Aracaju - SE.

5.5.4. ARTIGO CIENTÍFICO EM PERIÓDICOS

1. LOCATELLI, Gabriel Olivo, SILVA, Gabriella Dias da, FINKLER, Leandro, FLINKER, Christine Lamenha Luma. **Acid Hydrolysis of Pectin for Cell Growth of *Cupriavidus necator***. Biotechnology (Faisalabad. Print), v.1, p.1 - 8, 2011. (Publicado). ANEXO G.

2. LOCATELLI, Gabriel Olivo, SILVA, Gabriella Dias da, FINKLER, Leandro, FLINKER, Christine Lamenha Luma. **Hidrólise ácida e enzimática de pectina para crescimento celular de *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas putida***. Evidência – UNOESC. (Aceito para publicação). ANEXO H.

3. LOCATELLI, Gabriel Olivo, SILVA, Gabriella Dias da, FINKLER, Leandro, FLINKER, Christine Lamenha Luma. **Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of pectin for cell growth of *Cupriavidus necator***. (Enviado para publicação). ANEXO I.

6. CONCLUSÕES

Os micro-organismos utilizados no trabalho (*C. necator* e *P. putida*) apresentaram viabilidade de crescimento em meio mineral contendo ácido galacturônico como única fonte de carbono.

Os métodos de hidrólise ácida e enzimática foram significativamente melhorados através de planejamentos fatoriais. Nos procedimentos empregando 1% de substrato, as condições experimentais otimizadas possibilitaram rendimentos de hidrólise da pectina em CR próximo a 60% pelo método ácido e superiores a 90% pelo método enzimático. Os hidrolisados pécticos obtidos foram satisfatórios para crescimento celular de *C. necator*, enquanto *P. putida* não apresentou crescimento celular, nessas condições.

Pela curva de performance enzimática foi possível aumentar a concentração de substrato para 10% (100 g/L), permitindo obter em média 70 g/L de CR. Os meios formulados com esse hidrolisado permitiram um crescimento celular satisfatório e o acúmulo intracelular de PHAs por *C. necator*. As taxas de conversão de substrato em célula apresentaram-se superiores ao valor teórico sugerido, mas próximo a valores encontrados para óleos vegetais, o que indica ser uma boa fonte de carbono para obtenção de alta concentração celular e produção de PHA.

A caracterização dos biopolímeros obtidos nos cultivos com hidrolisados pécticos indicaram a obtenção do PHB. Desta forma, os hidrolisados pécticos podem ser um potencial substituto da glicose utilizada como fonte de carbono em processos industriais de cultivo para obtenção de PHB. Sendo um substrato disponível em grandes quantidades como subproduto das indústrias de extração de sucos, podem vir a ser uma alternativa de baixo custo para esse processo.

7. REFERENCIAS

ANDERSON, A.J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**, v.54, n.4, 1990.

ANDERSON, A.J.; WYNN, J.P. Microbial polyhydroxyalkanoates, polysaccharides and lipids, em **Basic Biotechnology**. RATLEDGE C. & KRISTIANSEN, B. (eds.), Cambridge University Press, New York, NY, USA, p.325–333, 2001.

ANDRADE, J.R. **Eletrólitos Poliméricos Géis à Base de Pectina**. Dissertação de Mestrado, IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010, 161p.

ANDRÉ-LEROUX, G.; TESSIER, D.; BONNIN, E. Endopolygalacturonases reveal molecular features for processivity pattern and tolerance towards acetylated pectin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1794, p.5-13, 2009.

ARAGÃO, G.M.F.; LINDLEY, N.D.; URIBELARREA, J.L.; PAREILLEUX, A. Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *A. eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v.18, p.937-942, 1996.

ARAI, Y.; SHIKANAI, T.; DOI, Y.; YAMAGUCHI, I.; KAKASHITA, H. Production of polyhydroxybutyrate by polycistronic expression of bacterial genes in tobacco plastid. **Plant Cell Physiol**, v.45, n.9, p.1176-1184, 2004.

ASRAR, J.; HILL, J. C. Biosynthetic processes for linear polymers. **Journal of Applied Polymer Science**, v.83, p.457-483, 2002.

BAEI, M.S.; NAJAFPOUR, G.D.; YOUNESI, H.; TABANDEH, F.; EISAZADEH, H. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis by *Cupriavidus necator* DSMZ 545 utilizing various carbon sources. **World Applied Sciences Journal**, v.7, p.157-161, 2009.

BÉLAFI-BAKÓ, K.; ESZTERLE, M.; KISS, K.; NEMESTÓTHY, N.; GUBCZA, L. Hydrolysis of pectin by *Aspergillus niger* polygalacturonase in a membrane bioreactor. **Journal of Food Engineering**, v.78, p.438-442, 2007.

BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv.**, v.18, p.355-383, 2000.

BIERHALZ, A.C.K. **Confecção e caracterização de biofilmes ativos à base de pectina BTM e de pectina BTM/alginato reticulados com cálcio**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010, 137 p.

BIERMAN, CHRISTOPHER J. Hydrolysis and other cleavages of glycosidic linkages in polysaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v.46, p.251-272, 1988.

BIOCYCLE. História. Disponível em:< <http://www.biocycle.com.br/site.htm>>. Acessado em: 10 set. 2011.

BLAKE J.D.; RICHARDS G.N. Problems of lactonisation of uronic acid derivatives. **Carbohydrate Research**, v.8, p.275-281, 1968.

BLANDINO, A.; DRAVILLAS, K.; CANTERO, D.; PANDIELLA, S.S.; WEBB, C. Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochem.**, v.37, n.5, p.497-503, 2001.

BOCHEK, A.M.; ZABIVALOVA, N.M. & PETROPAVLOVSKIHK, G.A. Determination of the esterification degree of polygalacturonic acid. **Russ. J. Appl. Chem.**, v.74, p.796-799, 2001.

BOHMERT, K.; BALBO, I.; STEINBÜCHEL, A.; TISCHENDORF, G.; WILLMITZER, L. Constitutive Expression of the β -Ketothiolase Gene in Transgenic Plants. A Major Obstacle for Obtaining Polyhydroxybutyrate-Producing Plants. **Plant Physiology**, v.28, p.1282-1290, 2002.

BONATTO, D.; MATIAS, F.; LISBÔA, M.P.; BOGDAWA, H.M.; HENRIQUES, J.A.P. Production of short side chain-poly[hydroxyalkanoate] by a newly isolated *Ralstonia pickettii* strain. **W. Journal Microbiol. Biotechnol.**, v.20, n.4, p.395-403, 2004.

BONNIN, E.; LE GOFF, A.; KÖRNER, R.; VIGOUROUX, J.; ROEPSTORFF, P.; THIBAUT, J.F. Hydrolysis of pectins with different degrees and patterns of methylation by the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1596, p.83-94, 2002.

BRANDÃO, E.M.; ANDRADE, C.T. Influência de Fatores Estruturais no Processo de Gelificação de Pectinas de Alto Grau de Metoxilação. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p.38-44, set. 1999.

BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(3-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. **Advances in biochemical engineering / Biotechnol**, v.41, p.77-93 1990.

BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, **Produção Agrícola Municipal**, v.36, 31p., 2009.

BYROM, D. Industrial production of copolymers from *Alcaligenes eutrophus*, em: **Novel Biodegradable Microbial Polymers**. DAWES E.A. (ed.), Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p.113-117, 1990.

BYROM, D. Production of poly- β -hydroxybutyrate: poly- β -hydroxyvalerate copolymers. **FEMS Microbiology Reviews**, v.103, p.247-250, 1992.

BYROM, D. Polyhydroxyalkanoates. Em: MOBLEY, D.P. (ed) **Plastic from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors**. Hanser Munich, p.5-33, 1994.

CAVACO-PAULO, Artur. Minicurso: Estabilização de Enzimas para Aplicação Industrial. **UNICAP – Universidade Católica de Pernambuco**, setembro de 2011.

CAVALEIRO, J.M.B.T.; ALMEIDA, M.C.M.D.; GRANDFILS, C.; FONSECA, M.M.R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol, **Proc. Biochem.**, v.44, n.5, p.509-515, 2009.

CHIA, K.H.; OOI, T.F.; SAIKA, A.; TSUGE, T.; SUDESH, K. Biosynthesis and characterization of novel polyhydroxyalkanoate polymers with high elastic property by *Cupriavidus necator* PHB 4 transformant. **Pol. Degrad. Stability**, v.95, n.12, p.2226-2232, 2010.

CHOI, H.J.; KIM, J.; JHON, M.S. Viscoelastic characterization of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **Polymer**, v.40, n.14, p.4135-4138, 1999.

CHOI, J.; LEE, S.Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.51, p.13-21, 1999.

DALCANTON, F.; IENCZAK, J.L.; FIORESE, M.L.; ARAGÃO, G.M.F. Produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* em meio hidrolisado de amido de arroz com suplementação de óleo de soja em diferentes temperaturas. **Química Nova**, v.33, p.552-556, 2010.

DARROS-BARBOSA, R.; CURTOLO, J.E. Produção industrial de suco e subprodutos cítricos. Em: MATTOS, D.Jr.; De NEGRI, J.D.; Pio, R.M.; Pompeu, J.Jr. (Eds). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005, 929p.

DAWES, E.A.; SENIOR, P.J. The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms. **Adv. Microbial Physiol.**, v.10, p.135-266, 1973.

DE RUITER, G.A.; SCHOLS, H.A.; VORAGEN, A.G.J; ROMBOUTS, F.M. Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods. **Analytical Biochemistry**, v.207, p.176-185, 1992.

DOI, Y.; SEGAWA, A.; KAWAGUCHI, Y.; KUNIOKA, M. Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.67, p.165-170, 1990.

DOI, Y.; KAWAGUCHI, Y.; KOYAMA, N.; NAKAMURA, S.; HIRAMITSU, M.; YOSHIDA, Y.; KIMURA, U. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.103, p.103-108, 1992.

DOI, Y.; KITAMURA, S.; ABE, H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Macromolecules**, v.28, p.4822-4828, 1995.

EGGINK, G.; VAN DER WAL, H.; HUIJBERTS, G.N.M. Oleic acid as a substrate for poly-3-hydroxybutyrate formation in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas putida*. **Industrial Crops and Products**, v.1, p157-163, 1993.

FARIAS, D. **Produção e caracterização de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Cupriavidus necator* em melaço cítrico**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009, 197p.

FERTONANI, H.C.R. **Estabelecimento de um modelo de extração ácida de pectina de bagaço de maçã**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006, 82p.

FINKLER L. **Utilização do potencial de óxido-redução para o monitoramento de culturas de *Ralstonia eutropha* visando à produção de polihidroxibutirato**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002, 97p.

FINKLER, L. **Produção de Polihidroxialcanoatos por *Cupriavidus necator* usando ácido acrílico como fonte de carbono**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006, 153p.

FORMOLO, M.C.; DUARTE, M.A.T.; SCHNEIDER, A.L.; FURLAN, S.A.; PEZZIN, A.P.T. Polihidroxialcanoatos: biopoliésteres produzidos a partir de fontes renováveis. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v.4, n.2, p.14-21, 2003.

FORSTER, H. Pectinesterase from *Phytophthora infestans*. **Methods Enzymol**, v.161, p.355-357, 1988.

GAINVORS, A.; FRÉZIER, V.; LEMARESQUIER, H.; LEQUART, C.; AIGLE, M.; BELARBI, A. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**, v.10, p.1311-1319, 1994.

GARCIA, B.; OLIVERA, E.R.; MIÑAMBRES, B.; FERNÁNDEZ-V. M.; CAÑEDO, L.M.; PRIETO, M.A.; GARCÍA, J.L.; MARTÍNEZ, M.; LUENGO, J.M. Novel biodegradable aromatic plastic from a bacterial source - Genetic and biochemical studies from a route of the phenylacetyl-CoA catabolon. **Journal Biol. Chemical**, v.274, n.41, p.29228-29241, 1999.

GARNA, H.; MABON, N.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. New method for a two step hydrolysis and chromatographic analysis of pectin neutral sugar chains. **J Agric Food Chem**, v.52, p.4652-4659, 2004.

GARNA, H.; MABON, N.; NOTT, K.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. **Food Chemistry**, v.96 p.477-484, 2006.

GLAZER A.N.; NIKAIDO, H. **Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology**, 2^a Edição. New York: Cambridge University Press, 2007, 577p.

GOMES, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. - Produção de Plásticos Biodegradáveis por Bactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, 17, p. 24-29, 1997.

HAAGENSEN, Frank Driescher. Enzyme performance and hydrolysis cost. **Novozymes, Rethink Tomorrow**, 2009. Disponível em: <http://blog.bioenergy.novozymes.com/?p=22>. Acessado em: 06 de janeiro de 2012.

HAFUKA, A.; SAKAIDA, K.; SATOH, H.; TAKAHASHI, M.; WATANABE, Y.; OKABE, S. Effect of feeding regimens on polyhydroxybutyrate production from food wastes by *Cupriavidus necator*. **Biores. Technol.**, v.102, n.3, p.3551-3553, 2010.

HARTMANN, R.; HANY, R.; PLETSCHER, E.; RITTER, A.; WITHOLT, B.; ZINN, M. Tailor-made olefinic medium-chain-length poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] by *Pseudomonas putida* GPo1: batch versus chemostat production. **Biotechnol Bioeng**, v.93, p.737–746, 2006.

HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A. J.; CHU, L.; DAWES, E. A. The role of NAD- and NADPHlinked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.52, p.259-264, 1988.

HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoates synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.57, p.1-6, 1989.

IWASAKI, K.; INOUE, M.; MATSUBARA, Y. Continuous hydrolysis of pectate by immobilized endo-polygalacturonase in a continuously stirred tank reactor. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.62, n.2, p. 262-267, 1998.

JÖRNEADING, H.J., BACIO, I.E., BERENSMEYER, S., BUCHHOLZ, K. Gewinnung von galacturonsäure aus zellwandbestandteilen der rübenschnitzel. **Zuckerind**, v.127, p.845-853, 2002.

JANZOWSKI, C.; GLAAB, V.; SAMIMI, E.; SCHLATTER, J.; EISENBRAND, G. 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. **Food Chem Toxicol**, v.38, p.801-809, 2000.

KASHYAP, D.R.; CHANDRA, S.; KAUL, A.; TEWARI, R. Production, purification and characterization of pectinase from *Bacillus sp.* DT7. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.16, n.3, p.277-282, 2000.

KESSLER, B.; WITHOLT, B. Poly(3-hydroxyalkanoates). Em: FLICKINGER, M.C.; DREW, S.W. (eds). **Encyclopedia of bioprocess technology – fermentation, biocatalysis and bioseparation**. Wiley: New York, p. 2024-2040, 1999.

KIM, B.S., LEE, S.C., LEE, S.Y., CHANG, H.N., CHANG, Y.K., WOO, S.I. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. **Biotechnol. Bioeng.**, v.43, p.892-898, 1994.

KIM, B.S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.27, p.774-777, 2000.

KIM, Y.; TENG, Q.; WICKER, L. Action pattern of Valencia orange PME de-esterification of high methoxyl pectins and characterization of modified pectins. **Carbohydrate Research**. Amsterdam, v.340, n.17, p.2620-2629, 2005.

KISS, K., CSERJÉSI, P., NEMESTÓTHY, N., GUBICZA, L., BÉLAFI-BAKÓ, K. Kinetic study on hydrolysis of various pectins by *Aspergillus niger* polygalacturonase. **Hung. J. Ind. Chem.**, v.36, p.55-58, 2008.

KRALL, S.M.; McFEETERS R.F. Pectin hydrolysis: effect of temperature, degree of methylation, pH and calcium on hydrolysis rates. **Journal Agric Food Chem.**, v.46, p.1311-1315, 1998.

LAFFERTY, R.M.; KORSATKO, B.; KORSATKO, W. Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid. **Biotechnol Weinheim**, v.6, n.66, p135-176, 1988.

LAI, S.M.; DON, T.M.; HUANG, Y.C. Preparation and properties of biodegradable thermoplastic starch/poly (hydroxybutyrate) blends. **Journal Applied Polymer Science**, v.100, p.2371-2379, 2005.

LEITÃO, M.C.A.; ALARCÃO SILVA, M.L.; JANUÁRIO, M.I.N.; AZINHEIRA, H.G. Galacturonic acid in pectic substances of sunflower head residues: quantitative determination by HPLC. **Carbohydrate Polymers**, v.26, p.165-169, 1995.

LOPES, M.S.G. **Produção de plásticos biodegradáveis utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. Tese de Doutorado - USP, São Paulo, 2010, 128p.

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

MAKKAR, N.S.; CASIDA, J.R. *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a Nonobligate Bacterial Predator of Bacteria in Soil. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, n.4, p.323-326, 1987.

MARANGONI, C.; FURIGO, J.R.A.; ARAGÃO G.M.F. The influence of substrate source on the growth of *Ralstonia eutropha*, aiming at the production of polyhydroxyalkanoates. **Brazilian J Chem Engineering**, v.18, p.175-180, 2001.

MAY, C.D. Pectins. Em: PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. (eds). **Handbook of hydrocolloids**, 1^o Edição, CRC Press LLC, New York, p.169-188, 2000.

MEDINA, J.C.; JENSEN, G.O.; NERI, J.P. Composição química da casca de ramí em diversas fases do seu desenvolvimento. **Bragantia – Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas Instituto Agrônomo**, v.2 p.433-447, 1942.

MICHIZOE, J.; GOTO, M.; FURUSAKI, S. Catalytic activity of laccase hosted in reversed micelles. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.92, n.1, p.67-71, 2001.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.24, n.1, p.094-100, 2004.

NOVOSEL'SKAYA, I.L.; VOROPAEVA, N.L.; SEMENOVA, L.N.; RASHIDOVA, S.S. Trends in the science and applications of pectins. **Chemistry of Natural Compounds**, v.36 p.1-10, 2000.

O GLOBO. **Um mundo embrulhado**: Plástico forma ilhas de poluição nos oceanos. Por: Cesar Baima. Publicada em 24/08/2010. Disponível em: <<http://oglobo.globo.com/ciencia/mat/2010/08/23/plastico-forma-ilhas-de-poluicao-nos-oceanos-917454689.asp>>. Acessado em: 17, set. 2011.

OBRUCA, S.; MAROVA, I.; SNAJDAR, O.; MRAVCOVA, L.; SVOBODA, Z. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. **Biotechnology Letters**, v.32, p.1925-1932, 2010.

OJUMU, T.V.; YU, J.; SOLOMON, B.O. Minireview_Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. **African Journal of Biotechnology**. v.3, n.1, p.18-24, 2004.

OLIVEIRA, F.C.; FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by solid-state fermentation with *Ralstonia eutropha*. **Biotechnol Letter**, v.26, n.24, p.1851-1855, 2004.

OLIVEIRA, F.C.; DIAS, M.L.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v.98, n.3, p.633-638, 2007.

PAIVA, E.P.; LIMA, M.S.; PAIXÃO, J.A. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana de Polímero**, v.10, n.4, p.196-211, 2009.

PELLICANO, M.; PACHEKOSKI, W.; AGNELLI, J.A.M. Influência da adição de amido de mandioca na biodegradação da blenda polimérica PHBV/Ecoflex®. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.19, n.3, p.212-217, 2009.

PINTO, G.A.S.; BRITO, E.S.; SILVA, F.L.H.; SANTOS, S.F.M.; MACEDO, G.R. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Rev. Quím. Ind.**, v.74, p.17-20, 2006.

POIRIER, Y.; NAWRATH, C.; SOMERVILLE, C. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastic and elastomers, in bacteria and plants. **Nature Biotechnology**, v.13, p.142-150, 1995.

POLI, A.; DONATO, P.D.; ABBAMONDI, G.R.; NICOLAUS, B. Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea. **Hindawi Publishing Corporation, Archaea**, v. 2011, 13 p., 2011.

PÖTTER, M.; MADKOUR, M.; MAYER, F.; STEINBÜCHEL, A. Regulation of phasing expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H 16. **Microbiology**, v.148, p.2413-2426, 2002.

POVOLO, S.; TOFFANO, P.; BASAGLIA, M.; CASELLA, S. Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. **Bioresource Technology**, v. 101, p.7902-7907, 2010.

PRADELLA, J.G.C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos Ciência, Tecnologia e Inovação. Relatório Técnico nº 84 396-205, 2006, 119p.

QUILLAGUAMÁN, J.; GUZMÁN, H.; VAN-THUOC, D.; HATTI-KAUL, R. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.85, n.6, p.1687-1696, 2010.

RAMSAY, B.A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBE, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J.A. Production of poly-(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, p.2093-2098, 1990.

RAMSAY, B.A. Physiological factor affecting PHA production. Physiology, kinetics, production and use of biopolymers. **Proceedings**, Austria, p.9-17, 1994.

RAMSAY, J.A.; BERGER, E.; VOYER, R.; CHAVARIE, C.; RAMSAY, B.A. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. **Biotechnology Techniques**. v.8, p.589-594, 1994.

RAMSAY, J.; RAMSAY, B. Polyhydroxyalkanoates, separation, purification, and manufacturing methods. Em: FLICKINGER, M.C.; DREW, S.W. (eds). **Encyclopedia of bioprocess technology – fermentation, biocatalysis and bioseparation**. Wiley: New York, p. 2041-2048, 1999.

RAO, U.; SRIDHAR, R.; SEHGAL, P.K. Biosynthesis and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* from spent palm oil. **Biochem. Eng. J.**, v.49, n.1, p.13-20, 2010.

RATLEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. **Basic Biotechnology**. 2^a edição. Cambridge: Cambridge University Press (UK), 2001.

RÉ, M.I.; RODRIGUES, M.F.A. Polímeros biodegradáveis. Em: DURÁN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber Editora, cap.8, p.149-160, 2006.

REHM, B.H.A.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **International Journal Biological Macromolecules**, v.25, p.3-19, 1999.

REHM, B. H. Polyester synthases: natural catalyst for plastics. **Journal of Biochemical**, set. 2003, 58p. Disponível em: <http://www.biochemj.org/bj/imps_x/pdf/BJ20031254.pdf>. Acessado em 26, set. 2011.

REPASKE, R.; REPASKE, A.C. Quantitative requirements for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus*. **Appl Environ Microbiol**, v.32, p.585-591, 1976.

RIDLEY, B.L.; O'NEILL, M.A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v.57, p.929-967, 2001.

RIVAS, B.; TORRADO, A.; TORRE, P.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J.M. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. **Journal Agric Food Chem.**, v.56, p.2380-2387, 2008.

RODRIGUES, Alexandre D. **Estudo da Produção de Polihidroxibutirato por *Cupriavidus necator* em Fermentação no Estado Sólido**. Tese de Mestrado, COPPE/Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005, 99p.

ROMBOUTS, F.M.; PILNIK, W. Em: ROSE, A.H. (ed.) **Microbial Enzymes and Bioconversions**. London: Academic Press, p.227, 1980.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Adv. Appl. Microbiol.**, v.39, p.213-294, 1993.

SANTOS, S.F.M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**, Tese Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 132p., 2007.

SHEEHAN H.L; STOREY, G.W. An improved method of staining leukocyte granules with Sudan Black. **B. J Pathol Bacteriol**, v.59, p336, 1947.

SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C.; ROCHA, R.C.S.; TACIRO, M.K.; PRADELLA, J.G.C. Revisão - Produção Biotecnológica de Poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v.30, n.7, p.1732-1743, 2007.

SILVA, M.A.; BIERHALZ, A.C.K.; KIECKBUSCH, T.G. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: Effect of the plasticizer concentration. **Carbohydrate Polymers**, v.77, p.736-742, 2009.

SIM, S.J; SNELL, K.D.; HOGAN, S.A.; STUBBE, J.; RHA, C. SINSKEY, A.J. PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo. **Nat Biotechnol**, v.15, p.63-67, 1997.

SLEPECKY, R.A.; LAW, J.H. **Synthesis and Degradation of Poly- β -Hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium***. Harvard University, Cambridge, Massachusetts, v.82, p.37-42, 1960.

SMIDSROD, O.; HAUG, A.; LARSEN, B. The influence of pH on the rate of hydrolysis of acidic polysaccharides. **Acta Chem Scand**, v.20, p.1026-1034, 1966.

SONGPIM, M.; VAITHANOMSAT, P.; CHUNTRANULUCK, S. Optimization of pectate lyase production from *Paenibacillus polymyxa* N10 using response surface methodology. **The Open Biology Journal**, v.3, p.1-7, 2010.

STEINBÜCHEL, A; SCHLEGEL, H.G. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.31, p.168-175, 1989.

STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. Em: BYROM, D. (ed) **Biomaterials**: novel materials from biological sources. Stockton, New York, p.124-213, 1991.

STEINBÜCHEL, A.; HUSTEDE, E.; LIEBERGESELL, M.; PIEPER, U.; TIMM, A.; VALENTIN, H. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acid in bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.103, p.217-230, 1992.

STEINBUCHER, A. & VALENTIN, H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiology Letters**, v.128, n.3, p.219-228, 1995.

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

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v.25, n.10, p.1503-1555, 2000.

SZENGYEL, Z. & ZACCHI, G. Effect of acetic acid and furfural on cellulose production of *Trichoderma reesei* RUT C30. **Appl Biochem Biotechnol**, v.89, p.31-42, 2000.

TAHERZADEH, M. J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.87, p.169-174, 1999.

TAHERZADEH, M.J. & KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A Review. **BioResources**, v.2, n.4, p.707-738, 2007.

THIBAULT, J.F.; RENARD, C.M.G.C.; AXELOS, M.A.V.; ROGER, P.; CRÉPEAU, M.J. Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.238, p.271-286, 1993.

TOBIN, K.M.; O'CONNOR, K.E. Polyhydroxyalkanoate accumulating diversity of *Pseudomonas* species utilising aromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiology Letters**, v.253, n.1, p.111-118, 2005.

TSUGE, T.; TANAKA, K.; SHIMODA, M.; *et al.* Optimization of L-lactic acid feeding for the production of poly- β -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in fed batch culture. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.88, p.404-409, 1999.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: Aplicações Industriais E Perspectivas. **Quim. Nova**, v.30, n.2, p.388-397, 2007.

VAN DER WALLE, G.A.M.; BUISMAN, G.J.H.; WEUSTHUIS, R.A.; EGGINK, G. Development of environmentally friendly coatings paints using medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) as polymer binder. **International Journal Biological Macromolecules**, v.25, n.1, p.123-128, 1999.

VANDAMME, P. & COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.2285-2289, 2004.

VANEECHOUTTE, M.; KÄMPFER, P.; De BAERE, T.; FALSEN, E.; VERSCHRAEGEN, G. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.317-327, 2004.

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

WARD, P.G.; O'CONNOR, K.E. Bacterial synthesis of polyhydroxyalkanoates containing aromatic and aliphatic monomers by *Pseudomonas putida* CA-3. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.35, p.127-133, 2005.

WASCHECK, R.C. Pectina: um carboidrato complexo e suas aplicações. **Estudos**, Goiânia, v.35, n.03, p.343-355, 2008.

WEI, Y.H.; CHEN, W.C.; HUANG, C.K.; WU, H.S.; SUN, Y.M.; LO C.W.; JANARTHANAN, O.M. Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. **Inter J Mol Scien** v.12, p.252-265, 2011.

WENZEL, G.E. **Bioquímica experimental dos alimentos**. Rio Grande do Sul: Ed. Unisinos, 2001.

WHITAKER, J.R. Microbial pectinolytic enzymes. Em: FOGARTY, W.M.; KELLY, C.T. (eds). **Microbial enzymes and biotechnology**, 2^a edição. London: Elsevier Science Ltd., p.133-176, 1990.

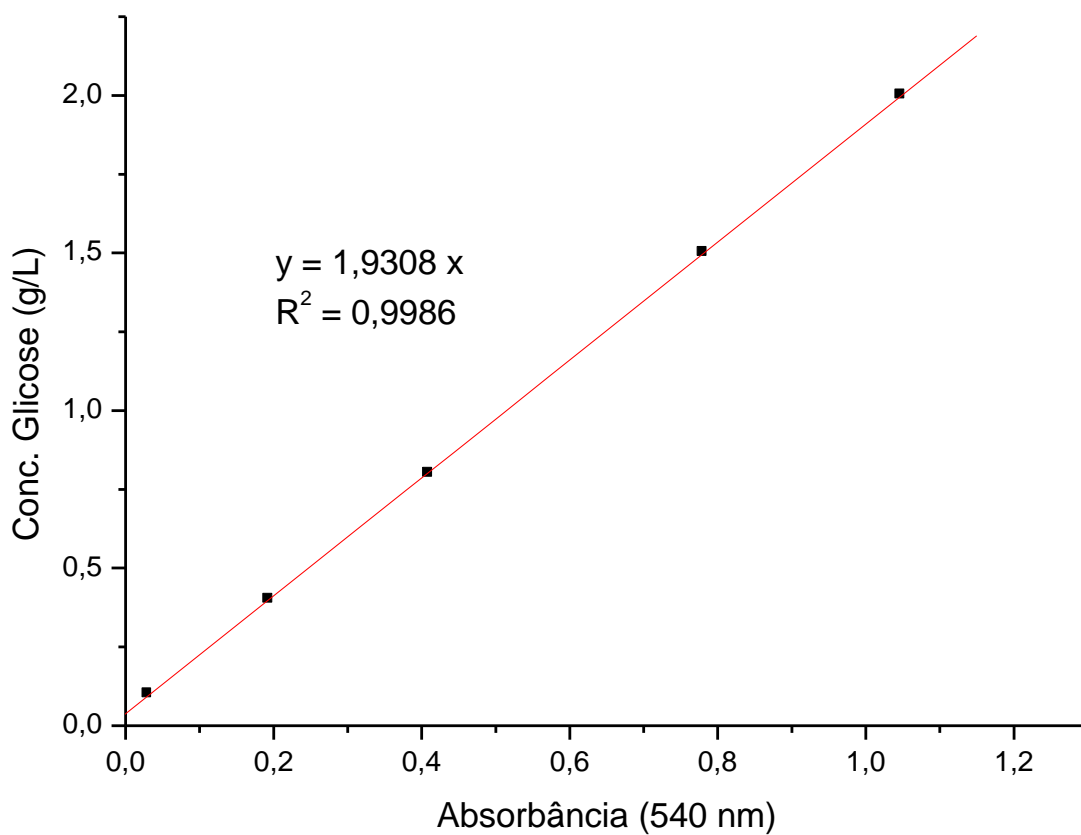
YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to Ralstonia gen. nov.: proposal of Ralstonia pickettii (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., Ralstonia solanacearum (Smith 1896) comb. nov. and Ralstonia eutropha (Davis 1969) comb. nov. **Microbiol Immunol**, v. 39, n.11, p.897-904, 1995.

YAPO, B.N.; ROBERT, C.; ETIENNE, I.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. **Food Chemistry**, v.100, p.1356-1364, 2006.

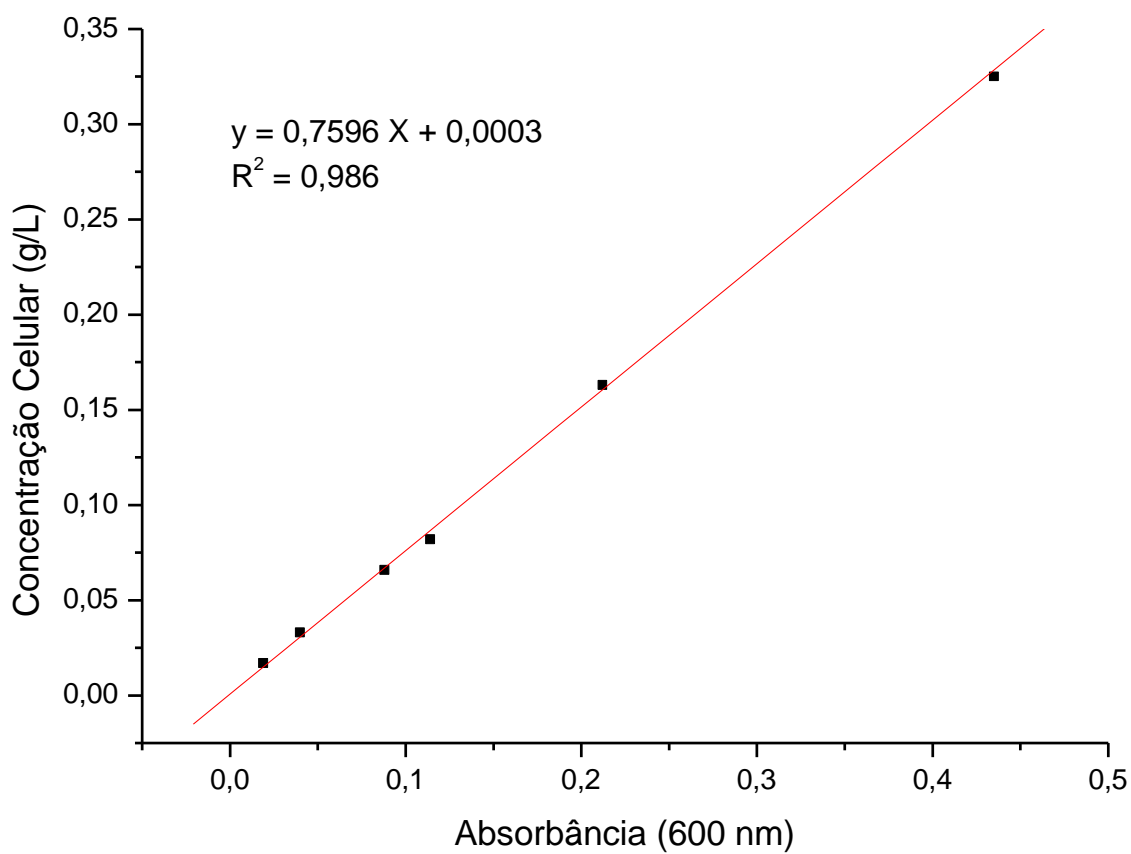
ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGMAR, L.; Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnol Bioeng**, v.65, p.24-33, 1999.

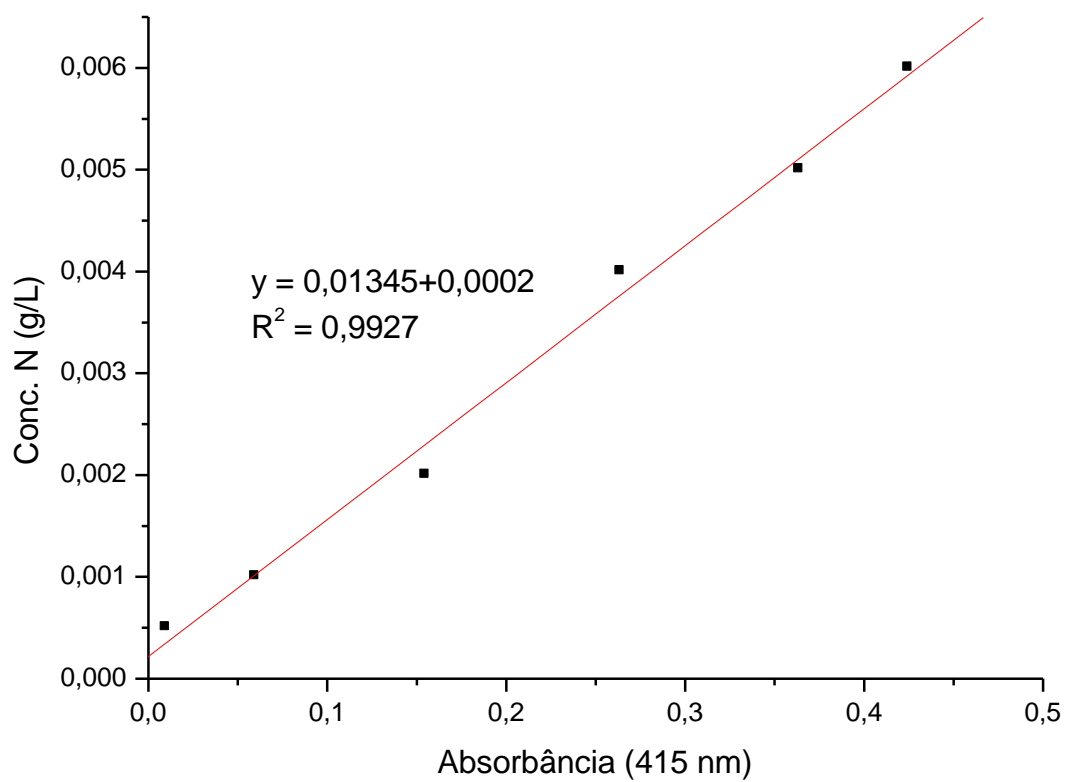
ZHU, G.; WANG, F.; LIU, Y. Effects of reaction conditions on the grafting percentage of poly(ethylene glycol)-*block*-poly(γ -benzyl L-glutamate)-*graft*-poly(ethylene glycol) copolymer. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.21, n.4, p.715-720, 2010.

ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.53, n.1, p.5-21, 2001.

ANEXO A – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CR, EXPRESSO EM GLICOSE

**ANEXO B – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO CELULAR,
PARA *C. NECATOR*.**



ANEXO C – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE NITROGÊNIO.

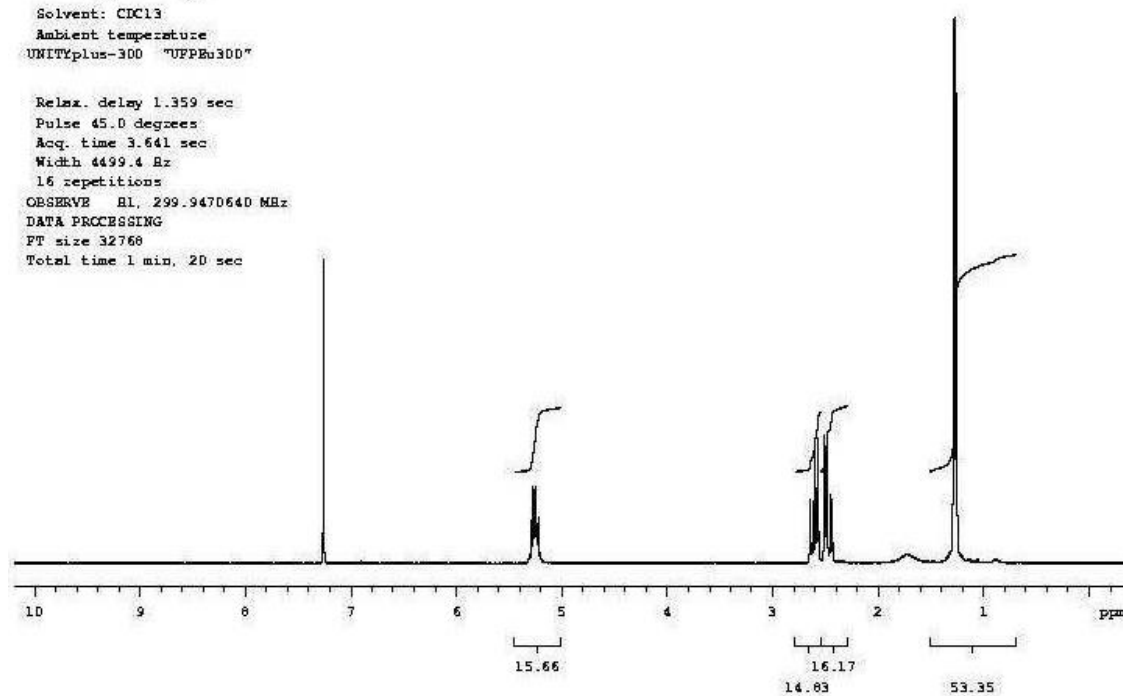
ANEXO D – PERFIL DE RMN PARA O BIOPOLÍMERO OBTIDO NO CULTIVO COM GLICOSE

Leandro Finkler
Amostra PBB
Solicitação N.JL219-7A
12.01.12_UFPE

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl₃
Ambient temperature
UNITYplus-300 "UPPEu300"

Relax. delay 1.359 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.641 sec
Width 4499.4 Hz
16 repetitions
OBSERVE B1, 299.9470640 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 min, 20 sec

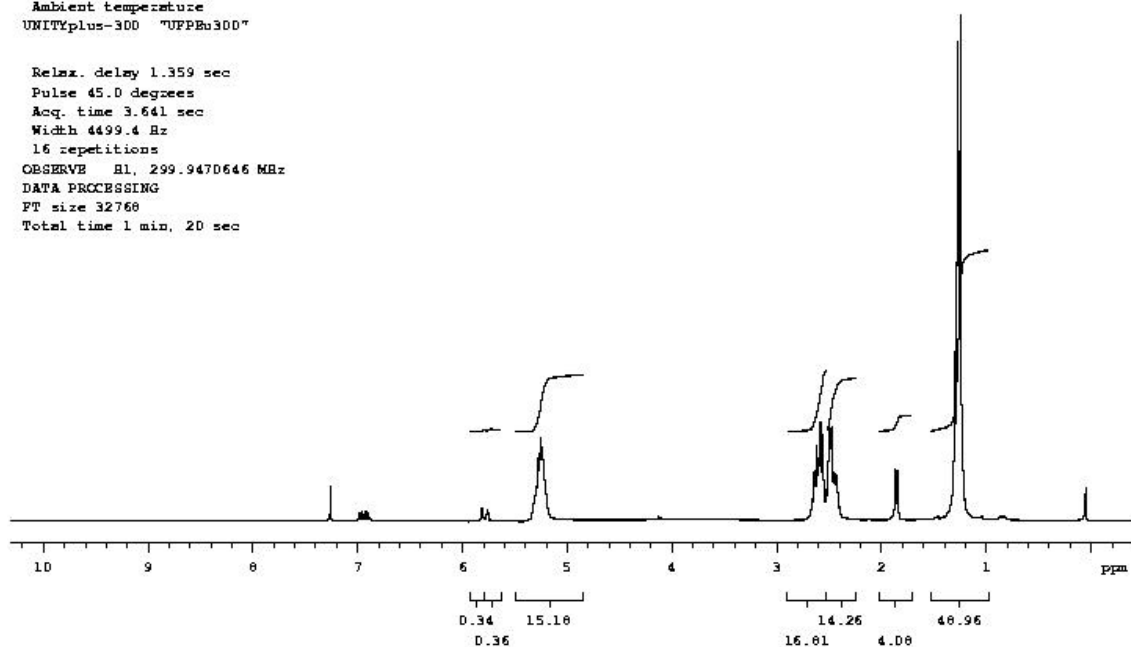


ANEXO E – PERFIL DE RMN PARA O BIOPOLÍMERO OBTIDO NO CULTIVO COM HIDROLISADO DE PECTINA

Leandro Finkler
Amostra PBA Glicose
Solicitação N.JL219_7
11.01.12_UFPE

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
UNITYplus-300 "UPPBu300"

Relax. delay 1.359 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.641 sec
Width 4499.4 Hz
16 repetitions
OBSERVE B1, 299.9470646 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 min, 20 sec

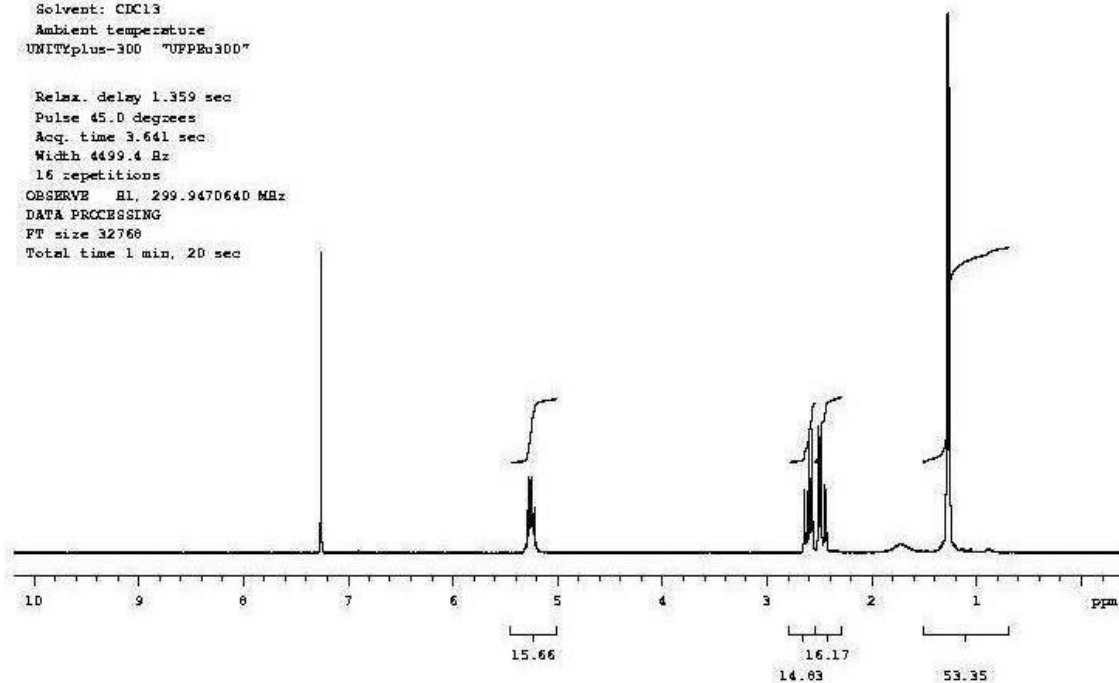


ANEXO F – PERFIL DE RMN DO PADRÃO PHB

Leandro Finkler
Amostra PHB
Solicitação N.JL219-7A
12.01.12_UFPE

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl₃
Ambient temperature
UNITYplus-300 "UPPEu300"

Relax. delay 1.359 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.641 sec
Width 4499.4 Hz
16 repetitions
OBSERVE R1, 299.9470640 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 min, 20 sec



ANEXO G – TRABALHO PUBLICADO NA REVISTA BIOTECHNOLOGY.

Biotechnology 11 (1): 29-36, 2012
 ISSN 1682-296X / DOI: 10.3923/biotech.2012.29.36
 © 2012 Asian Network for Scientific Information

Acid Hydrolysis of Pectin for Cell Growth of *Cupriavidus necator*

¹Gabriel Locatelli, ²Gabriella Dias da Silva, ²Leandro Finkler and ^{1,2}Christine Lamenha Luna Finkler

¹Departamento de Antibioticos, Programa de Pos-Graduacao em Biotecnologia Industrial,
 Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, s/n,
 Cidade Universitaria, Recife, PE, 50670-901, Brasil

²Centro Academico de Vitoria, Universidade Federal de Pernambuco,
 Rua Alto do Reservatorio, s/n, Bela Vista, Vitoria de Santo Antao, PE, 55608-680, Brasil

Abstract: The effect of acid concentration (1-7%, v/v) and temperature (70-100°C) on the pectin hydrolysis was studied using pectin at 1% (w/v) for 4 h hydrolysis. Experiments were arranged according to a central composite statistical design and Response Surface Methodology (RSM) was used to assess factor interactions and empirical models on response variable (reducing groups concentration - RGC). The highest RGC (6.5 g L⁻¹) was achieved at 100°C and 1% (v/v) H₂SO₄. Kinetics of RGC release was also performed and hydrolysate was used as carbon source for cell growth of *Cupriavidus necator*. The maximum specific growth rate and the substrate-to-cell conversion factor were 0.26 h⁻¹ and 0.55 g g⁻¹, respectively an indicative of that pectin hydrolysate is a potential substrate for cell growth of this microorganism.

Key words: Pectin, *Cupriavidus necator*, acid hydrolysis, experimental design, reducing group concentration

INTRODUCTION

Cupriavidus necator (formerly known as *Ralstonia eutropha* or *Alcaligenes eutrophus*) was originally developed as a source of Single Cell Protein (SCP) in the 1970's (Reinecke and Steinbuchel, 2009) for animal feeding and also for humans. Actually, it is the microorganism that has been most extensively studied for fermentative production of polyhydroxyalkanoates (PHAs).

These biopolymers are polyesters of carboxylic acids, synthesized as intracellular compounds and energy storage materials for more than a hundred species of microorganisms (Lai *et al.*, 2005). Accumulation of PHA by *C. necator* can be as high as 80% of its cell dry weight, using different sources of substrate such as glucose, fructose, vegetable oils and oils waste frying (Obruca *et al.*, 2010), among other sources.

PHAs commercial applications have been limited by their high price, making them more expensive than synthetic plastics (Poirier *et al.*, 1995). High costs of raw material used as a carbon source (Kim, 2000) can represent about 40% of total cost of production and use of agro-industrial residues as cheap carbon sources is an alternative in order to reduce the production cost of biopolymers.

Development of intensive production methods for citrus crops, its high availability and high quantity of material processed from juice production has attracted the

attention to the problems of this agroindustrial waste management. Orange peel present a great potential to be used as substrate for the growth of many microorganisms for obtaining products of high added value (Rivas *et al.*, 2008).

Pectins are structural polysaccharides found in different amounts and compositions (May, 2000) and consisting mainly of galacturonic acid and neutral sugars such as rhamnose, galactose, arabinose and xylose (Yapo *et al.*, 2007). Several treatments have been proposed for the hydrolysis of pectic substances, including acids and enzymatic methods (Garna *et al.*, 2006). Pectin hydrolysis products have several biotechnological applications in agriculture, medicine (Bedouet *et al.*, 2005), food industry and can be used as substrates for fermentation purposes. Additionally, further research is required to understand mechanisms of pectin hydrolysis.

There are no reports in the literature using pectin or pectin hydrolysate as carbon source for cell growth of *C. necator* aiming PHAs production. The purpose of present investigation was to evaluate the acid hydrolysis of commercial pectin, using experimental design and Response Surface Methodology (RSM) in study of variables that play a very significant role in enhancing the acid hydrolysis of pectin, such as acid concentration and temperature. Pectin hydrolysate was used as substrate for cell growth in a submerged culture of *C. necator*.

Corresponding Author: Gabriel Locatelli, Departamento de Antibioticos, Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pos-Graduacao em Biotecnologia Industrial, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitaria, Recife, PE, 50670-901, Brasil

MATERIALS AND METHODS

Pectin: Commercial citric pectin was supplied by Vetec®. Pectin esterification degree was determined according to Bocek *et al.* (2001). Tests were carried out in triplicate.

Acid hydrolysis: Hydrolysis reactions were performed using 5 g pectin and 500 mL H₂SO₄ (1% w/v) in system reflux using a rotaevaporator (Marconi®), at a reaction time of 4 h. Nine experiments were conducted using a central composite statistical design (2²) for the study of linear and interaction effects of the two factors (acid concentration and temperature) on dependent variable (reducing groups concentration-RGC). Experiments were performed randomly and centre values for factors were repeated in five experiments for error estimation. Levels of the factors studied and experimental conditions are shown in Table 1.

Software Statistica 7.0 (Statsoft®) was used to fit the first-order model to the independent variables at a confidence level of 95% and to determine the region to maximize the reducing groups concentration. Selected condition was repeated in triplicate and the hydrolysis kinetics was monitored by taking samples at defined time. Samples were immediately neutralized using NaOH 50% (w/v), cooled in ice bath and diluted for RGC and sugars and galacturonic acid analysis by HPLC. Further, hydrolysate suspension was used as carbon source for cell growth of *C. necator*.

Microorganism and culture maintenance: *C. necator* was obtained from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) and maintained in the culture collection of the Antibiotics Department of the Federal University of Pernambuco, Brazil (*C. necator* UFPEDA 0604).

Culture media: Nutrient Broth (NB) medium was used for inoculum development. In second step, Mineral Medium (MM), based on work by Ramsay *et al.* (1990), modified by Aragao *et al.* (1996), was used for cellular growth. Carbon sources tested were galacturonic acid at 1.5% (w/v) and acid hydrolysate.

Culture conditions: Inoculum was prepared from transferring one slant into NB medium and the microorganism was grown at 300 rpm, 30°C for 24 h. Samples were taken to determine pH and cell optical density at 600 nm. When microorganism reached the exponential growth phase (10 h cultivation), culture was transferred into 250 mL Erlenmeyer flasks using 47.5 mL MM medium containing acid hydrolysate or galacturonic acid at 1.5% (w/v). Inoculum size was 5% (v/v) and flasks were incubated at same conditions. Samples were taken to determine cell optical density, RGC and pH.

Analytical methods: Cell dry weight was assessed by spectrophotometry at 600 nm, based on standard calibration curve for cell optical density as a function of cell dry weight. pH was monitored by potentiometry and RGC was accomplished in the cell-free filtrate by the 3, 5 dinitrosalicylic acid method according to Miller (1959), using glucose as reference for the preparation of the calibration curve.

Sugars and galacturonic acid concentrations were determined by HPLC (Varian) equipped with refractive index detector. It was used a column for organic acids (Aminex HPX-87H, 300×780 mm, Bio Rad), at 65°C, mobile phase an aqueous solution of H₂SO₄ 8.0 mM and flow rate of 0.6 mL min⁻¹. Standard solutions of galacturonic acid, glucose, fructose, galactose, xilose and arabinose (Sigma®) were prepared in the range of 0.2 to 10 g L⁻¹ for comparison of peaks retention times.

RESULTS

Degree of pectin esterification (DE) was 67.3±1.0%, indicating a high degree of esterification.

The response surface for RGC was drawn as a bi-dimensional plot (Fig. 1a) and shows that by increasing the temperature and decreasing the acid concentration the RGC was increased, achieving the maximum value of 5.9 g L⁻¹ for a H₂SO₄ concentration of 1% (v/v) at 100°C. Linear mathematical model was built (Eq. 1) and R² value was corresponding to 0.99. Interactive temperature-H₂SO₂ term was discarded because presented p-value higher than 0.05 (p = 0.054) at 95% confidence level. p-values for temperature and H₂SO₂ variables were 0.00436 and 0.0005, respectively.

$$RGC = 0.9273 - (0.0894 \times H_2SO_4) + 0.0560 \times T \quad (1)$$

As shown in Pareto graph (Fig. 1b), on the contrary of temperature, an increase in acid concentration has a negative effect on the variable response. The experimental findings were in close agreement with the prediction

Table 1: Levels of the factors and experimental conditions used in the experimental design (central composite statistical design 2²)

Run	Experimental factors			
	Temperature (°C)		H ₂ SO ₄ (% v/v)	
1	+1	100	+1	7
2	-1	70	+1	7
3	+1	100	-1	1
4	-1	70	-1	1
5-9	0	85	0	4

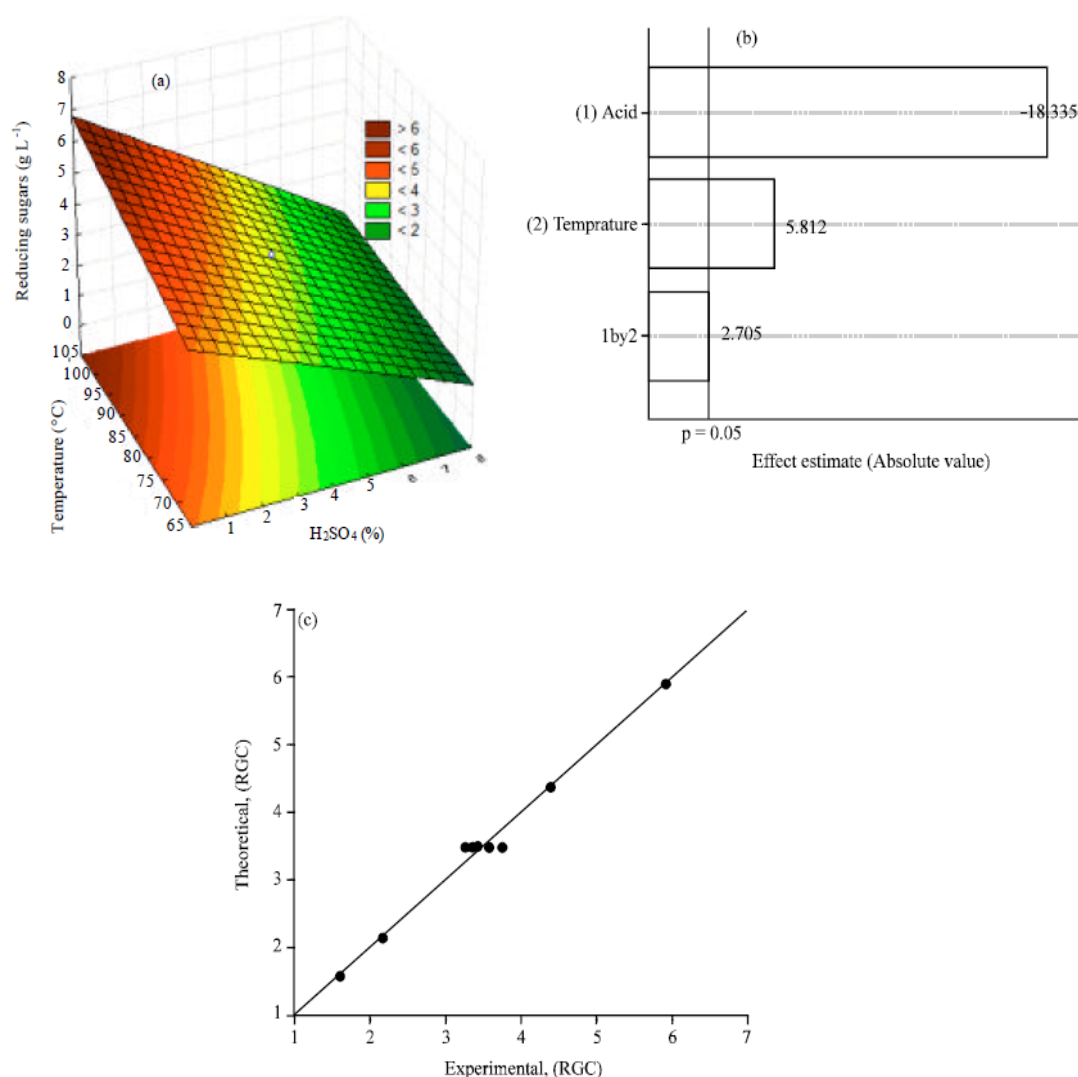


Fig. 1(a-c): (a) Response surface, (b) Pareto diagram and (c) correlation between theoretical and experimental reducing groups concentration values (RGC) as a function of temperature and H₂SO₄

model in view of the satisfactory correlation between theoretical response dates and experimental values (Fig. 1c).

Results indicate there is an optimum region for hydrolysis ratio at high level of temperature and low level of acid concentration. Considering equipment limitations to promote temperatures above 100°C, experimental conditions for determining kinetics of the reducing groups released were established at 1% (v/v) and 100°C for H₂SO₄ concentration and temperature, respectively.

Monitoring hydrolysis kinetics is shown in Fig. 2, with high reducing compounds liberation in the first 15 min, followed by a gradual increase up to 4 h. At the end of hydrolysis the average RGC is around 6 g L⁻¹, corresponding to a yield hydrolysis of 60% (Fig. 2a).

Two groups were evaluated in the hydrolysate chromatogram-galacturonic acid+glucose and fructose+galactose+xylose. For comparison from the standard chromatogram, each group presented a single peak and thus the total area of each peak represents the sum of the compounds concentrations. Arabinose concentrations were below 0.2 g L⁻¹ in all samples analyzed.

The release profiles of hydrolysate components were consistent with the results of RGC, with a high initial release rate for both groups. After 2 h was observed a decline of fructose, galactose and xylose content and from 4 h this decline was accentuated for both groups (Fig. 2b).

Figure 3 shows cell growth and pH variation during *C. necator* cultivation in nutrient broth medium with respect to inoculum development. Microorganism

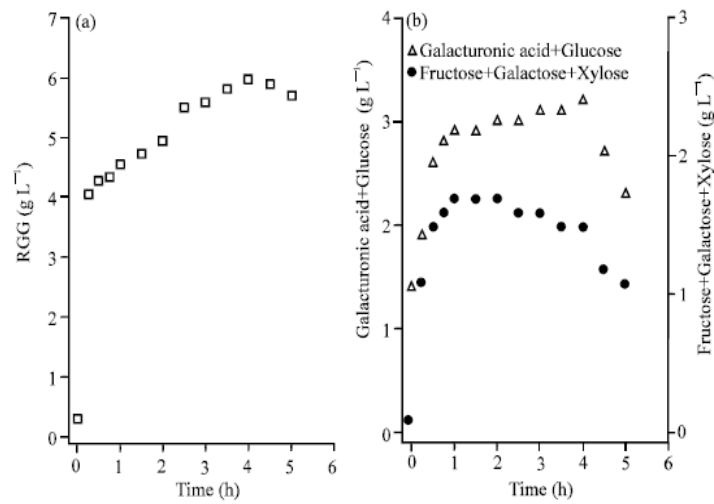


Fig. 2(a-b): Reducing Groups Concentration-RGC (a), Galacturonic acid and Glucose (b) and Fructose, Galactose and Xylose (c) concentrations during pectin hydrolysis at 100°C and 1% (v/v) H_2SO_4 (pectin concentration 1% w/v)

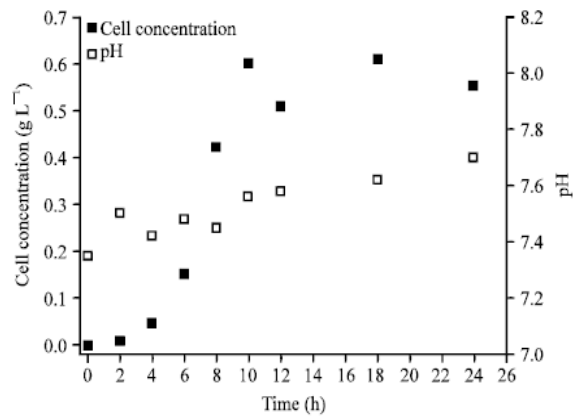


Fig. 3: Cell growth of *C. necator* and pH variation during the 24 h of cultivation in nutrient broth (NB)

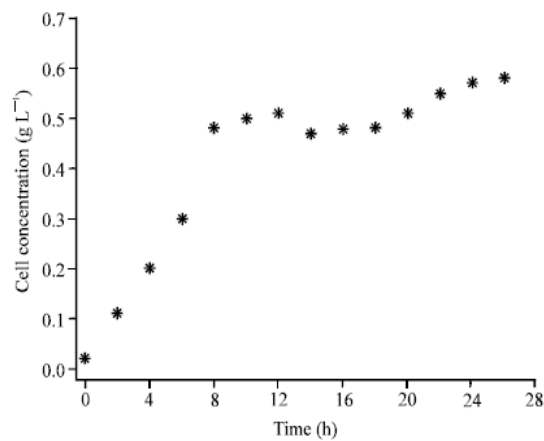


Fig. 4: Cell growth of *C. necator* during cultivation in MM medium containing 1.5 % (w/v) galacturonic acid

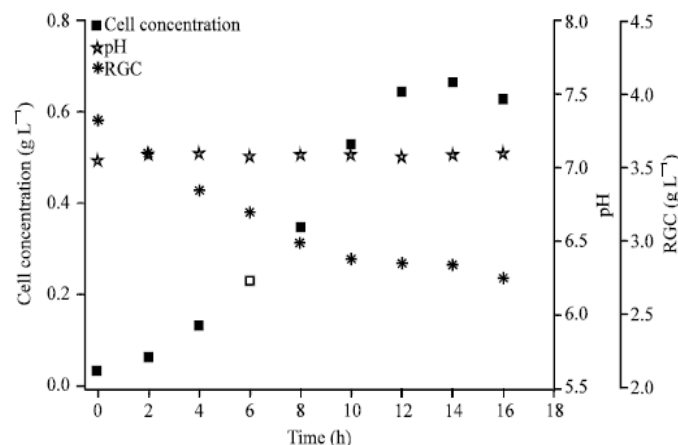


Fig. 5: Cell concentration, pH variation and Reducing Groups Concentration-RGC during *C. necator* cultivation in MM medium supplemented with acid hydrolysate

presented a lag phase of 4 h and exponential growth until 10 h, with maximum growth rate (μ_{max}) of 0.49 h^{-1} . pH values increase with the cellular growth. Thus, period of 10 h was used as criteria for the transfer of inoculum.

In order to verify if galacturonic acid is used as carbon source for cell growth, experiments were conducted using MM medium containing this compound at a concentration of 1.5% (w/v) (Fig. 4). *C. necator* grows without lag phase and at an arithmetic rate until 8 h. Using mineral medium containing acid hydrolysate, cell growth occurs immediately after inoculation of the cells with exponential growth up to 10 h and μ_{max} of 0.26 h^{-1} (Fig. 5).

pH values were around 7.0 and initial concentration of reducing groups was 3.82 g L^{-1} . High substrate consumption rate was observed until 10 h, concomitantly with the exponential growth phase. Final cell concentration was corresponding to 0.63 g L^{-1} and the substrate-to-cell conversion factor (Y_{XS}) was 0.55 g g^{-1} . After 16 h cultivation a residual reducing groups concentration of 2.8 g L^{-1} was obtained.

DISCUSSION

Pectin showed high degree of esterification, for according to May (2000), pectins are divided into two classes: pectins with high degree of esterification (>50%) and low degree of esterification (<50%). Esterification degree represents the percentage of acid group present in the form of ester and is an important parameter to be considered in hydrolysis study. Krall and Mcfeeters (1998) investigated pectins hydrolysis at pH 3.0 and 100°C , demonstrating that an increasing degree of pectin esterification leads to a reduction in the hydrolysis rate and a slower release of reducing groups.

An increase in acid concentration has a negative effect on the variable response. Smidsrod *et al.* (1966) reported that in strongly acidic conditions (pH<1.0) polipectate was more slowly hydrolysed to neutral polysaccharides compared with milder conditions of acidity (pH 2.5-4.5). Gama *et al.* (2006), studying kinetics of pectin hydrolysis at different sulfuric acid concentrations, obtained an optimal concentration around 1 M. Concentrations of 0.2 and 2 M had lower hydrolysis rates. The same authors investigated higher percentage of galacturonic acid was obtained at 100°C . Leitao *et al.* (1995) reported similar results when studied different acids and temperatures on the hydrolysis of sunflower pectin.

According to Grohmann *et al.* (1994), an advantage dilute acid hydrolysis has over enzymatic treatment is the higher rate of depolymerization and solubilization of polysaccharides. Treatment with acids can be used to increase the efficiency of subsequent enzymatic hydrolysis and improve the Liquefaction rate of concentrated peel slurries. On the other hand, it is a less sensitive process than enzymatic hydrolysis, because the hydronium ion is a less selective catalytic agent for this reaction.

Kinetics of hydrolysis showed high initial release of reducing groups can be explained considering that commercial pectins with a high esterification degree are generally extracted in hot acidic conditions, thus, regions containing high proportions of neutral sugars are hydrolyzed (May, 2000), forming a soluble fraction of the pectin. In addition, the initial conditions of acidity and temperature are sufficient to break glycosidic bonds more susceptible to hydrolysis. According to Novosel-skaya *et al.* (2000), resistance to acid hydrolysis of glycosidic linkages in pectin occurs in the following order: GalA $\alpha(1-4)$ GalA>GalA $\alpha(1-2)$ Rha>Rha $\alpha(1-4)$

GalA>neutral sugar α (1-4) neutral sugar. This resistance variation explains the gradual release of reducing groups by the end of the hydrolysis process.

Garna *et al.* (2006) investigated hydrolysis of high esterification degree pectin using different concentrations of sulfuric acid at 100°C and quantifying the galacturonic acid monomers released. Authors observed a gradual release in the beginning of hydrolysis in all treatments but a decline in the free galacturonic acid concentration was observed after 2, 6 and 18 h for sulfuric acid concentrations of 2, 1 and 0.2 M, respectively suggesting that hydrolysis can result in destruction rates of free galacturonic acid higher than polymer liberation rates. One possible reason is that the galacturonic acid is subject to degradation forming lactones (Blake and Richards, 1968) or furfural (Medina *et al.*, 1942).

Garna *et al.* (2004) showed a similar effect on the release of pectin neutral sugars and its susceptibility of degradation. These authors observed the beginning of degradation from 2 h to xylose and glucose and 3 h to galactose, using sulfuric acid 1 M at 100°C. For sulfuric acid concentration at 2 M, at the same temperature, the onset of degradation was observed from 1 h for all sugars except rhamnose.

Pentose components of polysaccharide are generally more easily liberated than the hexoses but the released pentose sugar is more liable to destruction during acid hydrolysis. Furanic compounds can be produced from sugars degradation products: furfural, from the degradation of pentoses (xylose and arabinose) and 5-hydroxymethylfurfural (HMF), originated from the degradation of hexoses (glucose, mannose and galactose).

Furfural and HMF are usually considered toxic to many organisms, such as mammalian cells (Janowski *et al.*, 2002), fungi (Szengyel and Zacchi, 2000), yeast (Taherzadeh *et al.*, 1999) and bacteria (Zaldivar *et al.*, 1999). The toxic effect of these compounds seems to be associated to its high reactivity to lipids, proteins and nucleic acids, besides being able to cause damage to the cell wall. Results obtained in the present work suggest that until 4 h of hydrolysis the formation of degradation products was low. Thus, hydrolysate obtained could be suitable for cell growth of *C. necator*.

There are no reports in the literature on the use of galacturonic acid and pectin hydrolyzed for cell growth of *C. necator*. Wei *et al.* (2011) studied a system for screening production strains in order to optimize PHA production in *C. taiwanensis*. Different carbon sources were evaluated on PHB synthesis and galacturonic acid was used for cell growth but had a negative effect on biopolymer production.

Dalcanton *et al.* (2010) studied the same cultivation conditions used in this work using hydrolyzed rice starch

and obtained similar results for μ_{max} (0.22 and 0.24 h⁻¹). Similar values were also observed by Marangoni *et al.* (2001) (0.26 h⁻¹) when investigated use of invert sugar as carbon source and Kim *et al.* (1994) (0.20 h⁻¹), when used glucose. Thus, results of this work indicate that pectin hydrolysate is a potential substitute for glucose for cell growth of *C. necator*.

The substrate-to-cell conversion factor ($Y_{x/s}$) obtained in this work (0.55 g g⁻¹) is comparable to the theoretical value suggested for *C. necator* (0.5 g g⁻¹), as related by Repaske and Repaske (1976). After 16 h cultivation a residual reducing groups concentration of 2.8 g L⁻¹ was obtained which was also observed in other studies for various carbon sources, such as molasses, acetate and glucose (Baei *et al.*, 2009).

CONCLUSION

The application of response surface methodology can be a practical useful tool for optimization of reaction parameters for the enhanced yields of RGC during acid hydrolysis of pectin. By monitoring the kinetics of hydrolysis, it was shown that there is a gradual increase of RGC released, indicating to be a suitable method for conversion of peel carbohydrates to monomeric sugars with low degradation in inhibiting compounds. We have shown that *C. necator* has ability to consume the products of pectin hydrolysis which demonstrates that utilization of waste pectin is a promising and economic strategy aiming PHAs production.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the financial support from the “Fundacao de Amparo a Ciencia e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE”, for the scholarship of master's degree. The authors are also grateful to Professor Nelson Medeiros de Lima Filho, for the assistance in chromatographic analysis.

REFERENCES

- Aragao, G.M.F., N.D. Lindley, J.L. Uribealarea and A. Pareilleux, 1996. Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *A. eutrophus*. Biotechnol. Lett., 18: 937-942.
- Baei, M.S., G.D. Najafpour, H. Younesi, F. Tabandeh and H. Eisazadeh, 2009. Poly (3-hydroxybutyrate) synthesis by *Cupriavidus necator* DSMZ 545 utilizing various carbon sources. World Applied Sci. J., 7: 157-161.
- Bedouet, L., B. Courtois and J. Courtois, 2005. Methods for obtaining neutral and acid oligosaccharides from flax pectins. Biotechnol. Lett., 27: 33-40.

- Blake, J.D. and G.N. Richards, 1968. Problems of lactonisation in the analysis of uronic acids. *Carbohydr. Res.*, 8: 275-281.
- Bochek, A.M., N.M. Zabivalova and G.A. Petropavlovskii, 2001. Determination of the esterification degree of polygalacturonic acid. *Russian J. Applied Chem.*, 74: 796-799.
- Dalcanton, F., J.L. Ienczak, M.L. Fiorese and G.M.F. Aragao, 2010. Producao de poli (3-hidroxi butirato) por *Cupriavidus necator* em meio hidrolisado de amido de arroz com suplementacao de oleo de soja em diferentes temperaturas. *Quim. Nova.*, 33: 552-556.
- Garna, H., N. Mabon, B. Wathelet and M. Paquot, 2004. New method for a two step hydrolysis and chromatographic analysis of pectin neutral sugar chains. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 4652-4659.
- Garna, H., N. Mabon, K. Nott, B. Wathelet and M. Paquot, 2006. Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. *Food Chem.*, 96: 477-484.
- Grohmann, K., E.A. Baldwin, B.S. Buslig and L.O. Ingram, 1994. Fermentation of galacturonic acid and other sugars in orange peel hydrolysates by the ethanologenic strain of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.*, 16: 281-286.
- Janzowski, C., V. Glaab, E. Samimi, J. Schlatter and G. Eisenbrand, 2002. 5-Hydroxymethyl furfural: Assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food Chem. Toxicol.*, 38: 801-809.
- Kim, B.S., S.C. Lee, S.Y. Lee, H.N. Chang, Y.K. Chang and S.I. Woo, 1994. Production of poly (3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotech. Bioeng.*, 43: 892-898.
- Kim, B.S., 2000. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme Microb. Technol.*, 27: 774-777.
- Krall, S.M. and R.F. McFeeters, 1998. Pectin hydrolysis: Effect of temperature, degree of methylation, pH and calcium on hydrolysis rates. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 1311-1315.
- Lai, S.M., T.M. Don and Y.C. Huang, 2005. Preparation and properties of biodegradable thermoplastic starch/poly (hydroxybutyrate) blends. *J. Applied Polym. Sci.*, 100: 2371-2379.
- Leitao, M.C.A., M.L. Alarcao-Silva, M.I.N. Januario and H.G. Azinheira, 1995. Galacturonic acid in pectic substances of sunflower head residues: Quantitative determination by HPLC. *Carbohydr. Polym.*, 26: 165-169.
- Marangoni, C. Jr., A. Furigo and G.M.F. Aragao, 2001. The influence of substrate source on the growth of *Ralstonia eutropha*, aiming at the production of polyhydroxyalkanoates. *Braz. J. Chem. Eng.*, 18: 175-180.
- May, C.D., 2000. Pectins. In: *Handbook of Hydrocolloids*, Phillips, G.O. and P.A. Williams (Eds.). 1st Edn., CRC Press LLC, New York, pp: 169-188.
- Medina, J.C., G.O. Jensen and J.P. Neri, 1942. Composicao quimica da casca de rami em diversas fases do seu desenvolvimento. *Bol. Tec. Div. Exp. Pesqui. Inst. Agron.*, 2: 433-447.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31: 426-428.
- Novosel-skaya, I.L., N.L. Voropaeva, L.N. Semenova and S.S. Rashidova, 2000. Trends in the science and applications of pectins. *Chem. Nat. Compd.*, 36: 1-10.
- Obruca, S., I. Marova, O. Snajdar, L. Mravcova and Z. Svoboda, 2010. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnol. Lett.*, 32: 1925-1932.
- Poirier, Y., C. Nawrath and C. Somerville, 1995. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacterial and plant. *Biotechnol. Lett.*, 13: 142-150.
- Ramsay, B.A., K. Lomaliza, C. Chavarie, B. Dube, P. Bataille and J.A. Ramsay, 1990. Production of poly-(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids. *Appl. Env. Microbiol.*, 56: 2093-2098.
- Reinecke, F. and A. Steimbuchel, 2009. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. *J. Mol. Microbiol. Biotech.*, 16: 91-108.
- Repaske, R. and A.C. Repaske, 1976. Quantitative requirements for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Env. Microbiol.*, 32: 585-591.
- Rivas, B., A. Torrado, P. Torre, A. Converte and J.M. Dom-nguez, 2008. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 2380-2387.
- Smidsrod, O., A. Haug and B. Larsen, 1966. The influence of pH on the rate of hydrolysis of acidic polysaccharides. *Acta Chem. Scand.*, 20: 1026-1034.
- Szengyel, Z. and G. Zacchi, 2000. Effect of acetic acid and furfural on cellulose production of *Trichoderma reesei* RUT C30. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 89: 31-42.

Biotechnology 11 (1): 29-36, 2012

- Taherzadeh, M.J., L. Gustafsson, C. Niklasson and G. Liden, 1999. Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biosci. Bioeng., 87: 169-174.
- Wei, Y.H., W.C. Chen, C.K. Huang, H.S. Wu and Y.M. Sun *et al.*, 2011. Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. J. Mol. Sci., 12: 252-265.
- Yapo, B.M., C. Robert, I. Etienne, B. Wathelet and M. Paquot, 2007. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. Food Chem., 100: 1356-1364.
- Zaldivar, J., A. Martinez and L. Ingmar, 1999. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanogenic *Escherichia coli*. Biotechnol. Bioeng., 65: 24-33.

ANEXO H – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA EVIDÊNCIA – UNOESC.

REVISTA EVIDÊNCIA BIOTECNOLOGIA E ALIMENTO

O trabalho anexo foi submetido para publicação na Revista Evidência – Biotecnologia e alimentos. Proceder uma cuidadosa revisão no mesmo com relação à qualidade do artigo, detalhando os aspectos positivos, suas fraquezas e/ou deficiências que possam recomendar ou não a sua aceitação pelo Conselho Editorial. Os itens listados abaixo servem de base para as observações citadas. Responda, portanto, as questões diretamente nesta folha e faça as justificativas pertinentes somente no formulário anexo.

Título: HIDRÓLISE ÁCIDA E ENZIMÁTICA DE PECTINA PARA CRESCIMENTO CELULAR DE CUPRIAVIDUS NECATOR E PSEUDOMONAS PUTIDA

Data de recebimento: 19/01/2012 data de entrega da avaliação: 27/12/2012

nº	ITEM	FRACO	REGULAR	BOM	EXCELENTE
		justificar			
1	Originalidade				X
2	Qualidade científica			X	
3	Relevância para a área da Biotecnologia			X	
4	Assunto			X	
5	Título				X
6	Resumo/abstract				X
7	Introdução			X	
8	Material e métodos			X	
				X	
10	Resultados				
11	Discussão				X
12	clareza e objetividade do texto			X	
13	Qualidade geral			X	

Fazer comentários, citando o número da linha e respectiva página avaliada

REVISTA EVIDÊNCIA BIOTECNOLOGIA E ALIMENTOS

FORMULÁRIO PARA COMENTÁRIOS DA REVISÃO

O trabalho pode ser aceito.

No decorrer do trabalho foram realizadas algumas sugestões para o mesmo a serem analisados e considerados pelos autores.

Este foi re-enviado em anexo.

ANEXO I – ARTIGO ENVIADO PARA A PUBLICAÇÃO.



Applied and Environmental
Microbiology

Manuscript Submission
and Peer Review System

[home](#) | [help for authors](#) | [help for reviewers](#) | [contact AEM™ staff](#) | [AEM™ home](#) | [logout](#)

Manuscript #	AEM00352-12
Current Revision #	0
Submission Date	2012-02-08 09:58:12
Current Stage	Initial QC
Title	Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of pectin for cell growth of <i>Cupriavidus necator</i>
Running Title	Acid and enzymatic hydrolysis of pectin
Manuscript Type	Full-length text
Journal Section	Biotechnology
Corresponding Author	Dr. Christine Lamenha Luna Finkler (Universidade Federal de Pernambuco)
Contributing Authors	Mr. Gabriel Olivo Locatelli, Miss Gabriella Dias da Silva, Dr. Leandro Finkler
Color Charges	No, my article contains no color or my article is exempt from color charges.
Abstract	<p>Pectins, which are present in large quantities as a byproduct of industrial citrus juice extraction, can be used as a low cost alternative for biopolymer production. The present work investigates the use of pectin hydrolysates for cell growth of <i>Cupriavidus necator</i>. The hydrolysates were obtained using acid and enzymatic hydrolysis procedures, with a substrate concentration of 1% (w/v) and optimization using rotational central composite design. The results indicated that the enzymatic hydrolysis method was the most efficient, with a 93.0% yield of reducing compounds (RC), while the yield for acid hydrolysis was 60.0%. The optimum conditions for enzymatic hydrolysis were an enzyme concentration of 10.01 U/g and an agitation speed of 230.3 rpm. <i>C. necator</i> showed satisfactory growth in the media containing pectin hydrolysates, with specific growth rates (μ_{Max}) and rates of conversion of substrate into cells (YX/S) that were similar to those reported for other substrates.</p>
Editor	Not Assigned
Keywords	Pectin hydrolysates, Polyhydroxyalkanoates, Polygalacturonase, <i>Cupriavidus necator</i>
Research Areas	Applied and Industrial Microbiology, Biotechnology
Conflict of Interest	No conflict of interest.

Manuscript Items

1. Author Cover Letter (last updated: 02/06/2012 08:39:27) [PDF \(83KB\)](#)
2. Manuscript Text File (last updated: 02/06/2012 09:29:19) [PDF \(242KB\)](#)

More Manuscript Info and Tools

[Send Manuscript Correspondence](#)
[Check Status](#)

[home](#) | [help for authors](#) | [help for reviewers](#) | [contact AEM™ staff](#) | [AEM™ home](#) | [logout](#)

TERMS OF SERVICE

Licensed under Patent #US 7,620,555B1