Universidade Federal do Rio de Janeiro Escola de Química

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos





Crescimento de *Methylobacterium* organophilum visando à produção de proteína de unicelular

Ana Cristina Pantoja Simões

Orientador: Nei Pereira Jr, PhD

Rio de Janeiro

2014

Universidade Federal do Rio de Janeiro Escola de Química

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

Ana Cristina Pantoja Simões

Crescimento de *Methylobacterium organophilum* visando à produção de proteína de unicelular

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientador: Nei Pereira Jr, PhD

Rio de Janeiro

2014

Crescimento de *Methylobacterium organophilum* visando à produção de proteína de unicelular

Ana Cristina Pantoja Simões

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências (MSc.).

Rio de Janeiro, 27 de Agosto de 2014.

Nei Pereira Jr., *PhD* (DEB/EQ-UFRJ) - Orientador/Presidente.

Maulori Curié Cabral, *DSc*. – Instituto de Microbiologia/UFRJ

Rodrigo Pires do Nascimento, *DSc* - DEB - Escola de Química /UFRJ

Luiz André Felizardo Schlittler, *DSc* - Escola de Química /UFRJ

Ficha Catalográfica

S593c

Simões, Ana Cristina Pantoja Crescimento de Methylobacterium organophilum em metanol visando à produção de proteína de unicelular / Ana Cristina Pantoja Simões. -- Rio de Janeiro, 2014. 110 f.

Orientador: Nei Pereira Junior. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2014.

1. biomassa bacteriana. 2. produção de proteínas de unicelular. 3. metilotróficas. 4. bioprocesso. 5. metanol. I. Junior, Nei Pereira, orient. II. Título.

Dedico esta dissertação aos meus maravilhosos filhos, Nathalia e Igor e à minha querida mãe, Ana Maria Pantoja, pois eles me ensinaram que, quando o amor é forte e verdadeiro, todas as adversidades podem ser superadas.

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família pelo carinho, apoio, incentivo e compreensão na minha ausência, em especial aos meus filhos, Nathalia e Igor, minha mãe Ana Maria Pantoja e meu irmão Marcos Pantoja, pelo apoio incondicional;

Ao Prof Nei Pereira Jr., pela orientação deste trabalho, por toda a confiança, incentivo, pelos conselhos, pelos ensinamentos e pela amizade. Sua postura competente, elegante e firme sempre me inspiraram e me fizeram perceber como é possível ser um acadêmico que alia a educação com a pesquisa aplicada de forma tão magistral. Suas palavras tão cheias de entusiasmo me fizeram ter uma maior vontade de ir além. Sua leitura atenta e os conselhos durante a confecção da parte escrita foram muito mais do que um aprendizado. Foram lições que levarei por toda vida;

Aos Profs. Maulori Curié Cabral e Isabel Madeira Liberto, pela imensa amizade, pelos valiosos conselhos, apoio, incentivo e imensurável parceria nos momentos difíceis e por me ensinarem que a educação e a divulgação da Ciência podem e devem andar de mãos dadas. Ensinaram-me que não há limites para quem quer compartilhar seus conhecimentos em quaisquer circunstâncias. Sempre terão um lugar especial em meus pensamentos e no meu coração;

À banca examinadora, pelas contribuições e sugestões;

À amiga Juliana Nascimento, pelo auxílio na parte experimental deste trabalho, pela amizade e por toda a ajuda, além dos momentos de descontração. Tudo isso gerou uma enorme amizade;

À Carolina Barcelos, Mariana Faber, Roberto Nobuyuki Maeda, Patrycia Garcia pelos conselhos, pela paciência, pela generosidade e por toda a ajuda, desde a confecção de gráficos até realização de cálculos fundamentais para meu entendimento nos trabalhos com os biorreatores e planejamento fatorial;

Às queridas amigas que ingressaram comigo no LADEBIO, Daiana Wischral e Suzana Pimentel, pelos momentos de ajuda e compartilhamento de nossas experiências;

Aos meus amigos do Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos, Áurea, Carol Abreu, Bia Marci, Luiz André, Camylle, Isis Mendes, Túlio Menezes, Hannah, Mônica Gravina, Johanna Méndez, Fernando, Lys Mangia, Carol Fioravante, Carolina Lázaro, Ludmylla Bastos, Marcello Costa, Renata Canuto, Vanessa Canuto, Élcio Borba, Danielle Silveira, Liliana pelo valioso

auxílio, por toda a ajuda para tornar esse trabalho possível e pelos momentos de descontração. Cada um teve sua parcela de valiosa importância para o térmico desta dissertação;

Ao Luiz Cláudio, pela ajuda constante, amizade, presteza em ceder seu espaço para nos ajudar;

Aos funcionários Jorge e Janaina pela amizade e presteza na resolução da parte burocrática;

À Escola de Química, incluindo professores e funcionários, por contribuíram com a realização deste trabalho;

À Universidade Federal do Rio de Janeiro;

Aos meus amigos adquiridos durante o mestrado Éricson, Rosana, Adélia, Danielle Aparecida, Leilson, Juliana, Ludmylla pela amizade e pelo companheirismo em momentos tensos;

Aos meus amigos tutores do CEDERJ;

Aos meus amigos professores e funcionários da Escola Municipal Cora Coralina, pela ajuda, compreensão em vários momentos, incentivo e pela descontração de sempre.

"Vocês, jovens, doutores e cientistas do futuro, não se deixem macular por um ceticismo estéril, nem desencorajados pela tristeza de certas horas que as nações passam.

Não fiquem bravos com seus adversários.

Nenhuma teoria científica já foi aceita sem oposição.

Vivam na paz serena de bibliotecas e laboratórios.

Perguntem-se antes:

-O que fiz pela minha instrução?

E ao avançarem gradualmente:

-O que eu estou conseguindo?

Até que chegue a hora que terão a imensa felicidade de pensar que contribuíram de algum modo para o bem estar e progresso da humanidade."

Louis Pasteur

RESUMO

Simões, Ana Cristina Pantoja. Crescimento de *Methylobacterium organophilum* em metanol visando à produção de proteína de unicelular. Dissertação de Mestrado. Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

Orientador: Nei Pereira Jr.

O interesse pelo uso de bactérias metilotróficas vem crescendo por se tratar de microrganismos capazes de utilizar compostos de carbono simples como metanol e metano, como fontes de nutrientes, assimilando-os em suas vias metabólicas e gerando como produto final a própria biomassa microbiana. Estas células podem também ser empregadas para a obtenção de outros produtos com maior valor agregado, apresentando elevado potencial biotecnológico para a indústria, incluindo proteínas de unicelulares destinadas à alimentação animal. O metanol, por ser mais facilmente solubilizável em ambiente aquoso e por ser produzido em larga escala, foi a fonte de carbono utilizada no presente estudo, para o crescimento da bactéria Methylobacterium organophilum DSMZ 18172, assimiladora de compostos de carbono simples, incluindo o metano. Neste contexto, o objetivo desta dissertação de mestrado foi a realização de estudos sobre o crescimento desta espécie em meio estritamente mineral e com a adição de extrato de levedura, visando acompanhar o crescimento mediante diferentes relações de carbono e nitrogênio (C:N). Para estes estudos foi emprega a metodologia do planejamento experimental e as concentrações de metanol foram monitoradas por cromatografia de alta eficiência (CLAE) e a biomassa bacteriana por peso seco de células. Os ensaios foram realizados em frascos agitados e em biorreator instrumentado. A concentração celular máxima alcançada na etapa preliminar de frascos agitados foi de 5 g/L em meio mineral com concentração inicial de metanol de 12 g/L, aumentando para uma concentração da biomassa bacteriana de 9,5 g/L na série experimental do planejamento fatorial. Na etapa de biorreator, quando a batelada simples foi utilizada, a concentração máxima de células foi de 4,0 g/L, aumentado 2,5 vezes quando se empregou a batelada alimentada por pulsos. As relações C:N associadas aos melhores resultados empregando meio mineral e metanol ficaram entre 18 e 30 para os frascos agitados e entre 15 e 20 para os cultivos em biorreator. As principais variáveis de resposta obtidas em biorreator empregando a batelada alimentada assumiram os seguintes valores: produtividade volumétrica em células de 0,5 g.L⁻¹.h⁻¹, taxa específica de crescimento de 0,1 h⁻¹ e o fator de conversão de substrato em célula de 1,13 g.g-1. O estudo também abriu questionamentos em relação à formação de um pigmento rosáceo que se acumulava durante os cultivos nos meios propostos e ainda quanto à formação de um biofilme que foi visualizado em diferentes escalas, por meio de microscopia eletrônica de varredura, que confirmou a presença de uma matriz densa, com poucas células isoladas, podendo ser uma forma de proteção contra a ação tóxica do metanol.

Palavras-chave: biomassa bacteriana, produção de proteínas de unicelular, metilotróficas, bioprocesso, metanol.

ABSTRACT

Simões, Ana Cristina Pantoja. Growth of *Methylobacterium organophilum* methanol aiming at the production of single-cell protein. Master's Dissertation. Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

Advisor: Nei Pereira Jr

The interest in the use of methylotrophic bacteria is growing because they are microorganisms capable of using single-carbon compounds such as methanol and methane, as sources of nutrients, assimilating these compounds in their metabolic pathways, generating as a final product microbial biomass itself. These cells can also be used to obtain other value-added products, with high biotechnological potential for the industry, including single cell proteins for animal feed. The methanol, being more easily solubilizable in an aqueous environment and also being produced on a large scale, was used as carbon source in the present study for the growth of the bacterium Methylobacterium organophilum DSMZ 18172 - an assimilating microorganism of single-carbon compounds, including methane. In this context, the objective of this dissertation was to conduct studies of the growth of this species in strictly mineral medium, and using the strategy of mineral medium added with yeast extract, aiming to follow the growth by the ratios of carbon and nitrogen (C:N). For these studies, the methodology of experimental design was used and the methanol concentrations were monitored by high performance liquid chromatography (HPLC) and the bacterium biomass by cell dry weight. The experiments were carried out in shake flasks and in an instrumented bioreactor. The maximum cell concentration achieved in the preliminary step of sake flasks was 5 g/L in mineral medium containing 12 g/L of initial methanol, increasing to 9.5 g/L of dry biomass in the factorial design experiments. In the bioreactor step, when the simple batch mode of operation was employed, the maximum cell concentration was 4 g/L, increasing by 2.5 fold when the fed batch was used. The C:N ratio associated with the best results using mineral medium and methanol ranged from 18 to 30 in shake flasks and from 15 to 20 for cultivation in a bioreactor. The main response variables obtained in bioreactor with fed batch operation was as follows: cell volumetric productivity of 0.5 g.L⁻¹.h⁻¹, specific growth rate of 0.1 h⁻¹ and yield of substrate conversion into biomass of 1.13 g.g⁻¹, with a final cell concentration of 10.0 g/L. The study also brought questionings regarding a pinkish pigment formed by the species during the cultivation in the proposed media, and also the formation of a biofilm, which was observed at different scales, but also by scanning electron microscopy. From this latter technique, the presence of a dense matrix, with few cells isolated was confirmed, which may be a way of protecting the cells against the toxic action of methanol.

Keywords: microbial biomass, single cell protein production, methylotrophic, bioprocess, methanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Metabolismo de compostos de um carbono em bactérias aeróbias metilotróficas	1
Figura 2.2: Visão geral de metanotróficos aeróbicos e suas vias metabólicas para a utilização de metano	1
Figura 2.3: Esquema da via geral, até o formaldeído nos dois tipos metanotróficos e na sequencia para a	
via Serina ou para a via Ribulose monofosfato	1
Figura 2.4: Via da Ribulose Monofosfato para a fixação de formaldeído	1
Figura 2.5: Rota da Serina para a fixação de formaldeído	2
Figura 2.6: Microscopia da espécie Methylobacterium organophylum	2
Figura 2.7: Exemplos de aplicação das bactérias metanotróficas em diferentes setores industriais	2
Figura 2.8: As unidades $\alpha\beta$ da enzima metanol desidrogenase simplificados para mostrar os fios β na	
longa cadeia α- hélice da subunidade β	2
Figura 2.9: As interações equatoriais da PQQ (pirroloquinolinequinona) e a coordenação de Ca ²⁺ no	
sítio ativo da MDH	2
Figura 2.10: Ciclo de Calvin	3
Figura 2.11: Papéis dos metilotróficos, autotróficos e metanogênicos no ciclo do carbono da biosfera	4
Figura 2.12: Tabela adaptada de Sociedad Española De Microbiología, 1987, associando a espécie	
Methylobacterium organophylum à capacidade de produzir bacterioclorofila	4
Figura 2.13: Estruturas analisadas no trabalho e carotenóides hipotéticos (nomes semi sistemáticos)	4
Figura 2.14: Crescimento de <i>Methylobacterium organophylum</i> em fontes de carbono e substratos multicarbono	4
Figura 4.1: Colônias crescidas de <i>Methylobacterium organophylum</i> -DSMZ-1817	5
Figura 4.2: Micrografias da espécie <i>Methylobacterium organophylum</i> realizadas após a ativação e durante o crescimento em frasco	5
Figura 4.3: Comparação entre o meio mineral líquido com crescimento bacteriano (à esquerda) e sem crescimento	5

Figura 4.4: Correlação entre densidade óptica e concentração celular para o substrato metanol, da curva
de calibração de biomassa bacteriana.
Figura 4.5: Visualização do pré inóculo centrifugado e utilizado como inoculo para o crescimento
Figura 4.6: Biorreatores (a) Biostat B (B. Braun Biotech International, Alemanha) e (b) Bioflo 310
(New Bunswick Scientific)
Figura 4.7: Vista superior do sistema de provetas conectadas em arranjo circular
Figura 4.8: Cromatogramas padrão para a determinação de consumo de metanol. (a) concentração de 6 g/L e (b) concentração de 0,6 g/L
Figura 5.1: Perfil cinético do crescimento microbiano e consumo de substrato em biorreator,
empregando metanol a uma concentração de 7,7 g/L
Figura 5.2: Formação de biomassa microbiana em concentrações de metanol (MeOH) de 1g/L ; 4 g/L ; 7 g/L ; 12g/L ; e 17 g/L
Figura 5.3: Frascos de cultivo nas concentrações de metanol de 12 e 17 g/L
Figura 5.4: Relação entre os fatores de rendimento para a relação carbono e nitrogênio
Figura 5.5: Efeito do extrato de levedura no crescimento de <i>Methylobacterium organophylum</i> DSMZ 18172
Figura 5.6: Frascos do início dos ensaios (acima) e no tempo de 30 h de fermentação (em baixo)
Figura 5.7: Gráfico dos valores preditos em relação aos encontrados nos ensaios para produtividade em
biomassa microbiana máxima
Figura 5.8: Histograma de Pareto da influência das variáveis e suas interações
Figura 5.9: Gráfico de normalidade dos resíduos para produtividade em biomassa microbiana máxima
Figura 5.10: Superfície de Resposta em 3D para biomassa bacteriana, da função <i>desirability</i>
Figura 5.11: Formação de um tipo de biofilme microbiano na interface superior do meio de cultivo em frasco
Figura 5.12: Cinética da batelada simples para o crescimento de <i>Methylobacterium organophylum</i>
DSMZ 18172 em biorreator instrumentado sem controle de pH.
Figura 5.13: Cinética da batelada simples para o crescimento de Methylobacterium organophylum
DSMZ 18172 em biorreator instrumentado com controle de pH.
Figura 5.14: Formação de um biofilme com pigmento visível, acumulado na interface superior do biorreator
C1C11 CM1C1

Figura 5.15: Crescimento de Methylobacterium organophylum DSMZ 18172 por batelada com
alimentação por pulso de metanol e meio mineral
Figura 5.16 Biorreatores <i>Biostat B</i> mostrando o crescimento de <i>Methylobacterium organophylum</i> DSMZ 18172 no início (a) e em um intervalo de 24 h (b)
Figura 5.17: Visão geral dos resultados obtidos em todos os ensaios realizados em frascos agitados e
biorreator em metanol
Figura 5.18: Sistema constituído de provetas para o crescimento de Methylobacterium organophylum
DSMZ 18172 em metano para diferentes condições de ensaio.
Figura 5.19: Resultados do crescimento em meio mineral, meio mineral com extrato de levedura e meio
mineral com surfactante.
LISTA DE TABELAS
LISTA DE TABELAS
Tabela 2.1: Composição de diferentes SCP
Tabela 2.2: Custos operacionais do processo (1000.000 t por ano) de <i>SCP</i> a partir de metanol. Adaptada de Hacking (1986)
Tabela 2.3: Utilização das fontes de carbono e energia por bactérias metilotróficas (Patt, 1974)
Tabela 2.4: Atividades enzimáticas em M. Organophylum.
Tabela 2.5: Propriedades Físico-Químicas do metanol
Tabela 2.6: Propriedades químicas de carotenóides foram analisadas. Comparação dos tempos de retenção, de absorvância máxima e massas moleculares de íons.
Tabela 4.1: Composição do meio de cultivo mineral (MMS) para ativação e crescimento
Tabela 4.2: Composição dos meios de cultivo em placa usados para estoque (a) e manutenção (b)
Tabela 4.3: Composição do extrato de levedura utilizado nos cultivos
Tabela 4.4. Variáveis e níveis propostos no Planejamento Fatorial completo 2 ² + 2 PC
Tabela 4.5: Matriz do planejamento para as 2 variáveis com triplicata no ponto central
Tabela 5.1: Variáveis de resposta do perfil cinético.
Tabela 5.2: Ensaios preliminares do crescimento (X g/L) de <i>Methylobacterium organophylum</i> DSMZ – 18172 em metanol (CH ₃ OH g/L)
Tabela 5 3: Variações de nH nara as concentrações de metanol iniciais estudadas

Tabela 5.4: Variáveis de resposta do cultivo nas diferentes concentrações de CH ₃ OH	72
Tabela 5.5: Variáveis de resposta do cultivo em concentrações entre 1 g/L e 17 g/L de CH ₃ OH	74
Tabela 5.6: Resultados da produção de células e consumo de metanol em meio mineral com extrato de	
levedura	78
Tabela 5.7: Variáveis de resposta do cultivo na concentração de ca. de 6 g/L de CH ₃ OH	78
Tabela 5.8: Fatores estudados e respostas em rendimentos em biomassa	80
Tabela 5.9: Rendimentos em biomassa microbiana (X) e consumo de metanol (MetOH) dos ensaios do	80
Planejamento Fatorial Completo (em g/L).	
Tabela 5.10: Tabela da ANOVA para a resposta em biomassa bacteriana	81
Tabela 5.11: Valor de biomassa predita e experimental de acordo com a função desirability para a	
produtividade em biomassa microbiana máxima	85
Tabela 5.12: Fatores de rendimento para biorreator em batelada simples com 8 g/L de Metanol	88
Tabela 5.13: Fatores de rendimento para biorreator em batelada simples com 7 g/L de Metanol	89
Tabela 5.14: Variáveis de resposta do crescimento em biorreator em batelada alimentada por pulso	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C:N: Relação Carbono e Nitrogênio

C₁: Carbono único

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DM t⁻¹: Deutsche Mark ou dinheiro alemão

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Headspace: Parte superior do bioreator

MeOH: Metanol

NKr t ^{-1:} Ou também descrito pela sigla NOK, quer dizer Kroene norueguês por toneladas.

OD: Oxigênio dissolvido (g. L⁻¹)

PX_{max}: produtividade máxima em células (g. L⁻¹ h⁻¹)

Qx (mg. L⁻¹.h⁻¹): Produtividade volumétrica em células

rDNA 16S: DNA ribossomal 16 S

RPM: Rotações por minuto

RPS (%): Redução percentual de substrato

S₀: concentração inicial de substrato (g. L⁻¹)

 S_f : concentração de substrato onde concentração celular é máxima (g. $L^{\text{-1}}$)

t: tempo de cultivo (h)

t xm: Tempo em que a concentração máxima foi obtida

vvm: volume de ar por volume de meio por minuto

X: concentração celular (g L⁻¹)

X₀: concentração celular inicial (g L⁻¹)

X_m: concentração celular máxima obtida (g L⁻¹)

X_{max}: concentração celular máxima (g L⁻¹)

 $Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em células $(g.g^{-1})$

μx (h⁻¹): Taxa específica de crescimento (h⁻¹)

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	I
DEDICATÓRIA	V
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XV
CAPÍTULO 1	1
1.1 Apresentação do tema da tese	1
1.2 Organização da dissertação	2
CAPÍTULO 2	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Proteínas de unicelular – single cell protein (SCP)	3
2.2 Espécies consumidoras de fontes de carbono único como substrato	11
2.3 Bactérias Metanotróficas	15
2.3.1 Vias metabólicas em Metanotróficas	16
2.4 Sobre o gênero Methylobacterium	21
2.4.1 Espécie microbiana - Methylobacterium organophylum - DSMZ – 18172	21
2.5 Aplicações biotecnológicas das espécies do gênero Methylobacterium	23
2.6 Enzimas envolvidas na via metabólica de Methylobacterium organophylum	25
2.7 Metanol como fonte de carbono	29
2.7.1 Metanol no mercado nacional e internacional	32
2.8 Análise sobre o processo de litotrofia e metilotrofia	34
2.9 Considerações relacionadas ao pigmento expresso por metilotróficas	43
2.10 Crescimento da espécie Methylobacterium organophylum em metano	45
2.11 Considerações Finais	46

CAPÍTU	LO 3
JUSTIFI	CATIVAS E OBJETIVOS
3.1.	Objetivo geral
3.2.	Objetivos específicos
CAPÍTU	LO 4
MATER	IAIS E MÉTODOS
4.1	Ativação, isolamento e manutenção da linhagem estudada - Methylobacterium
organoph	ylum - DSMZ – 18172
4	.1.1. Estratégia de esterilização do meio de cultivo
4.2	Estimativa da concentração de células por espectrofotometria
4.3	Ensaios de produção de biomassa microbiana em frascos
4	.3.1. Ensaios preliminares de produção de biomassa microbiana em frascos
4	.3.2 Ensaios de produção de biomassa microbiana em frascos com aumento da
concentra	ção do inóculo e faixa de metanol inicial
4	3.3 Ensaios de crescimento em frasco, com meio mineral, extrato de levedura e
metanol	
4.4.	Planejamento experimental.
4	.4.1 Validação da otimização experimental
4.5.	Imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)
4.6.	Ensaios em biorreator instrumentado
4.7.	Crescimento microbiano em metano
4.8.	Análise Estatística
4.9.	Formas de Amostragem
4.10). Determinações Analíticas e quantitativas do substrato
4	10.1 Medida do pH
4.11	Análise dos parâmetros do processo fermentativo
4	11.1 Rendimento em biomassa (Y x/s)
4	11.2 Produtividade total em biomassa (Q _x)
4	.11.3 Velocidade específica de crescimento celular
4	.11.4 Redução percentual do substrato
4	.11.5 Tempo de duplicação

CAPÍTULO 5
RESULTADOS E DISCUSSÃO
5.1. Verificação da capacidade metilotrófica, por meio da ativação da linhagem
Methylobacterium organophylum DSMZ – 18172 em metanol
5.2. Ensaios de produção de biomassa microbiana em frascos
5.2.1 Ensaios preliminares de produção de biomassa microbiana variando a
concentração inicial de metanol
5.2.2. Aumento da concentração do inóculo e da faixa de utilização de metanol
para a produção de biomassa bacteriana
5.2.3. Efeito do extrato de levedura no crescimento bacteriano em meio mineral
com metanol como substrato
5.3. Planejamento experimental fatorial completo utilizando extrato de levedura
5.3.1 Validação da otimização do Planejamento
5.4. Observação macroscópica e microscópica da formação de biofilme por
Methylobacterium organophylum DSMZ – 18172 em metanol
5.5. Ensaios de crescimento em biorreator instrumentado
5.5.1. Batelada simples sem controle de pH e O.D
5.5.2 Batelada Simples com controle de pH e O.D
5.5.3. Batelada alimentada por pulso de metanol em meio mineral
5.6. Evolução dos valores de concentração celular e produtividade volumétrica em
todos os ensaios realizados em metanol
5.7. Ensaio de crescimento microbiano em meio mineral com metano como fonte de
carbono
CAPÍTULO 6
CONCLUSÕES
6.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO 1

1.1 APRESENTAÇÃO DO TEMA DA DISSERTAÇÃO

Os seres chamados metilotróficos são capazes de utilizarem metanol, metano e compostos contendo um ou mais grupos metil não diretamente ligados, constituindo um grupo heterogêneo. Apresentam diversas rotas bioquímicas de assimilação destes compostos indicando ainda quais tipos microbianos devem ser escolhidos para as aplicações industriais tais como: produção de enzimas, biocombustíveis, microsensores e proteínas de unicelulares.

Este grupo de bactérias vem despertando o interesse de pesquisadores devido a sua importância na capacidade de utilizar um tipo de matéria prima bastante encontrada na natureza, o metano. Este pode ser considerado um substrato mais abundante do que o metanol e mais barato, porém de maior dificuldade de utilização em biorreatores. No entanto, o produto final da desidrogenação do metanol é a própria biomassa microbiana que difere de microrganismo para microrganismo sendo, sobretudo rica em proteína, o que corrobora com a sua capacidade de serem utilizados como fontes de proteínas de unicelulares ou as chamadas SCP (*single cell protein*).

Este trabalho integra um dos projetos de pesquisas desenvolvidos no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos – LADEBIO, da Escola de Química/ UFRJ, sob a

coordenação do Prof. Dr. Nei Pereira Jr., chamada PPGN - Produção de Proteínas a partir do Gás Natural. Tem a parceria com a Petrobrás.

No que se refere à produção nacional e internacional, o número de trabalhos referentes ao tema ganhou maior destaque na década passada, de forma que ao longo dos últimos anos, vários autores, em todo o mundo, se dedicaram ao isolamento de cepas com a finalidade de se obterem altas densidades celulares e bioprocessos com menor custo. Em relação ao cenário nacional, não é possível constatar basicamente nenhum trabalho em andamento acerca da produção de proteínas para alimentação animal utilizando as referidas fontes energéticas, bem como as espécies microbianas mencionadas, mesmo dentre as universidades de grande potencial acadêmico conhecido em nosso país, o que torna o trabalho, do ponto de vista de inovação em biotecnologia, uma potencial fonte de informação sobre o assunto, contribuindo para a divulgação do mesmo.

1.2 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação encontra-se organizada em sete tópicos.

O presente capítulo, denominado **Introdução**, versa sobre a apresentação do tema da dissertação, bem como a relevância de seu estudo, assim como apresenta a estrutura geral do trabalho como um todo.

O capítulo dois apresenta a **Revisão Bibliográfica** dos trabalhos relacionados ao assunto tratado, além de abordar aspectos tanto do ponto de vista tecnológico, econômico, de engenharia de bioprocessos e sobre o gênero microbiano estudado.

No capítulo três, intitulado **"Justificativas e Objetivos"**, são apresentados os motivos que levaram ao desenvolvimento desta dissertação, bem como os objetivos específicos desenvolvidos.

O capítulo quatro refere-se à descrição dos **Materiais e Métodos** utilizados na execução deste trabalho, detalhando as metodologias experimentais adotadas, assim como as técnicas de planejamento experimental para a análise dos resultados.

O capítulo cinco traz os **Resultados e Discussões** relativos aos principais ensaios, com base no tratamento dos dados obtidos. No capítulo seis são registradas as **Conclusões e Sugestões** do presente trabalho. No último tópico são apresentadas as **Referências Bibliográficas** consultadas ao longo da realização dos experimentos e composição deste trabalho.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteínas de unicelular – single cell protein (SCP)

O aumento da deficiência de proteína no mundo vem se tornando um grande problema e já se conhecem tentativas desde o início dos anos 50, para explorar um tipo de proteína nova, alternativa e não convencional (Smith, 2009).

Estima-se que, se não forem tomadas as medidas necessárias, a condição de desnutrição vai levar a uma grande crise nos países em desenvolvimento. Por isso, torna-se de extrema importância aumentar a produção de proteínas e também a sua disponibilidade para a população, utilizando todos os meios e métodos disponíveis. O aumento da demanda mundial por alimentos e, em especial, proteínas alimentares estimulou a busca de fontes de proteínas não convencionais para complementar a fonte de proteína já disponível. Tecnologias de produção de SCP surgiram como uma maneira promissora para resolver o problema a carência de proteína em todo o mundo.

Por volta da década de 60, já se previa um aumento do número de habitantes no mundo, que naquela época era de cerca de três bilhões de pessoas, o que geraria no futuro, problemas em relação à produção de proteínas, cujas fontes principais são a carne, o peixe, ovos e leite. Na

época alguns cientistas dos laboratórios Milstead, da Shell, na Inglaterra, tiveram grandes avanços relativos à produção de um pó rico em proteínas, extraído de uma bactéria que havia sido recém-descoberta e que podia viver e desenvolver-se no metano. Os cientistas consideravam que o metano era um produto barato e existente em abundância no planeta (Correio da Manhã, 1966). Outro ponto destacado na época foi de que muitos microrganismos estavam sendo isolados, de soluções simples de sais, supridos somente com ar e metano. Depois de aquecidos, eram mortos, podendo ser ingeridos sem produzir efeitos tóxicos, o que denotava uma posição irretorquível de patogenia relacionada aos micróbios, característica da época. Atualmente se sabe que existe uma harmonia na relação entre seres humanos e animais em geral com os micróbios e que esta não se liga especificamente à uma patogenia. A fonte de metano usada pelos cientistas era obtida a partir do leito do Mar do norte e embora fossem estudos preliminares, ficava evidente que o gás natural poderia resultar em fonte de alimento para essas espécies microbianas, gerando biomassa microbiana (Correio da Manhã, 1966).

Outro momento importante em relação à produção de proteínas em escala industrial foi a do anúncio feito pela British Petroleum Company Limited e a refinaria Grangemouth, na Escócia, utilizando parafinas como matéria prima (Revista de Química Industrial 1969).

O concentrado de proteínas obtido nas fábricas da refinaria era destinado à ração animal, havendo testes realizados em aves, visando a possibilidade do seu emprego como alimento.

Aceitava-se a hipótese de uma fermentação contínua, considerando que a matéria prima era de alta pureza e que seria totalmente assimilada na fermentação, com consequente separação do concentrado de proteínas, de forma mais simplificada (Revista de Química Industrial 1969).

A justificativa que levou a British Petroleum a entrar no campo da produção de proteínas de unicelulares foi a de considerar que esse era um produto escasso na quantidade em que era disponibilizado. Nestas condições, seria natural que uma companhia com pensamento progressista e que se valia de pesquisa tecnológica, estudando processos para aumento da disponibilidade de proteína a partir de fontes econômicas, desenvolvesse um processo em escala industrial (Revista de Química Industrial 1969).

O crescimento populacional dos países em desenvolvimento promoveu de fato, um acréscimo na demanda por alimentos e, como consequência direta, elevação dos custos dos alimentos protéicos como carnes, laticínios e ovos (PARAJÓ *et al.*, 1995). A oferta insuficiente aliada ao alto custo da proteína na alimentação humana e na ração animal fizeram surgir a

necessidade de desenvolver tecnologias alternativas para a produção de alimentos que substituam as fontes protéicas convencionais (CHIOU *et al.*, 2001).

Verifica-se que houve, então, uma rápida evolução da produção de proteína de unicelulares entre os anos de 1960 e 1970. Extensas pesquisas foram realizadas em uma ampla gama de microrganismos como possíveis fontes de proteínas alternativas, motivados por grandes aumentos no preço da alimentação animal convencional. A SCP não é a proteína pura, mas referem-se a todas as células obtidas de bactérias, leveduras, fungos filamentosos, ou algas. Estas proteínas de unicelulares também contêm hidratos de carbono, lipídios, ácidos nucleicos, sais minerais e vitaminas. A composição depende do microrganismo e do substrato em que ocorre o crescimento.

Porém, os microrganismos têm sido componentes da alimentação humana há muito tempo. As leveduras usadas na fabricação de pão, vinho e cerveja, as bactérias empregadas na produção de salame e iogurte, e os fungos utilizados na obtenção de queijo e molho de soja, são alguns exemplos de microrganismos úteis ao homem.

STEINKRAUS (1997) destaca a qualidade nutricional dos alimentos fermentados, pois em geral a fermentação aumenta a quantidade de proteína, aminoácidos essenciais e vitaminas. A enorme versatilidade dos microrganismos também tem sido explorada através de processos fermentativos na obtenção de metabólitos de alto valor comercial, como vitaminas, enzimas, além da própria biomassa microbiana, rica em proteínas de alta qualidade, que surge como uma alternativa promissora na obtenção de fontes proteicas de baixo custo (DEMAIN, 2000; LITCHFIELD, 1983).

O uso de microrganismos como alimento ou como suplemento protéico tem atraído grande interesse, pois estes são capazes de crescer em diferentes tipos de subprodutos industriais, produzindo grandes quantidades de células, denominadas proteína unicelular ou proteína microbiana (PARAJÓ *et al.*, 1995).

O valor nutricional e a utilidade da proteína microbiana estão baseados na sua composição. O produto final, além de ser nutritivo, deve estar livre de qualquer substância tóxica. Embora esses microrganismos sejam cultivados principalmente pelo seu alto conteúdo protéico, que determinará o valor comercial da SCP, as células microbianas também contêm lipídios, vitaminas, minerais, carboidratos, além de nitrogênio não protéico, como os ácidos nucléicos (LITCHFIELD, 1983).

As bactérias despertam interesse por apresentarem biomassa com altos valores nutritivos, além de alta velocidade de crescimento e elevado conteúdo proteico, variando de 47% a 87% (BU'LOCK; KRISTIANSEN, 1991). Além disso, segundo DABBAH (1970), metionina, triptofano e cistina, que são aminoácidos deficientes em leveduras e fungos, podem ser encontrados nas proteínas de bactérias.

A biomassa microbiana, considerada como um concentrado protéico natural contém proteínas completas, com todos os aminoácidos essenciais (VILLAS BÔAS & ESPOSITO, 2000). A composição de variados tipos de fontes de proteínas de unicelulares é demonstrada na tabela 2.1.

Tabela 2.1: Composição	de diferentes SCP	(Fonte: ANUPAMA E RAVINDRA,	2000)

Componente (%)	Algas	Leveduras	Fungos Filamentosos	Bactérias
Proteína	40-60	47-56	30-70	50-83
Nitrogênio	45-65	7,5-9,0	35-50	60-80
Lisina	4,6-7,0	-	6,5-7,8	4,3-5,8
Metionina	1,4-2,6	-	1,5-1,8	2,2-3,0
Lipídios	5-10	2-6	5-13	8-10
Ácidos nucléicos	4- 6	6-12	9	15-16
Cinzas	8-10	5-10	9-14	3-7

A quantidade de ácidos nucléicos em espécies microbianas tem sido o principal fator limitante da sua utilização em alimentos para seres humanos. A ingestão diária de mais de dois gramas desses compostos pode resultar em elevados níveis de ácido úrico, que se acumula no corpo, causando doenças como a formação de pedras nos rins e a chamada gota (PARAJÓ *et al.*, 1995). Sendo assim, para satisfazer os requerimentos protéicos em humanos através da ingestão de SCP, o limite superior da concentração de ácidos nucléicos na biomassa deve ser de até 3 % (p/p) em base seca (ABOU-ZEID *et al.*, 1995).

Haja vista que a multiplicação celular acelerada aumenta a formação de ácidos nucléicos, ou seja, se a taxa específica de crescimento do microrganismo é alta, a máxima rentabilidade esperada na produção de proteína microbiana resulta em elevadas concentrações de ácidos

nucleicos, levando à necessidade de submeter a biomassa a tratamentos que reduzam o conteúdo desses compostos (PARAJÓ *et al.*, 1995). A redução do conteúdo de ácidos nucleicos pode ser feita através de métodos químicos ou biológicos (ABOU-ZEID *et al.*, 1995). Os tratamentos químicos, baseados no uso de ácidos, bases e sais podem resultar na alteração do perfil de aminoácidos, bem como na formação de compostos tóxicos, ou ainda na redução da digestibilidade das proteínas. Procedimentos enzimáticos são baseados na utilização de nucleases as quais, além de possuírem alto custo, atuam muito lentamente (PARAJÓ *et al.*, 1995). Modificações das condições de cultivo com respeito às concentrações de nutrientes podem ser usadas na redução de ácidos nucléicos, pois o conteúdo de RNA das células de leveduras depende da relação carbono e nitrogênio no meio (LITCHFIELD, 1983) e este parece ser uma forma que impacta de maneira menos onerosa, os custos desse processo.

Em relação a empresas com desenvolvimento de processos nessa área, Ericsson *et al*, em 1981, realizaram estudos sobre a Norprotein, uma subsidiária do grupo químico norueguês Norsk Hydro A.S. e a empresa de alimentos sueca AB Marabu. Desde 1974, a atividade principal da pesquisa nessas empresas foi o de desenvolver um processo para a produção de proteínas de unicelular – do metanol. Atualmente, as atividades de investigação são direcionadas no sentido de encontrar aplicações alternativas para a tecnologia desenvolvida dentro do campo da biotecnologia.

Chesnais, em 1982, identificou o início da inovação biotecnológica com o investimento em pesquisa e desenvolvimento de plantas piloto desde meados de 1960 para produzir proteína de unicelular (*Single Cell*) de uma variedade de substratos (petróleo, gás natural, material agrícola, subprodutos de processamento de alimentos e de emissões de gases de efluentes).

Dentre os setores industriais previstos no trabalho de Chesnais que poderiam ser seriamente afetados pela era da biotecnologia seria o setor de alimentação. O novo perfil do setor de alimentos previsto para as décadas seguintes apresentaria um maior ajuste com o setor químico, de forma a intensificar o intercambio e até a fusão entre estes ramos industriais. Os autores sugerem que com o advento de novas fontes de proteínas, baseadas em hidrocarbonetos ou em matérias renováveis, haverá maiores inovações em tecnologias baseadas em enzimas, complementados pelo avanço da engenharia genética. Ao mesmo tempo, estas motivações ofereceriam a perspectiva de uma fonte alternativa renovável ao petróleo como material base dos produtos químicos (Sorj *et al*, 1984).

Embora a previsão de tempo futuro e a magnitude destas mudanças ainda necessitariam de análises mais detalhadas, é bom notar que os autores enunciam que a expansão nas exportações dos Estados Unidos já se concentravam em alimentos para animais. Assim em 1979, a importação de soja dos Estados Unidos chegou à 2,3 bilhões de dólares. O esforço consciente desenvolvido pela União Soviética para conseguir autossuficiência em alimentos animais através da produção do SCP os colocou igualmente em um sério desafio às exportações de grãos alimentícios dos Estados Unidos na época, com os efeitos correspondentes no comércio mundial. Um estudo na época calculou que a produção de SCP na União Soviética chegou a 1,1 milhões de toneladas e que mais da metade desta produção se baseava em fontes de matérias primas diferentes das já citadas (Sorj *et al.*, 1984).

É evidente que biomassa microbiana tem sido considerada uma alternativa às fontes convencionais de alimentos ou rações. Segundo Nasseri, *et al*, (2011) existem processos em larga escala para a produção de SCP que mostram características interessantes, tais como:

- A grande variedade de metodologias, matérias primas e os microrganismos que podem ser usados para esta finalidade.
 - Alta eficiência na conversão de substrato.
 - Alta produtividade, derivada da taxa de crescimento rápido de microrganismos.
 - Independência de fatores sazonais.

Hacking, em 1986, fez um levantamento sobre custos operacionais de 5 processos reunidos antes do aumento dos preços do petróleo em 1979.

O foco da empresa ICI, na Inglaterra (que era uma planta de produção de proteínas de unicelulares) tinha como principal objetivo em sua construção, ganhar experiência em uma escala de fermentação, com grande tecnologia. Muitas plantas de SCP se encontravam em operação na União Soviética, que possuía uma escassez de alimentos para animais, aliada a um excesso aparente de matéria prima a partir de hidrocarbonetos.

Não existiam dados sobre os custos destas plantas e nem a ICI publicou informações de seus custos operacionais, de modo que todo o material para consulta disponível relacionava-se com as plantas projetadas com base em trabalhos de laboratório ou em escala piloto. No entanto, esses custos têm muitas semelhanças e demonstraram a inviabilidade econômica destes processos sob as condições prevalecentes daquela época. Na tabela 2.2, podem ser vistos os custos

operacionais quanto uma divisão dos custos de capital para o processo da ICI Pruteen, na Inglaterra, obtidas pelo autor em artigo de Ericsson *et al*, em 1981.

Os processos listados na tabela 2.2 são todos para alimentação animal, todos eles usam metanol como substrato e, todos eles são projetados para operação contínua com fermentadores com do tipo *air lift* e eles têm floculação inicial e mecânica de desidratação para a recuperação do produto. Estes representam as fases posteriores de desenvolvimento de SCP e ilustram como as pressões econômicas rigorosas causaram uma convergência no projeto. Ficou evidente que o metanol era o custo de operação mais importante e este foi ampliado quando os custos de produção para estes processos foram recalculados usando os preços do metanol após 1979, que eram de 150 dólares ou mais por tonelada.

Quando o armazenamento, embalagens, serviços e tratamento de efluentes são incluídos, existe um diferencial de custos em toda a operação alcançando 20% do total. Isso é interessante, tendo em vista as realizações de publicidade e engenharia associadas à concepção, construção e montagem de um fermentador de 150 m³ (Hacking, 1986). No processo Norprotein, compreendia um grande fermentador airlift, com uma capacidade de 2000 m³, uma capacidade de escala exponencial de 0,75 foi estimada de acordo com Bartholomew & Reisman, em 1979, no entanto, Hacking lembrou que o tamanho máximo da maior parte do equipamento utilizado é atingido nesta escala. Se quatro fermentadores são instalados para alcançar a mesma capacidade total de 100.000 toneladas por ano, aumentam os custos de investimento de 9% (Hacking, 1986).

Tabela 2.2: Custos operacionais do processo (1000.000 t por ano) de *SCP* a partir de metanol. Adaptada de Hacking (1986)

	Norprotein (%)	CTIP (%)	Hoechst/Uhde (%)	ICI (%)	SRI International (%)
Metanol	51	50	46	59	49
Outras substâncias químicas	19	28	20	17	28
Utilitários	16	15	23	24	15
Trabalho	9		4	-	2
Manutenção e administração	5	7	7	-	6
Preço do metanol	550 NKr t ⁻¹	NA	200 DM t ⁻¹	NA	107 US \$ t ⁻¹

Uma divisão dos custos de capital para o processo ICI Pruteen mostrou que a operação downstream de desidratação, contribuía mais do que o fermentador e os equipamentos de compressão para a realização de transferência de gás.

Em relação a trabalhos nacionais mais recentes nessa área, a empresa Petrobrás, 1987, prevendo uma acentuada expansão da indústria do Gás natural (GN) no Brasil (Costa, 1988), iniciou um projeto de produção de proteínas a partir do gás natural, nos laboratórios do Centro de Pesquisas da Petrobrás (CENPES), pelo Setor de Biotecnologia e Meio Ambiente, Divisão de Tecnologia de Processos (Queiroz, *et al*, 1987).

A expectativa na época era de uma acentuada expansão da indústria do gás natural no Brasil como consequência dos resultados que vinham sendo alcançados pela PETROBRÁS na busca desse produto, cujos níveis de reserva e produção apresentavam continuo crescimento. Em maio de 1987, o Presidente da República, com incentivo da Comissão Nacional de Energia, aprovou a instituição do Plano Nacional de Gás Natural, que tinha por objetivo atingir um uso final de 24 milhões de m³/dia em 1991 e de 35 milhões em 1995, com base no desenvolvimento da produção nacional, elevando de 2% para 5% a participação do gás natural na matriz energética brasileira (Costa, 1988).

Em 1995, Furigo estudou o processo de produção de proteínas celulares ou *single cell protein* (SCP) a partir de uma cultura mista de bactérias, cujo principal constituinte foi a bactéria *Methylococcus capsulalus* (Bath), cultivada continuamente em um fermentador agitado clássico com temperatura e pH constantes, em meio contendo amônia como fonte de nitrogênio limitante do crescimento. O gás natural foi utilizado como a única fonte de carbono e energia e o ar foi empregado como a fonte de oxigênio. A fermentação, no entanto foi realizada sem assepsia. O autor propôs um modelo para representar o crescimento celular com limitação de amônia, levando-se em consideração observações experimentais que sugeriam o acúmulo de carbono na célula. O excesso de nitrogênio mostrou-se uma preocupação tecnológica importante no processo de produção dos microrganismos metilotróficos, uma vez que este excesso provocaria a produção de nitrito que, em determinado nível, inibia o crescimento da cultura. Testes dinâmicos experimentais de pulso de amônia foram realizados e as concentrações de nitrito, nitrato e amônia foram acompanhadas e a resposta experimental transiente aos pulsos de amônia apresentou picos característicos de concentração de nitrito e nitrato no meio fermentativo, o que representa um dado importante durante o processo.

Verifica-se que os trabalhos voltados para a produção de proteínas a partir de fontes de carbono único datam da década de 80 e, atualmente não são encontrados muitos estudos relacionados ao assunto. Em relação à produção de proteínas, há estudos, porém utilizando outras fontes como substratos, diferentes do metano e metanol.

2.2 Espécies consumidoras de fontes de carbono único como substrato

O uso do metanol e metano como substrato descrito para o crescimento de microrganismos, data de 1970 por Whittenbury e colaboradores. Estes pesquisadores isolaram bactérias Gram negativas, aeróbicas estritas e estas utilizavam metano e metanol entre outros tipos de substratos para seu crescimento.

Asthana *et al* (1971) isolou leveduras em pomares capazes de crescerem em um meio mineral com metanol e estudaram a influência de sua concentração bem como da temperatura na produção de biomassa. Em trabalho publicado, em 1973, por Harrison foram relatadas dificuldades de se obterem culturas puras quando estas eram isoladas a partir de metano como substrato. A bactéria usada foi *Pseudomonas extorquens*, que apresentou uma alta afinidade para o metanol, bem como para o formaldeído e formato.

Em estudos de Patt, et al (1974), um metilotrófico facultativo foi estudado em detalhes. Este organismo tinha pares arranjados de membranas intracitoplasmáticas perifericamente, características dos metilotróficos obrigatórios. Este isolado aparentemente utilizava a via metabólica da serina para a fixação de formaldeído. A localização de espécies oxidantes de metano em um lago dimítico¹ indica que estes organismos preferem níveis menores de saturação de oxigênio dissolvido e os experimentos de laboratório confirmaram a preferência destes organismos para atmosferas que continham menos oxigênio. As espécies *Methylosinus sporium* e *Methylosinus trichosporium* foram usadas em alguns experimentos para comparação com os isolados obtidos por Patt. Na tabela 2.1, retirada de Patt, et al (1974) são mostrados os substratos testados como única fonte de carbono e energia para os isolados e os dois isolados (*Methylosinus sporium* e *Methylosinus trichosporium*) estudados por Whittenbury (1970).

11

¹ Dimíticos: São lagos com duas circulações ou movimentações do corpo d'água, por ano, uma no outono e outra na primavera. Normalmente são encontrados em regiões temperadas. Essas circulações geram um tipo de estratificação térmica. (Burin, 2011).

A capacidade de utilizar o metano como fonte de carbono e energia foi demonstrada no trabalho de Patt et al, em 1974. Os requisitos para o crescimento em metano na ausência de outras fontes de carbono adicionadas foram mostradas incubando culturas em duplicata, com e sem metano. No crescimento de culturas em meio líquido foi demonstrada a dependência por metano. Os isolados cresceram em ágar com ou sem metano, mas na presença de metano, colônias visíveis tornaram-se laranjas com o passar do tempo. A dependência de metano para o crescimento foi também demonstrada utilizando um cromatógrafo a gás. Medições efetuadas em vários intervalos mostrou que o metano desapareceu e a massa em célula aumentou (Patt et al, 1974).

A partir da tabela 2.3 é possível verificar que as espécies Methylosinus sporium e Methylosinus trichosporium cresceram em metano, mas em nenhum dos outros substratos, exceto em metanol. O respectivo tipo XX, isolado no trabalho, por Patt et al foi capaz de usar metabolicamente diversificados compostos, incluindo os intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, açúcares, meios mais complexos e o próprio metano. Nas primeiras tentativas, os autores não conseguiram demonstrar crescimento de todos os isolados em metanol. Mas em trabalhos posteriores conseguiram obter o crescimento do isolado XX no meio mineral com metanol em 0,5%.

Tabela 2.3: Utilização das fontes de carbono e energia por bactérias metilotróficas (Retirada de Patt, 1974)

Carbon and energy sources	Isolate no.a							M. tricho-		
	7	4	1	14	12-7	9	XX	AA	M. sporium	sporium
Malate	+	+	+	±	+	+	+	+	_	_
Succinate	+	+	+	+	+	+	+	+	_	_
Acetate	±	+	+	++	++	+	+	+	-	_
Fumarate	±	±	±	+ '	+	±	+	++	-	_
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	_	_
Galactose	+	+	+	±	++	+	+	+	_	_
Sucrose	+	+	+	±	++	+	++	+	_	_
Ribose	-	-	-	±	±	-	±	±	_	_
Lactose	+	+	+	±	+	+	+	+	-	_
Propanol	_	-	-	_	_	_	-	_	-	_
Ethanol	_	-	-	_	±	_	-	_	-	_
Methanol	?	?	?	?	±	?	+	?	+0	+ *
None	_	-	_	-	±	_	-	-	_	-
Methane	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nutrient agar	+	+	+	+	+	+	+	+	_	_

^a +, Growth; -, no growth; ±, slight growth. ^b Results of R. Whittenbury.

Os resultados da incorporação de carbono mostraram que células cultivadas somente em glicose foram capazes de incorporar metano à massa celular. No cultivo de células em glicose

com várias transferências, a capacidade metilotrófica obrigatória é perdida. A capacidade das culturas estudadas para continuar a incorporar o metano indica que as células cultivadas em glicose possuíam, ou poderiam sintetizar, os sistemas de enzimas para o incorporação de metano. A incorporação desses dados também forneceu provas de que células cultivadas em metano iriam incorporar mais metano na presença de glicose do que na ausência deste açúcar. Isto indicou que o isolado XX poderia usar metano e glicose simultaneamente (Patt *et al*, 1974).

Metilotróficos foram então classificados como pertencentes aos tipo I ou tipo II. Esta divisão inicialmente foi feita com base em ultraestruturas de membrana, mas foi demonstrado que o caminho de assimilação de carbono segue a mesma divisão. Os organismos do tipo I possuem, membranas emparelhadas que consistem de um número de vesículas em forma de disco encontradas em todo a célula e usam a via da ribulose-5-fosfato para incorporação de formaldeído. Organismos do tipo II possuem um sistema de membranas pareadas envolvendo toda a célula ou agregadas na periferia e a via da Serina é o caminho para incorporar unidades de carbono único (Patt *et al*, 1974).

Os dados enzimáticos e as micrografías colocam o isolado XX de Patt *et al*, na categoria tipo II. Este isolado tem um ciclo do ácido tricarboxílico completo, como foi demonstrado em outro organismo tipo II; e a enzima chave da via serina, a hidroxipiruvato redutase, está presente, considerando que outros seres assimiladores de compostos de carbono único não a possuem.

El Nawawy e Gnan, em 1983, isolaram bactérias e leveduras capazes de crescerem a 0,1% de metanol a 37° C. As colônias isoladas foram repicadas e o crescimento testado em frascos cônicos de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido e incubados em agitador com rotações de 200 rpm na temperatura mencionada.

Datta & Ogeltree (1983) descobriram que a espécie *Butyribacterium methylotrophicum*, uma bactéria anaeróbia, podia converter metanol para butirato. Esta capacidade para produzir compostos de cadeia mais longa, a partir de substratos de carbono único poderia ser de importância comercial. As taxas de fermentação e formação de produto dependiam das proporções metanol e bicarbonato durante a fermentação.

Trotsenko *et al* (2005), realizaram um estudo sobre o potencial biotecnológico das bactérias metilotróficas aeróbicas. Os principais resultados encontrados pelos autores foram sobre a utilização do potencial biotecnológico dessas bactérias metilotróficas e metanotróficas para a obtenção de proteínas para alimentação animal, biopolímeros (polibutirato e polissacarídeos), enzimas (oxidoredutases), e bioprotetores (aminoácido ectoina), bem como para degradar

compostos tóxicos. Todas as ponderações e levantamentos desse estudo mostram o potencial das bactérias metilotróficas em vários campos da biotecnologia moderna, incluindo biocatálise e nanotecnologia.

Ivanova e outros (2006) usaram uma espécie de *Escherichia coli* modificada para produzir vitamina B12, demonstrando que existe uma associação entre vegetais e bactérias do grupo das metilotróficas para fornecer a estes vegetais a vitamina necessária e que estes não produzem. Isso demonstra a importância da associação entre essas espécies e outros seres vivos na natureza.

Lidstrom (2006) apresenta algumas rotas metabólicas de bactérias metilotróficas, como pode ser visto na figura 2.1.

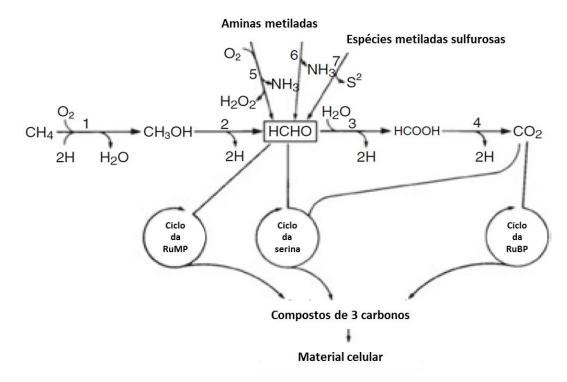


Figura 2.1: Metabolismo de compostos de um carbono em bactérias aeróbias metilotróficas. 1. Metano mono-oxigenase, 2. Metano desidrogenase, 3, Sistema de oxidação de formaldeído; 4 Formato desidrogenase; 5. Sistema de oxidação halometano; 6. Oxidases amina metiladas, 7. Desidrogenase amina metilada; e 8. Desidrogenase metilado sulfurada ou oxidase. Fonte: Lidstrom (2006)

Em estudo publicado por Jafari *et al* (2008), foi demonstrado que bactérias do gênero *Methylobacterium* podiam crescer em metanol e gerar biomassa rica em proteína, que seria destinada à produção de proteínas unicelulares. Por este estudo, cerca de 160 cepas metilotróficas foram isoladas a partir de solo ambiente do Irã e duas cepas selecionadas posteriormente. Estes isolados apresentaram boas propriedades para a produção de SCP (*single*

cell protein) através do metanol como substrato e os autores consideraram como boas características tecnológicas e econômicas de produção de SCP no Irã.

No referido trabalho os resultados mostraram um pH ideal na faixa de 8, com temperaturas entre 26 a 30 °C , aeração igual a 3 vvm, a agitação a 800 rpm e a concentração de metanol foi estabelecida em cerca de 18 g/L. Nestas condições, o coeficiente de rendimento $(Y_{X/S})$ encontrado foi de 0,52 g/g de metanol, a produção de biomassa seca foi de 20-25 g/L e o teor de proteína bruta foi de cerca de 70-78 % relacionada à quantidade total de biomassa bacteriana.

2.3 Bactérias Metanotróficas

Metanotróficas são bactérias que crescem em metano como única fonte de carbono e energia. O interesse por estas bactérias retornou, devido à importância em mitigar metano na atmosfera, sendo este um gás de efeito estufa e, em parte, devido à abundância e baixo custo do gás natural e seu potencial para criar produtos de valor agregado. Os metanotróficos então desempenham um papel importante no ciclo de carbono na natureza. Os últimos processos relacionados ao tema têm o potencial de desempenhar um papel na futura sustentabilidade energética (Methanotroph Commons, 2014).

Os metanotróficos podem ser organizados em uma categoria específica, chamada metilotrófica que compreende espécies que crescem em compostos de carbono com um ou mais átomos de carbono, como por exemplo, metano, metanol, metilamina, trimetilamina, conforme visualizado na figura 2.2. Podem apresentar metabolismo quase sempre obrigatório em relação à essas fontes de carbono, com crescimento apenas em metano ou, em algumas situações, em metanol, sendo este álcool, o primeiro intermediário quando a linhagem utiliza metano. Todos os metilotróficos compartilham dois desafios comuns: eles devem obter energia na forma de ATP e NAD(P)H por oxidação de seus substratos incomuns, e devem ter vias especiais para assimilação de carbono, onde todas as suas ligações carbono-carbono devem ser arranjadas novamente (Anthony, 1982).

Embora o primeiro metanotrófico tenha sido isolado em 1906, foi Whittenbury e colaboradores, em *et al* (1970) que também caracterizaram mais de 100 novas bactérias utilizando metano, estabelecendo ainda a base para a classificação atual dessas bactérias. Estes investigadores propuseram a separação de bactérias utilizando metano em cinco grupos com base

em diferenças morfológicas, as estruturas de membranas intracitoplasmáticas finas, e algumas características fisiológicas. Os gêneros propostos por Whittenbury *et al.* (1970) foram: *Methylomonas, Methylobacter, Methylococcus, Methylocystis, e Methylosinus*, são semelhantes aos atualmente aceitos, exceto para a adição de um novo gênero, *Methylomicrobium*.

Podem ser então classificadas como metanotróficas, as espécies que utilizam o metano como fonte de carbono e as metilotróficas são todas as espécies que utilizam não somente metano, mas outras fontes de carbono similares, em suas vias metabólicas.

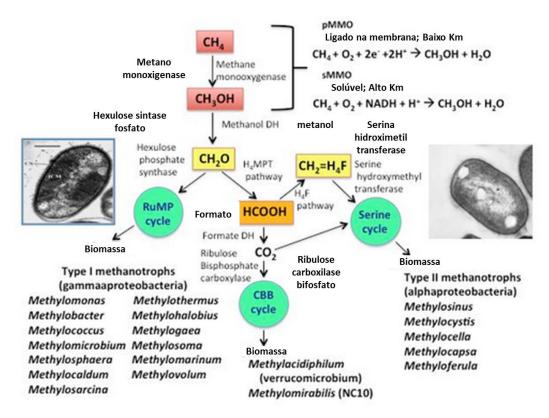


Figura 2.2: Visão geral de metanotróficos aeróbicos e suas vias metabólicas para a utilização de metano. Adaptado da página: http://methanotroph.org

2.3.1 Vias metabólicas em Metanotróficas

Até o momento, as bactérias metanotróficas estão separadas em três grupos filogenéticos principais: tipo I (gêneros *Methylomonas* e *Methylobacter*), tipo II (gêneros *Methylosinus* e *Methylocystise*) e tipo X (*Methylococcus capsulatus*). Esta divisão está fundamentada principalmente em diferenças morfológicas, nas estruturas das membranas intracitoplasmáticas, nas vias de assimilação do formaldeído (rota da Serina ou rota da Ribulose Monofosfato), na

habilidade de fixar nitrogênio, e em algumas outras características fisiológicas (HANSON e HANSON, 1996). A oxidação do metanol pelos organismos metilotróficos leva à formação de formaldeído que será, então, assimilado por essas bactérias e utilizado na biossíntese de material celular. A síntese de carbono para material celular a partir de formaldeído pode ocorrer por meio de duas rotas, a rota da ribulose monofosfato (RMP) ou o ciclo da serina.

Existem basicamente dois caminhos metabólicos pelos quais as células utilizam formaldeído para produzir material celular: A **rota da Serina** (células que utilizam este caminho têm o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) ativo e membranas internas do tipo II) e a **rota da Ribulose Monofosfato** (células que utilizam este caminho têm o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) incompleto e membranas internas do tipo I). Um esquema proposto por HANSON e HANSON, em 1996 se encontra na figura 2.3.

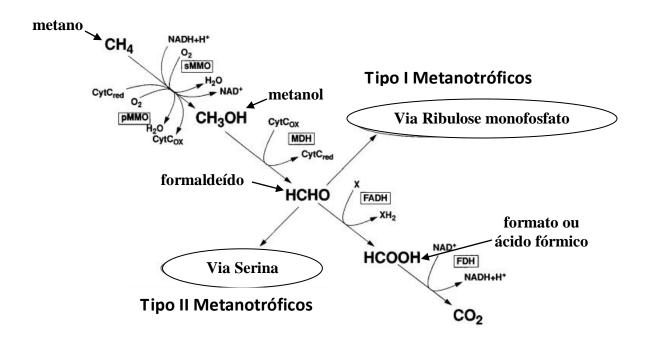


Figura 2.3: Esquema modificado da via metabólica geral, até o formaldeído nos dois tipos metanotróficos e na sequencia para a via Serina ou para a via Ribulose monofosfato.

A via Ribulose monofosfato foi primeiramente descrita por Quayle & Ferenci, em 1978. Nesta via, o formaldeído é combinado com a ribulose monofosfato através de uma condensação aldol² para formar hexulose-6-fosfato numa reação catalisada por *hexulosephosphate sintase* (HPS). A Hexulose-6-fosfato é convertida em frutose -6-fosfato por *hexulosephosphate isomerase* (HPI). Estas duas enzimas são exclusivas para o metabolismo de compostos de um carbono por metanotróficas do tipo I e tipo X e algumas outras que não utilizam o metano. A HPS do tipo microbiano obrigatório X, *Methylococcus capsulatus* (Bath) é uma enzima grande (310 kDa), hexamérica, ligada à membrana, enquanto que as enzimas de bactérias que não fazem utilização do metano parecem ser solúveis e menores (15,5 a 45 kDa), diméricas ou monoméricas (Hanson & Hanson, 1996). A *Hexulosephosphate isomerase* parece ser solúvel em muitos metanotróficos, embora mutantes sem HPS e HPI tenham sido isolados, os genes que codificam as proteínas não tenham sido sequenciados, e não se saiba se as sequências de aminoácidos destas enzimas ou as sequências de nucleotídeos dos genes que os codifica estejam conservados em bactérias metilotróficas.

Na segunda (clivagem) parte da via RuMP, a frutose-6-fosfato produzida na primeira parte da via é convertido em ácido 2-ceto-3-desoxi-6 fosfogluconato e este composto é clivado para produzir o piruvato e gliceraldeído-3-fosfato. Na terceira (rearranjo) parte da via, o gliceraldeído fosfato e moléculas de frutose -6-fosfato submetem-se a uma série de reações que conduzem à regeneração da ribulose-5-fosfato para completar o percurso. As enzimas da via de clivagem encontram-se em bactérias heterotróficas que empregam a via Entner-Doudoroff para o metabolismo da glicose, e o rearranjo de reações são idênticos aos encontrados em algumas bactérias autotróficas (Quayle, 1980). Tem sido sugerido que a via da RuMP (figura 2.4) seja um precursor evolutivo do ciclo de Calvin (Quayle & Ferenci, 1978).

-

 $^{^2}$ Reação aldol é uma reação importante da formação de ligação carbono-carbono na química orgânica. Consiste no ataque de um fon enolato de um aldeído ou cetona sobre a carbonila de outra molécula de aldeído ou cetona para formar um β-hidroxialdeído, ou "aldol" (aldeído + álcool), ou uma β-hidroxicetona. Se o produto da adição aldólica perde uma molécula de água (desidrata) o produto final é um aldeído ou cetona α , β -insaturada. Isto se conhece como condensação aldólica.

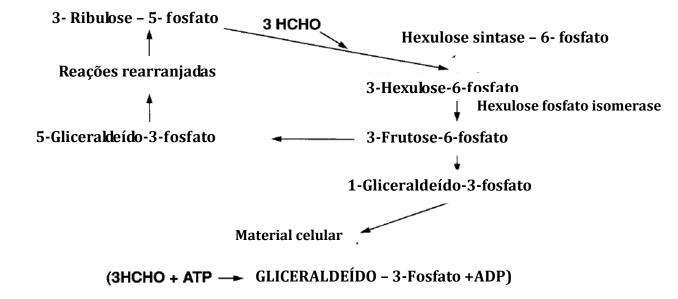


Figura 2.4: **Via da Ribulose Monofosfato** para a fixação de formaldeído. As reações são catalisadas por duas enzimas únicas desta rota metabólica: hexulose fosfato sintase e hexulose fosfato isomerase. Fonte: Hanson & Hanson (1996).

A via da serina difere de outras vias de assimilação de formaldeído na natureza por seus intermediários, que são ácidos carboxílicos e ácidos aminados em vez de hidratos de carbono, e na enzima chave de assimilação do formaldeído, a serina *transhydroxymethylase* que catalisa a adição de formaldeído para a glicina, produzindo assim, o intermediário chave na via da serina. A via foi elucidada no ano de 1973 (Anthony, 1982).

Esta via metabólica atua em bactérias durante o crescimento em uma variedade de compostos de carbono único variando em nível de redução entre o metano e formiato. Para conseguir isso, a primeira parte da via (a síntese de fosfoglicerato de glioxilato) está dobrada. Duas moléculas de formaldeído contendo dois glioxilatos geram duas moléculas de 2-fosfoglicerato. Uma é assimilada a material celular na forma de 3-fosfoglicerato, enquanto a outra é convertido para fosfoenolpiruvato (PEP), cujos rendimentos de carboxilação a oxaloacetato são subsequentemente a malyl-CoA. Na parte final do percurso da malyl - CoA esta é clivada a glioxilato além da acetil-CoA, cuja oxidação completa o ciclo do glioxilato. Existem duas variantes da via de serina, diferindo na forma como o final da oxidação de acetil-CoA para glioxilato é alcançado. No icl + (isocitrato positiva), a via da serina envolve um ciclo do glioxilato no qual a isocitrato liase é a enzima chave. Esta enzima está ausente a partir de bactérias, tais como a *Pseudomonas* AMI, que não têm isocitrato liase. Em tais bactérias com o

icl – a via da serina, a via para a oxidação de acetil-CoA não tenha ainda sido completamente elucidada, mas pode envolver a homoisocitrato liase e uma homoisocitrato - liase glioxilato no qual todos os intermediários são homólogos daqueles do ciclo do glioxilato (Anthony, 1982).

A via da serina tem de ser capaz de fornecer os precursores para a biossíntese de todos os componentes celulares do substrato de carbono único. Para a biossíntese de carboidratos de fosfoglicerato, as enzimas gliconeogênicas usuais são também necessárias e o piruvato será produzida a partir de PEP por meio de piruvato-quinase. A via da serina é demonstrada na figura 2.5, uma vez que funciona a partir da síntese de duas moléculas de fosfoglicerato contendo um dos CO₂.

Nessa rota da serina, todos os átomos de carbono para a síntese de material celular são derivados do formaldeído, sendo a serina hidroximetil transferase (STHM) a enzima-chave (e única) deste caminho metabólico. Em algumas células, a rota da serina é realizada duas vezes. Durante a segunda rodada, o oxaloacetato e condensado com acetil-CoA para formar citrato, que eventualmente é clivado a succinato, podendo ser incorporado ao material celular.

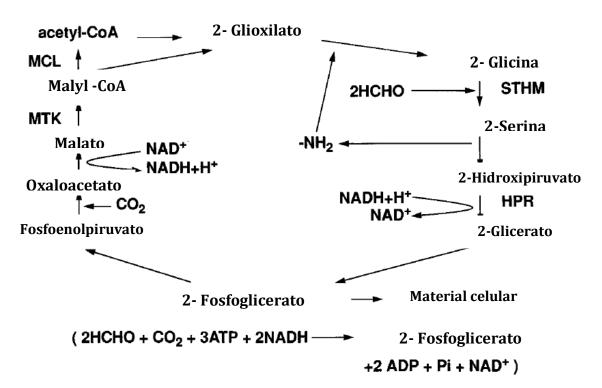


Figura 2.5: **Rota da Serina** para a fixação de formaldeído. Abreviaturas: **STHM**, serina hidroxi-metil transferase; **HPR**: hidroxi-piruvato redutase; **MTK**: malato tioquinase; **MCL**: malil coenzima A liase. Fonte: Hanson & Hanson (1996).

2.4 Gênero Methylobacterium

O gênero *Methylobacterium* é composto de uma variedade de bactérias metilotróficas conhecidas como PPFMs (*pink pigmented facultatively methylotrophic*), ou seja, metilotróficas facultativas rosa-pigmentadas, que podem crescer em compostos de um carbono como formiato, formaldeído e metanol como única fonte de carbono e energia, bem como sobre uma vasta gama de substratos de crescimento multi carbonos. Muitas, mas não todas as cepas podem crescer em ágar nutriente, e algumas podem crescem em aminas metiladas. Foi relatada que uma estirpe era capaz de utilizar o metano como fonte de carbono (Green, 2006).

Membros do gênero *Methylobacterium* são bem distribuídas na natureza e, portanto, são encontrados em uma variedade de habitats (Green & Bousfield, 1981; Green & Bousfield, 1983), incluindo solo, poeira, de água doce, sedimentos lacustres, superfícies de folhas e nódulos, grãos de arroz, ar e ambientes hospitalares, e em vários produtos e processos, por exemplo, como contaminantes em preparações farmacêuticas como cremes para o rosto. Como um organismo comum no ar, as PPFM podem ocorrer em uma grande variedade de processos comerciais onde as condições de crescimento são favoráveis, incluindo vários processos de fermentação. As bactérias PPFM são aeróbias estritas e podem ser isoladas de qualquer ambiente de água doce caso exista algum oxigênio dissolvido.

2.4.1 Espécie microbiana - Methylobacterium organophylum - DSMZ - 18172

A bactéria *Methylobacterium organophylum* é uma espécie metilotrófica facultativa, que pode crescer também em metano e outros compostos de carbono, conforme experimentos conduzidos por PATRAS & TANG, 1988.

Algumas cepas PPFM de *Methylobacterium organophilum* foram isoladas de um termoclino (termo em inglês, metalimnion³) no Lago Mendota, EUA. Somente nesta camada estratificada durante os meses de verão, em que o metano estava disponível sobre reduzidas tensões de oxigênio, onde a sua oxidação aeróbia ocorre. Na verdade, por causa da capacidade da espécie, em metabolizar diversos produtos de degradação presente na planta, como o metanol,

21

³ Metalimnion é uma camada fina, mas distinta em um grande volume de fluido (lago ou oceano), no qual a temperatura muda mais rapidamenbte com a profundidade do que acontece em camadas acima ou abaixo dele.

metilamina, vários outros compostos metilados, e (em alguns casos) metano, as bactérias PPFM podem desempenhar um papel ecológico importante no ciclo do carbono na natureza. Além disso, sua capacidade para resistir a certo grau de desidratação e eliminação de pequenas quantidades de nitrogênio e carbono (Observações de P. N. Green, não publicados) as torna bem adequadas para a sobrevivência em ambientes estressantes (Green, 2006).

Em relação à etimologia do termo *organophilum*, sabe-se que a palavra é formada de tal forma que se trata da união de um substantivo *organo* = **órgão**, **corpo vivo**; com um adjetivo, *philos* = **afinidade**. O epíteto específico no nome da espécie, *Methylobacterium organophilum* **sp. nov**., denota, desta forma, a preferência desta espécie por fontes de carbono e energia, mais complexas do que o metano (Patt *et al*, 1976). Esta bactéria difere de todos os gêneros e espécies que foram descritos anteriormente, na sua capacidade de utilizar uma variedade de substratos orgânicos com ligações carbono-carbono, como fontes de carbono e energia. A via para a oxidação de metano e a assimilação das unidades de um carbono é reprimida durante o crescimento em substratos orgânicos complexos. Ou seja, a mesma pode crescer em substratos mais complexos, seguindo outras vias metabólicas. É a única espécie em que foi relatada a capacidade de utilização do metano como fonte de carbono e energia, mas essa capacidade pode ser facilmente perdida se as culturas não forem mantidas em suporte inorgânico em atmosfera de metano (Hanson, 1980). Imaginou-se que a capacidade deste organismo em assimilar metano se deva a um plasmídeo.

Trata-se de bactéria com a forma de bacilo (figura 2.6), sendo gram negativa e classificada como o Tipo II, de acordo com seu arranjo de membrana e assimiladora de compostos de carbono pela via serina. A maioria é móvel por flagelo polar e tem uma proporção de (G+C) de 66%.

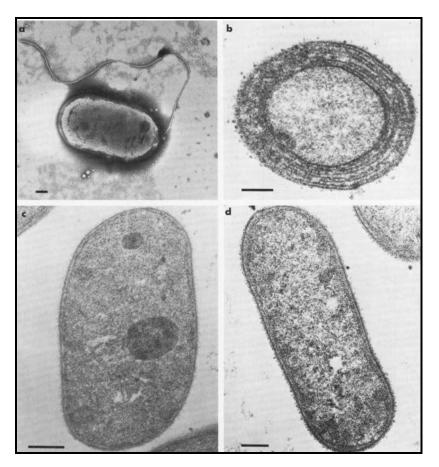


Figura 2.6: Microscopia da espécie *Methylobacterium organophylum*. *a* - A mancha negra mostra a espécie em ácido fosfotúngstico⁴, (b) crescimento em metano, (c) crescimento em glicose e (d) crescimento em metanol. As barras representam 0,2 µm. Fonte: Patt, *et al* (1976)

A espécie é descrita como metanotrófica facultativa e usada para muitas investigações bioquímicas, sendo uma estirpe que acumula usualmente poli-3-hidroxibutirato (PHB) e é catalase e oxidase positiva. Apresenta semelhança estrutural com a espécie *Methylococcus capsulatus* por ter fosfatidilcolina, esqualeno e esteróis nas membranas (Patt *et al*, 1976).

2.5 Aplicações biotecnológicas das espécies do gênero Methylobacterium

Green (2006) propôs que as estirpes do gênero *Methylobacterium* tem potencial para a produção de proteína de célula única (*single cell protein*) a partir de metanol, suas taxas de bioconversão (formação de massa celular por substrato consumido) são inferiores as de outras

⁴ Ácido fosfotúngstico é utilizado como um corante negativo em microscopia de transmissão

metilotróficas. No entanto, cepas PPFM têm sido utilizadas nos últimos anos, em plantas integradas de aproveitamento do metanol para *single cell protein*, com boa bioconversão, e em processos de fermentação para a produção de várias coenzimas (coenzima Q₁₀); aminoácidos (L-lisina, L-tirosina, L-fenilalanina e ácido L-glutamico); e vitaminas (vitamina B₁₂) e como uma fonte de poli-β-hidroxibutirato (Stirling e Dalton, 1985; Hou, 1984). Seus pigmentos carotenóides, têm sido testados como corantes na indústria de alimentos, também tendo aplicações comerciais.

A facilidade com que as cepas PPFM podem ser isoladas de amostras ambientais e seu (ainda que provisório) vínculo com emissões veiculares sugerem possíveis usos para estes organismos como indicadores de poluição ambiental. Em particular, a capacidade de algumas estirpes de crescer na presença de partículas de material de exaustão (fuligem) é interessante. A evidência de que alguns destes organismos podem crescer em alguns do policíclicos hidrocarbonetos aromáticos e hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa, segundo observações inéditas de Green (2006), sugere um possível papel para estas bactérias como monitores biológicos de poluição veicular. Além disso, várias cepas PPFM (Ito & Iizuka, 1971) tem mostrado resistência a irradiação de raios gama 10 a 40 vezes superior do que as toleradas por vários outras bactérias Gram-negativos examinadas e em uma resistência semelhante ao intervalo tolerado por Deinococcus (Micrococcus) radiodurans sob certas condições experimentais. Esta resistência, juntamente com suas colônias pigmentadas facilmente identificáveis, podem fazer com que algumas cepas PPFM sejam candidatas adequadas para controle de qualidade de irradiação no monitoramento dos alimentos e embalagens indústrias. A capacidade de M. thiocyanatum (e provavelmente outras cepas de Methylobacterium) para tolerarem e degradarem relativamente altos níveis de cianato e tiocianato podem ter usos na biorremediação de resíduos de tiocianato de vários processos de fabricação. Da mesma forma, seu uso para tratamento biológico de efluentes industriais (por exemplo, dicloromethane em águas residuárias) continua a ser um possibilidade a mais de estudo para esse gênero. A característica que algumas espécies de bactérias metanotróficas possuem de, comprovadamente, fixar nitrogênio atmosférico deixa em destaque no setor agrícola.

A aplicação dos metanotróficos vai além dos processos para a produção de proteína de unicelular destinada à alimentação animal, já que tais microorganismos produzem diversos produtos de interesse industrial através de metabolismo fermentativo, como solventes, biopolímeros, fármacos, produtos da química fina, dentre outros. Isto permite identificar

diferentes segmentos industriais importantes (Figura 2.7) nos quais as aplicações dessas células bacterianas são possíveis (Pereira Jr, 2012). Existem 32 patentes que tratam de tecnologias para a produção de 11 compostos diferentes. Destaque para as tecnologias de produção de alimentos, com base nos 17 documentos relacionados à produção de proteína microbiana a partir de gás natural (PPGN), carotenóides, lipídeos e antioxidantes. A produção de solventes, produtos da química fina e da "biopetroquímica" também são explorados a partir dos metanotróficos, polímeros, isoprenóides, terpenóides, óxido de propileno e o próprio metanol (Pereira Jr, 2012).

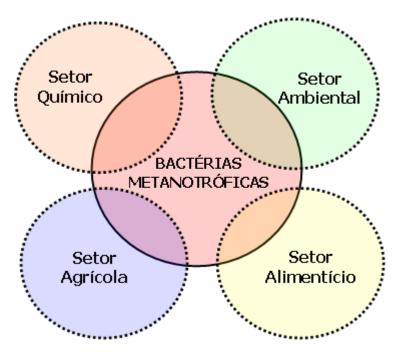


Figura 2.7: Exemplos de aplicação das bactérias metanotróficas em diferentes setores industriais

2.6. Enzimas envolvidas na via metabólica de Methylobacterium organophylum

Várias enzimas foram estudadas em *Methylobacterium organophilum* cultivadas em diferentes substratos. As enzimas que estão envolvidas no crescimento de compostos de carbono único foram induzidas pelo metanol e não são reprimidas por succinato, como estudado por Anthony & Williams, em 2003. Quando as bactérias cresceram em succinato e foram ressuspensas em meio contendo metanol, quatro enzimas únicas para o crescimento de C₁, os compostos (*hydroxypyruvate redutase*, amino transferase serina-glioxilato, metanol desidrogenase e glicerato quinase) foram completamente induzidos pelo tempo de crescimento. Quando as bactérias crescidas em metanol foram novamente suspensas em meio contendo

succinato, todas as quatro atividades enzimáticas diminuíram. Vários mutantes incapazes de crescer em carbonos simples foram analisados por deficiências nas enzimas específicas para o crescimento destes compostos. Sete dos mutantes eram pleiotrópicos, e seis não foram reversíveis por agentes químicos mutagênicos, o que sugere a possibilidade de ligação genética ou na presença de um regulador para os genes envolvidos no metabolismo do carbono (Anthony & Williams, 2003). A enzima chave, a metanol desidrogenase pode ser vista na figura 2.8.

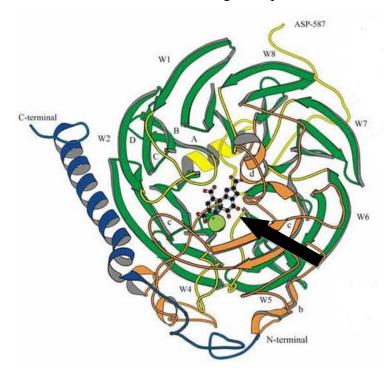


Figura 2.8: As unidades $\alpha\beta$ da enzima metanol desidrogenase simplificados para mostrar os fios β na longa cadeia α - hélice da subunidade β . A PQQ como um grupo prostético é mostrado na forma do esqueleto e o íon de cálcio como uma pequena esfera, conforme está indicado pela seta. Fonte: Anthony & Williams (2003).

Sabe-se que a enzima metanol desidrogenase oxida o metanol a formaldeído no periplasma de bactérias metilotróficas e contém um grupo central, denominado PQQ, pirroloquinolinequinona (figura 2.9). Por volta de 1980, o termo quinoproteína foi utilizado para incluir um número de desidrogenases bacterianas que contém a PQQ como seu grupo prostético em seus sítios ativos (Anthony & Ghosh, 1998).

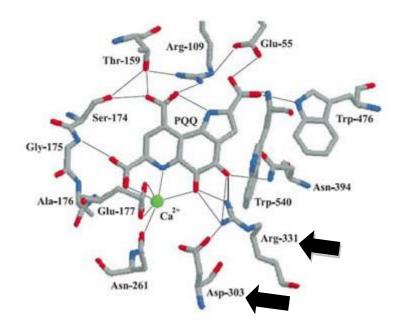


Figura 2.9: As interações equatoriais da PQQ (pirroloquinolinequinona) e a coordenação de Ca²⁺ no sítio ativo da MDH. A figura também mostra o sítio ativo proposto na base Asp303 e Arg331 (setas), que também podem estar envolvidos no mecanismo.

O isolamento e caracterização de *Methylobacterium organophylum* (Patt et al, 1974.; Patt, Cole & Hanson, 1976) permitiram o estudo da regulação da enzima de uma bactéria que utilizava o gás metano pela primeira vez. Estudos anteriores demonstraram que a capacidade de *M. organophylum* de oxidar metano e a síntese de membranas intracitoplasmáticas ocorria apenas em organismos cultivados em metano (Patt et al., 1974). Tais estudos são importantes na definição de marcadores para análises bioquímicas e genéticas do metabolismo de carbono simples, na oxidação do metano e na síntese de membranas.

Das enzimas das bactérias crescidas em metanol, metanol mais succinato e succinato, as que são específicas para a assimilação de carbonos único (*hydroxypyruvate redutase, amino transferase serina-glioxilato, glicerato quinase e transhydroxymethylase serina glioxilato ativada*) mostraram altas atividades em bactérias crescidas em metanol, baixas atividades em bactérias crescidas em succinato e atividades intermediárias (30 a 50% menores) em bactérias crescidas em metanol com succinato, conforme pode ser visto na tabela 2.4. As atividades enzimáticas em extratos de *M. organophilum* cultivadas em metanol, metanol mais succinato ou succinato. As atividades enzimáticas estão expressas como produto µmol min⁻¹ (mg de proteína)⁻¹, exceto onde indicado.

Tabela 2.4: Atividades enzimáticas em M. Organophylum. Retirado de O'Connor & Hanson, 1977.

Enzimas	Substratos de crescimento			
Enzinas	Metanol	Metanol + Succinato	Succinato	
Hidroxipiruvato redutase	0.58	0.38	0.14	
Serina-glioxilato aminotransferase	0.17	0.11	0.01	
Serina transhidroximetilase (glioxilato ativado)	0.10	0.06	0.005	
Metanol desidrogenase	0.09	0.08	0.03	
Formaldeído desidrogenase	0.11	0.11	0.02	
Glicerato quinase	0.15	0.07	ND	
Phosphoenolpiruvate Carboxilase	0.03	0.01	0.003	
Formato-tetrahidrofolato ligase	0.12*	0.03*	0.03 *	
N5-formiltetraidrofolato ciclodehidrase	4.7*	4.4*	4.9*	
Metilenotetrahidrofolato desidrogenase	0.29	0.27	0.05	
Malato sintase	0.007	0.006	0.016	
Citrato sintase	0.02	0.03	0.10	
2-oxoglutarato desidrogenase	0-001	0.013	0.086	

* Expresso como produto em nmol por mim -1 (mg proteína)-1 ND =Não Detectado.

A regulação da síntese de enzimas utilizadas exclusivamente para o crescimento de compostos C₁, na metilotrófica facultativa M. organophilum diferiam em alguns aspectos daquelas existentes na bactéria Pseudomonas AMI, que é utilizadora de metanol. Os autores sugerem que em ambas as bactérias, as enzimas envolvidas no crescimento em compostos de carbono simples foram induzidas por meio de metanol, e metanol desidrogenase não estava reprimida pelo crescimento em meio contendo metanol mais succinato.

Nenhuma das enzimas específicas para o crescimento de compostos de carbono simples testados foi fortemente reprimida por crescimento em metanol mais succinato em M. organophilum, apesar de ambos os substratos serem utilizados (O'Connor & Hanson, 1977). Além disso, as cinco enzimas específicas do metabolismo do carbono (hydroxypyruvate redutase, metanol desidrogenase, aminotransferase serina-glioxilato, glicerato cinase transhydroxymethylase serina-glioxilato ativada) foram alteradas quando as bactérias cresciam a partir de meio succinato para o meio de metanol, e foram diluídas quando as bactérias foram alteradas a partir de meio de metanol para meio succinato. Os resultados sugerem que estas enzimas são indutíveis, mas não reprimidas quando succinato é adicionado como uma fonte adicional de carbono e fonte de energia.

Duas enzimas do ciclo de Krebs foram reprimidas em bactérias que cresceram em metanol, o que indica que o Ciclo de Krebs não é tão importante em *M. organophilum* durante o crescimento em metanol como é durante o crescimento na presença de succinato.

Os autores concluíram que a desidrogenase metanol poderia estar sob controle separado, uma vez que não é reprimida por succinato e as outras enzimas são moderadamente reprimidas (O'Connor et al., 1977).

2.7 Metanol como fonte de carbono

O metanol, substrato utilizado neste trabalho, entra na produção de proteína de unicelular (*single cell protein* -SCP), representando uma fonte de carbono para as bactérias do grupo das metilotróficas. Porém o metanol é do ponto de vista operacional, de mais fácil manuseio, por ser solúvel em água e encontra-se mais puro podendo ser assimilado por diversos tipos microbianos.

Segundo Pinto (2013) o metanol possui baixo custo de produção favorecendo sua estabilidade econômica no mercado. No mesmo trabalho foram realizados estudos sobre os riscos de uma planta piloto de metanol seguindo uma Análise Quantitativa de Riscos, que mensura o risco quando do uso, transporte, manuseio ou armazenamento de substâncias perigosas durante a produção.

O metanol (CH₃OH) é um líquido incolor, volátil e com odor alcoólico levemente adocicado, sendo o mais simples dos alcoóis alifáticos, possuindo apenas um átomo de carbono em sua estrutura molecular (FIEDLER *et al*, 1994 *apud* Camargo, 2008). Sua reatividade é determinada pelo grupo funcional hidróxi, sendo, portanto completamente miscível em água, álcoois, ésteres e na maior parte dos solventes orgânicos, além de possuir uma razoável solubilidade em óleos e gorduras. Devido a sua polaridade, o metanol dissolve diversas substâncias inorgânicas, sendo uma das mais importantes matérias-primas químicas no mundo contemporâneo.

Assim como o etanol, o metanol é utilizado como insumo na produção de biodiesel, e após analisar as rotas de produção do álcool metílico (metanol) no Brasil, conclui-se que este é produzido em escala industrial a partir do gás natural de petróleo (Holanda, 2004 *apud* Camargo, 2007).

O metanol, também conhecido por álcool metílico, monohidroximetano, metil carbinol ou álcool de madeira, por exemplo, foi obtido pela primeira vez em 1661. Porém, somente a partir de 1830 a síntese do metanol através da destilação de madeira se consolidou. Foi apenas em 1913 que a BASF conseguiu produzir compostos orgânicos contendo oxigênio, inclusive o metanol (Camargo, 2008).

Os antigos epípcios usavam no processo de embalsamento, uma mistura que acredita que incluía o metanol. Este seria obtido da pirólise⁵ da madeira.

Em 1661, Robert Boyle isolou pela primeira vez o metanol mais puro e denominou como álcool de madeira.

Já em 1834, Jean Baptiste Dumas e Eugene Peligot determinaram a sua composição elementar. Em 1923, Mathias Pier desenvolveu uma forma de conversão entre uma mistura de monóxido de carbono (CO) e hidrogênio (H) em metanol. Usava-se como catalizador, o cromato de zinco em condições de pressão entre 300 e 1000 atm e uma temperatura de cerca de 400° C (GPC, 2014).

Atualmente, são conhecidas diversas rotas utilizadas na síntese de metanol, sendo o gás natural a matéria-prima mais utilizada na produção do metanol em todo o mundo, inclusive no Brasil. Constitui-se portanto em matéria prima para a produção de formaldeído e metil Tert-butil éter (MTBE) que é um aditivo para a gasolina.

A tecnologia de produção de metanol a partir de biomassa evoluiu muito nos últimos 20 anos, atingindo maior eficiência de conversão e menores custos, mas o conceito de integração completa da gaseificação, limpeza do gás e síntese do metanol não é ainda comercial.

Mas essa forma de obtenção do metanol tem atraído interesse de algumas empresas. A tecnologia, ainda experimental, compreende a preparação da madeira (eucalipto, no Brasil) com picadores; a gaseificação; limpeza do gás de síntese e reforma para CO e H₂, ajustando a razão molar CO/H₂ para 2. O gás resultante é comprimido e, por catálise, produz o metanol. A água é removida por destilação.

_

⁵ O processo consiste na degradação térmica de materiais orgânicos em ausência total ou quase total de um agente de oxidação como o oxigênio do ar. Em seus primórdios a pirólise tinha como principal objetivo a obtenção de carvão vegetal e é por isso que o processo era feito a baixas velocidades de aquecimento e a relativas baixas temperaturas finais.

Algumas das propriedades químicas do metanol são apresentadas na tabela 2.5.

Tabela 2.5: Propriedades Físico-Químicas do metanol . Fonte: Metanex (2014)

METANOL

Propriedades físicas e químicas

Concentração de saturação

9.1 Informações gerais:

```
Aspecto (a 20°C)
                                          : Líquido claro
Odor
                                          : Ligeiro odor a álcool
                                          : Incolor
```

9.2 Dados importantes sobre a saúde, a segurança e o ambiente:

```
Ponto/intervalo de ebulição
                                               : 64.5
                                                            °C (TCC)
    Ponto de inflamação
                                               : 11
                                              : 6 - 36
    Limites de explosividade
                                                            vol%
    Pressão de vapor (a 20°C)
                                               : 127
                                                            hPa
    Pressão de vapor (a 50°C)
                                              : 535
    Densidade relativa (a 20°C)
                                              : 0.792
    Hidrossolubilidade
                                              : Completa
    Solúvel na/no
                                               : Álcool etílico, éter, acetona,
                                               clorofórmio
    Densidade de vapor relativa
                                               : 1.1
                                               : 0.0006
    Viscosidade
                                                            Pa.s
    Coeficiente de repartição n-octanol/água : -0.82/-0.66
    Velocidade de evaporação
         relativa ao acetato de butilo
                                               : 5.9
         relativa ao éter
                                               : 5.3
9.3 Outros dados:
    Ponto/intervalo de fusão
                                              : -97.8
    Ponto/intervalo de fusão
Temp. inflamação espontânea
```

O custo da biomassa não é um dos fatores principais no custo da produção de metanol a partir dessa madeira. Na situação atual, os custos de produção e transporte da madeira atingiram apenas 15% do custo total de produção de metanol, contra 60% de conversão e 24% da distribuição. Isto indica o interesse no desenvolvimento da tecnologia para baixar os custos de conversão (Biodieselbr, 2014).

: 385

Uma futura rota para produção de hidrogênio a partir de biomassa passaria por processos análogos aos da rota para metanol. Em um momento futuro, se o uso do hidrogênio como vetor energético crescer como esperado, estes processos poderiam se tornar muito importantes. Estas avaliações iniciais de custos, e o potencial para biomassa no Brasil, recomendam aprofundamento das investigações em processos de gasificação (para energia elétrica ou metanol), mesmo com as restrições ambientais e de toxicidade do metanol (Biodieselbr, 2014).

Percebe-se que a indústria de metanol é uma das mais dinâmicas no mundo, produzindo uma molécula química básica que faz parte do bloco de construção química de tintas, solventes e plásticos, para aplicações inovadoras em energia, combustível para transporte e células de combustível.

A indústria de metanol se estende por todo o mundo, com a produção na Ásia, do Norte e do Sul, Europa, África e Oriente Médio. No mundo todo, mais de 90 plantas de metanol tem uma capacidade de produção combinada de cerca de 100 milhões de toneladas (cerca de 33 bilhões de galões ou 90 bilhões de litros), e todos os dias mais de 100.000 toneladas de metanol são usados como matéria-prima química ou como combustível para transporte (60 milhão de litros ou 225 milhões de litros).

Em 2013, a demanda global de metanol chegou há 65 milhões de toneladas impulsionado em grande parte, pelo ressurgimento do mercado imobiliário global e aumento da demanda por uma energia mais limpa.

O metanol é usado para produzir o ácido acético, o formaldeído, e um número de outros intermediários químicos, que são utilizadas para fazer uma infinidade de produtos ao longo da economia global e, em volume, o metanol é um dos cinco principais produtos químicos de base fornecidos em todo o mundo a cada ano. A indústria global de metanol gera US \$ 36 bilhões em atividade econômica a cada ano, impulsionando a criação de mais de 100.000 postos de trabalho em todo o mundo (Methanex, 2014).

A Methanex é a maior produtora e comerciante de metanol no mundo, com fábricas no Canadá, Chile, Egito, Nova Zelândia e Trinidad. Possui um extenso sistema de redes de comercialização e de distribuição global, sendo umas das maiores fornecedoras de metanol para cada um dos principais mercados internacionais de que faz parte (Methanex, 2014).

2.7.1 Metanol no mercado nacional e internacional

Segundo a ABIQUIM (Anuário Estatístico da Associação Brasileira da Indústria Química) 2012, o metanol encontra-se no momento em 32° lugar na lista de produtos mais importados pelo Brasil, segundo a lista de itens tarifários de maior importação do ano de 2010,

movimentando o montante de 173 US\$ MILHÕES - FOB⁶. Ainda segundo a ABIQUIM (2012) existem duas empresas que produzem metanol atualmente no Brasil, sendo elas a COPENOR (Ba), a GPC Química (RJ).

Segundo a COPENOR (2012) a planta de metanol produziu 77,8 mil toneladas em 2011, contra 79,4 mil toneladas em 2010, redução de 2,0%..

Parte da produção (25,4 mil toneladas em 2011 e 26,2 mil toneladas em 2010) é direcionada para consumo interno na produção de formol. As vendas de metanol produzido totalizaram 53,8 mil toneladas contra 55,1 mil toneladas no ano anterior, redução de 2,3%. No seguimento de revenda foram vendidas 68,1 mil toneladas contra 12,0 mil toneladas no ano de 2010, influenciado principalmente pelo incremento das vendas para novos mercados, o que esperamos venha se consolidar.

A GPC Química (2014), considerada uma das maiores produtoras de metanol do Brasil, apresenta uma capacidade produtiva anual de 220 mil toneladas de metanol, conforme pode ser visualizado na figura 2.11. A empresa está dividida em duas unidades de negócios: a unidade Metanol (antiga Prosint) e a unidade Resinas (a antiga Synteko), e essa união ocorreu em 2008.

O Grupo GPC entrou no ramo petroquímico em 1971, quando inaugurou a Prosint, fabricante de Metanol, mas em início de 1965, a chamada Prosint Produtos Sintéticos S. A. com sede na cidade do Rio de Janeiro, tinha um capital piloto de 10 milhões de cruzeiros (moeda da época) e como acionistas principais, alguns elementos da Refinaria de Petróleo, de Manguinhos S.A., com previsão de produção de 90 toneladas de metanol por dia (Revista de Química Industrial 1969).

De acordo com informações da fonte de consulta sobre importação e exportação, a *Radar Comercial*, China e os Estados Unidos são os maiores fornecedores de metanol para o Brasil, porém o Japão que seguia em terceira posição como fornecedor, em 2011, foi ultrapassado pela Coréia e Alemanha, assim como pela Índia, durante o ano de 2012. Há, portanto, uma mudança importante no cenário político e econômico mundial, em um espaço de tempo de um ano, no que

*Incoterms (International Commercial Terms) - Traduzido como Termos Internacionais de Comércio, os Incoterms determinam os direitos e obrigações mínimas do exportador e do importador quanto a fretes, seguros, movimentação em terminais, liberações em alfândegas e obtenção de documentos. Portanto a denominação é para cada US\$ 1000 - FOB.

⁶ A denominação (**FOB**) diz respeito a uma nomenclatura comercial que quer dizer "Free on Board". É a modalidade de *Incoterms** em que o exportador entrega a carga já desembaraçada a bordo do navio no porto de embarque indicado pelo importador. Todas as despesas no país de origem ficam a cargo do exportador. Os demais gastos, como frete e seguro, além da movimentação da carga no país de destino, correm por conta do importador.

se refere ao fornecimento de matérias primas e produtos utilizados pela indústria química brasileira. Os valores de importação pelo Brasil de países como Estados Unidos e Japão, somados, alcançaram três milhões e 600 mil US\$ FOB, em 2012. A China reconheceu o potencial de metanol e já produz cerca de 31 milhões de toneladas de metanol por ano. Até 2016, a capacidade de produção será ampliada em mais 20 milhões de toneladas (ABIQUIM, 2014).

Uma informação relevante em relação à exportação de metanol pelo Brasil é de que não há dados de exportação para o triênio 2009-2011, mas para o triênio 2010-2012, são apresentados dados de exportação para os países do México, Paraguai, Uruguai, sendo este último o maior comprador dentre os países citados e destacando esses dados de exportação para o ano de 2012, mais precisamente, sendo essa exportação passando de 32.000 US\$ FOB, em 2011 para 185.000 US\$ FOB, em 2012.

2.8 Análise sobre o processo de litotrofia e metilotrofia

As bactérias litotróficas são definidas como aqueles organismos que podem produzir energia útil metabolicamente por processos que dependem da oxidação de compostos inorgânicos. Três classes de bactérias litotróficas são reconhecidas nesta discussão. Estas são as bactérias quimiolitotróficas, as bactérias fotolitotróficas e as bactérias fotossintéticas azuis-verdes (algas azuis-verdes). Um quarto grupo, incluindo as bactérias metilotróficas também é considerado pelo autor por causa de suas semelhanças metabólicas para algumas espécies litotróficas.

Os quimiolitotróficos obrigatórios parecem não ter meios de obtenção de energia metabolicamente disponível a partir de seu ambiente, sem realizarem oxidações inorgânicas específicas. Os fotolitotróficos obrigatórios são igualmente dependentes da luz, bem como oxidações inorgânicas específicas. A "autotrofia" é utilizada para descrever a capacidade de algumas litotróficos para se desenvolverem em meios completamente inorgânicos, utilizando dióxido de carbono dissolvido como sua única fonte de carbono. A "mixotrofia" descreve a situação em que é feito uso simultâneo de fontes orgânicas e inorgânicas de carbono ou de energia, ou de ambos. A "heterotrofia" implica que toda a energia venha de oxidações orgânicas (crescimento quimioautotrófico), enquanto que os compostos orgânicos também fornecem mais carbono para a célula, com o dióxido de carbono como uma fonte secundária, assimilado pelos mecanismos anapleróticos estabelecidos (Donovan, 1971).

As características metabólicas compartilhadas por metilotróficos obrigatórios e litotróficos podem ter suas origens no metabolismo de alguns organismos ancestrais para toda uma gama de tipos microbianos atuais. Conceitos da cronologia da evolução da vida tem descartado a visão anterior dos quimiolitrotóficos como tipos primitivos ou ancestrais e os primeiros organismos realizavam provavelmente fermentação anaeróbica de compostos orgânicos, na presença de uma atmosfera redutora contendo metano, como exposto por Oparin, em 1957 no livro "The Origin of life on the earth". Os problemas de subseqüente evolução foram amplamente discutidos por Van Niel, Peck, e outros e é possível que quimiolitrotóficos anaeróbicos tenham se desenvolvido muito cedo, e antecederam os fotolitotróficos. fotoorganotróficos e fotolitotróficos, com o enxofre inorgânico, sem dúvida precederam os tipos de plantas, que produziam oxigênio pela fotossíntese (Donovan, 1971).

A oxidação do metano, por exemplo, pode ser um processo ancestral desenvolvido em organismos anaeróbicos como um tipo de fermentação, um precursor do ciclo do fosfato ribose para fixação em formaldeído e que poderia, assim, ter precedido o ciclo de Calvin. Numa atmosfera enriquecida em CO₂ por fermentação anaeróbia, os organismos poderiam ter surgido a partir da fixação do CO₂ para completar o seu metabolismo de carbono. O ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e o ciclo de Calvin poderiam, então, terem surgido como processos anabólicos, incluindo a fixação de CO₂, em anaeróbios. O ciclo do TCA pode ter se desenvolvido como um processo de rendimento de energia aeróbia muito mais tarde no processo evolutivo.

A existência de bactérias fotolitrotóficas redutoras de sulfato, talvez também de tipos *Clostridium* em épocas muito antigas provavelmente não permite que se especule sobre a ocorrência de um funcionamento mais avançado ou se ocorreu uma espécie de reversão do ciclo do TCA, ou mesmo se este surgiu primeiro ou se separadamente (Donovan, 1971).

Peck (1968) já especulava "que o crescimento em formaldeído representaria um intermediário estágio na evolução da autotrofia". É notável que, apesar de a capacidade de oxidar o metano (que levaria a metanol e a formaldeído) promova o crescimento e ser mantida hoje apenas por algumas metilotróficas, a utilização de formaldeído por litotróficos é notadamente uma característica comum.

Ribbons *et al* (1970) referem-se às metilotróficas como heterotróficos obrigatórios mas as ligações metabólicas atrelando-os aos litotróficos incluem a utilização de substratos de um carbono por alguns litotróficos. A espécie *Thiobacillus thiooxidans*, que possui a capacidade de utilizar compostos de ferro e enxofre, crescem em dissulfeto de carbono como a única fonte de

carbono e energia. No entanto a estequiometria deste processo não está disponível e não se pode dizer se isso é tecnicamente um processo autotrófico ou heterotrófico (Donovan, 1971).

O crescimento em monóxido de carbono pode representar um questionamento semelhante. O metano pode ser assimilado pelas bactérias fotossintéticas e por *Rhodopseudomonas* após oxidação para CO₂. A demonstração inequívoca de crescimento com metano como carbono e doador de energia não foi constatada, porém, *Rhodopseudomonas palustris* (uma bactéria fototrófica) pode crescer com formaldeído tanto como fonte de carbono quanto como doador de hidrogênio. Formiato de carbono foi fixado pelo ciclo de Calvin após a libertação de CO₂. *R. palustris* portanto funciona com formiato de uma maneira paralelo a *Pseudomonas oxalacticus*.

Trabalhos com *P. oxalaticus* já mostraram que a via autotrófica pode ocorrer exclusivamente com formiato, e que, na presença de substratos que permitem uma mais rápida taxa de crescimento, o formiato foi apenas oxidado como uma fonte de energia auxiliar (Donovan, 1971).

Em misturas de formiato e oxalato (que permitiu o crescimento a uma taxa 30 por cento mais lenta do que o crescimento no formiato), o uso autotrófico de formiato predominou (Blackmore *et al Apud* Donovan, 1971). O controle do ciclo de Calvin, assim, ocorre neste caso como em *Hydrogenomonas* por uma mistura de indução e repressão catabólica. A bactéria facultativa *Thiobacillus* A2 pode crescer em formiato num meio mineral, talvez com um metabolismo que se assemelha a *P. oxalaticus*. O crescimento lento em formiato foi obtido também com *Nitrobacter agilis* e *Nitrobacter winogradskyi*, que apresentaram um tempo de geração de cerca de 18 h em meios contendo nitrito e formato, mas continuou a crescer com um tempo de geração de 144 horas quando nitrito já havia se esgotado (Gool & Laudelout *Apud* Donovan, 1971).

Quando *T. novellus* foi cultivado heterotroficamente, não só a capacidade de oxidar tiossulfato foi perdida, mas de oxidar o formiato, assim como *Thiobacillus A2*, conforme estudado por Taylor & Hoare citado por Donovan, em 1971.

O crescimento heterotrófico de *N. agilis* resultou em repressão parcial de ambas as enzimas oxidantes de formiato e nitrito (Smith & Hoare *Apud* Donovan, 1971).

Diante destes estudos enumerados nessa revisão, é possível perceber que as prováveis relações filogenéticas entre metilotróficos e litotróficos ainda estão por serem resolvidas, mas na atual reformulação da terminologia destes organismos (Whittenbury, *Apud* Donovan, 1971),

alguns autores já argumentaram que o termo autotrófico poderia ser estendido para incluir todos os organismos dependentes de compostos de um carbono (Quimiottróficos e fotolitotróficos, metilotróficos, e usuários de formiato) e classificar os heterotróficos como seres que necessitam de compostos que contêm dois ou mais átomos de carbono ligados (Donovan, 1971).

Corroborando com a ideia de autotrofia, mais recentemente, em 2006, Elsaied e colaboradores, estudaram a primeira evidência molecular e visual para uma bactéria metanotrófica endosimbionte de um tipo de mexilhão, que carregava o gene RuBisCO cbbL, relevantes para autotrofia na fixação de CO₂.

A análise da sequência de rDNA 16S indicou que o mexilhão abrigava uma metanotrófica mono específica. Isto foi confirmado por amplificação e sequenciamento genético.

Sabe-se que a Ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase/oxigenase, vulgarmente conhecida pela abreviatura RuBisCO, é uma enzima envolvida no primeiro passo importante de fixação de carbono, um processo pelo qual o dióxido de carbono da atmosfera é convertido pelas plantas para moléculas ricas em energia, tais como glicose. É provavelmente a enzima mais abundante da proteína na Terra (ChemiWiki, 2014).

Porém encontrar essa enzima em bactérias metanotróficas abre uma infinidade de possibilidades de se entender o fenômeno da metanotrofia correlacionado a um tipo de autotrofia.

O Ciclo de Calvin, por exemplo, sendo uma "via metabólica encontrada no estroma do cloroplasto" de uma planta, envolve a entrada do carbono na via, na forma de dióxido de carbono e deixando a via na forma de açúcar (ChemiWiki, 2014). O trabalho da enzima RuBisCO é o de catalisar o primeiro passo do ciclo de Calvin por "criação de carbono a partir do dióxido de carbono inorgânico no ar", ou seja, uma via autotrófica bem estabelecida. Durante o primeiro passo, a fixação do carbono ocorre com a ajuda dessa enzima. A RuBisCO auxilia a molécula de dióxido de carbono a incorporar a ribulose bisfosfato, um açúcar de cinco carbonos, como pode ser visto na figura 2.10. O produto é uma molécula com seis carbonos que é dividida ao pela RuBisCO para formar duas moléculas de 3-fosfoglicerato com três átomos de carbono. A maioria do fosfoglicerato que é formado pela RuBisCO é utilizado para criar mais ribulose bisfosfato enquanto alguns dos fosfoglicerato continuam no caminho através do ciclo de Calvin para gerar sacarose ou amido para a planta. O Ciclo de Calvin continua após o apoio da RuBisCO durante o primeiro passo crucial (ChemiWiki, 2014).

É interessante notar que, mesmo que as enzimas sejam comumente relacionadas à aceleração de reações, a RuBisCO é até bastante lenta em comparação com outros enzimas. A

Rubisco pode fixar apenas algumas moléculas de dióxido de carbono por segundo, enquanto outras enzimas podem catalisar milhares de reações químicas por segundo.

Os vegetais são capazes de lidar com tal enzima em ritmo lento através da produção de muitas enzimas RuBisCO, o que explica porque ela é tão abundante nas plantas.

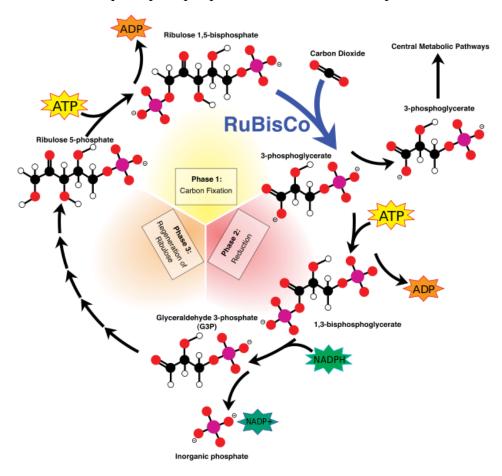


Figura 2.10: Ciclo de Calvin. Fonte: ChemiWiki, 2014.

Taylor e colaboradores estudaram em 1980, sobre a Ribulose 1,5- bisfosfato carboxilase, que catalisa a carboxilação da Ribulose 1,5- bisfosfato (RuBP), para se obter 3-fosfoglicerato e assim iniciar a redução da pentose no ciclo autotrófico de fixação do CO₂.

Os pesquisadores concluíram que quando isolada a partir de fontes eucarióticas, a RuBP carboxilase se dissocia em dois tipos de subunidades com pesos moleculares diferentes. No entanto, a RuBP carboxilase de *Pseudomonas oxalaticus*, *Rhodomicrobium*, *Thiobacillus intermedius*, *Chlorobium sulphatophilum* e *Rhodospirillum rubrum* possuíam estruturas com pesos moleculares diferenciados e com mais subunidades, sendo algumas compostas apenas do

tipo grande da subunidade, com atenção considerável a essa diversidade na estrutura por causa de suas possíveis implicações em relação a evolução da autotrofia.

A presença de RuBP carboxilase em *Methylococcus capsulatus* (Bath) foi preliminarmente relatada, sendo a primeira demonstração desta enzima em uma metanotrófica . O trabalho descreveu o isolamento e caracterização inicial de RuBP carboxilase a partir desta fonte microbiana.

Baxter e outros pesquisadores, em 2002, identificaram os genes que codificam a ribulose -1,5 - bifosfato -carboxilase/oxigenase (Rubisco) de Methylococcus capsulatus (Bath). Os genes que codificam a subunidade grande (cbbL), a subunidade pequena (CBBS) e gene regulador (cbbQ) foram localizados em um aglomerado. A análise filogenética da subunidade cbbL de M. capsulatus (Bath) a coloca dentro de um clado próximo de espécies clorofiladas. A subunidade cbbL foi expressa em M. capsulatus (Bath), quando cultivada com metano como única fonte de carbono e energia em condições tanto de limitação, quanto de maior concentração de cobre e a espécie foi capaz de um crescimento autotrófico em meio sólido, mas não em meio líquido. Preliminarmente, algumas investigações sugeriram que outras metanotróficas também poderiam ser capazez de um crescimento autotrófico. Os genes da Rubisco também foram identificados por PCR, em cepas de Methylococcus semelhantes, no entanto, nenhum gene da Rubisco foi encontrado Methylomicrobium, Methylomonas methanica, *Methylomonas* rubra, Methylosinus trichosporium OB3b ou Methylocystis parvus OBBP.

Chen e colaboradores forneceram, em 2010, a primeira prova inequívoca de um gênero de bactéria metanotrófica determinada como autêntica pelo grupo, (*Methylocella silvestris* BL2) como capaz de crescer em uma série de substratos multicarbono, dissipando a noção de que metanotrofia fosse um fenômeno obrigatório. A espécie *Methylocella silvestris* BL2 é uma metanotrófica aeróbica isolada originalmente de um solo florestal ácido na Alemanha. É a primeira metanotrófica facultativa totalmente autentica. Ela cresce não somente em metano como em outros substratos de um carbono (C₁), porém também em alguns compostos que contêm ligações carbono-carbono, tais como acetato, piruvato, propano, e succinato. Os pesquisadores expuseram a seqüência do genoma completo dessa bactéria.

Esses estudos demonstram que devem ser ainda realizados muitos estudos em vista do caráter próximo dos fenômenos de metanotrofia, metilotrofia e autotrofia. Há, portanto vias metabólicas do ponto de vista evolutivo, que mostram a possibilidade de haver um tipo de reutilização de subprodutos liberados durante a oxidação de alguns compostos que já são

conhecidos como parte da via metabólica clássica das espécies estudadas no grupo das metilotróficas, como é o caso do CO₂. O esclarecimento e uma visão mais acurada sobre esse fato podem abrir maiores investigações nessa área bioquímica.

De Marco, em 2004 faz questionamentos acerca da oxidação de compostos de carbono únicos durante seu doutoramento, na Universidade de Warwick. O autor trabalhou com oxidantes de metanol e metano e indagou sobre a descrição de organismos heterotróficos, não metilotróficas ou com metabolismo não metilotrófico dentro do grupo de metilotróficos facultativos. No entanto, o autor tenta descrever alguns tipos de metabolismos metilotróficos que já haviam sido descritos, afirmando que o termo heterotrófico não era antônimo de metilotrófico. Este traz três definições de livros didáticos simples, que se seguem adiante:

- Autotrófico: um organismo que cresce a partir de carbono CO₂ (carbono inorgânico) pela fixação e redução deste.
- Heterotrófico: um organismo que obtém sua biomassa celular, incorporando diretamente moléculas reduzidas (de origem orgânica).
- Metilotrófico: um organismo que obtém energia, em muitos casos, de carbono a partir de moléculas reduzidas que não têm qualquer ligação C C (igualmente chamados compostos de carbono simples).

A partir destas definições padrões se torna evidente que metilotrófico não é o oposto de heterotrófico. No entanto, em muitos relatos na literatura, o termo heterotrófico já foi constantemente utilizado para definir não metilotróficos (De Marco, 2004).

Por uma questão de fato, metilotróficos não descrevem um tipo de metabolismo, que inclui sob um nome comum, diferentes maneiras de utilizar compostos de carbono simples. De Marco enumera pelo menos quatro razões que podem explicar esse uso inapropriado do termo heterotrófico:

• Alguns microrganismos, de fato, crescem em compostos de carbono simples de forma autotrófica, fixando o CO₂ produzido (*Ralstonia, Xanthobacter, Paracoccus*, Archaeas metilotróficas, e Clostrídios metilotróficos). Assim, para estes organismos (exclusivamente) heterotróficos seria o antônimo adequado de metilotróficos. Além disso, outros microrganismos autotróficos (litotróficos ou fototróficos) podem utilizar compostos de carbono simples (metanol,

formato) como uma fonte suplementar de energia. Esse fato já havia sido discutido por autores na década de 70.

- Alguns metilotróficos são mixotróficos. A espécie *Methylococcus capsulatus* fixa carbono derivado de metano principalmente em nível de formaldeído, através da via ribulose monofosfato (esta é considerada uma bactéria heterotrófica), mas também, em parte, ao nível das emissões de CO₂ através do ciclo (CBB) Calvin Benson Bessham (que mostra um tipo de autotrofismo) (Taylor *et al.*, 1980 ; Baxter *et al.*, 2002). Além disso, o ciclo da serina para a fixação de carbono é intrinsecamente mixotrófica em que incorpora uma molécula de CO₂, por cada duas de formaldeído fixadas.
- Muitas das reações que compõem o percurso da via ribulose monofosfato são comuns ao ciclo de Calvin Benson CBB. Alguns autores (Quayle & Ferenci, 1978) levantaram a hipótese de que o ciclo CBB se originou a partir da via de ribulose monofosfato e que os organismos como *Methylococcus capsulatus*, em que ambas as vias trabalham simultaneamente, estes podem ser considerados organismos de transição entre os dois tipos metabólicos (Taylor *et al* , 1980).
- O formaldeído, que é a molécula fixada pelas metilotróficas heterotróficas, obviamente não é inorgânico, mas não é tão distante de uma molécula de CO₂ (apenas dois passos de distância de desidrogenação, considerando quimicamente), o que torna até comprometedor o erro de considerá-lo como quase inorgânico. Ou, como citado por Quayle, 1978) : " ... É mais o fato de que estes organismos sintetizam os seus constituintes celulares complexos a partir de simples compostos de carbono único, quimicamente análogas ao dióxido de carbono que resultou em sua associação com autotróficos, e demonstrou a prova da sua capacidade de se desenvolver em detrimento de CO₂ ... ".

Estes últimos pontos podem explicar como o mau uso da palavra heterotrófico surgiu, mas não justificam a persistência dessa imprecisão (De Marco, 2004). Reconhece-se que deve haver um termo mais apropriado para descrever resumidamente o metabolismo não metilotrófico. A solução mais adequada seria a utilização dos termos "não metilotróficos".

Outros autores como Yurimoto e colaboradores, em 2005, estudaram o principal fluxo de compostos de carbono simples na biosfera e este é representado na Figura 2.11. O dióxido de carbono é reduzido a metano por microrganismos (metanogênicos) em ambientes anaeróbicos.

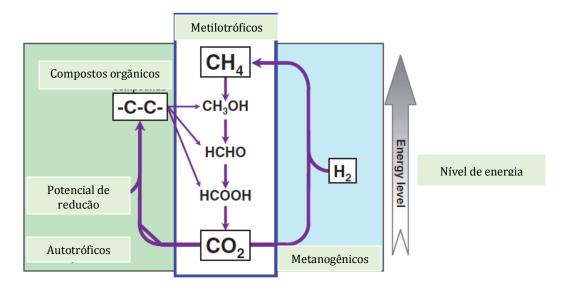


Figura 2.11: Papéis dos metilotróficos, autotróficos e metanogênicos no ciclo do carbono da biosfera. Adaptado de Yurimoto, et al, 2005.

Além disso, o CO₂ é fixado em compostos orgânicos pelos microrganismos autotróficos, bem como pelas plantas verdes sob ambas as condições aeróbicas e anaeróbicas. Metilotróficos, que são micróbios que podem utilizar os compostos de carbono simples (C₁) de uma forma mais reduzida do que o CO₂, como única fonte de carbono e energia, estão situados entre autótrofos e os metanogênicos.

Os metanogênicos podem reduzir o CO₂ para CH₄ utilizando o potencial redox de H₂. Organismos autotróficos, incluindo plantas verdes, sintetizam compostos orgânicos (-C-C-) usando a energia da luz ou o potencial redox que é formado por oxidação de compostos inorgânicos. Metilotróficos usam vários compostos C₁ e geram CO₂.

Os compostos C₁ são oxidados primeiro a formaldeído, que está situado no ponto de ramificação entre a oxidação de CO₂ para a formação de energia e assimilação para a biossíntese. Deste modo, o destino de formaldeído é considerado essencial para a compreensão do metabolismo metilotrófico. Em geral, o tipo de reação envolvida na oxidação dos compostos C₁ reduzidos para formaldeído, depende ambos dos substratos C₁ e das espécies microbianas.

Embora o formaldeído seja um metabólico intermediário crucial no centro do metabolismo de metilotróficas, ele é altamente tóxico. A toxicidade resulta do elevado nível de reatividade não específica do formaldeído com proteínas e ácidos nucleicos. Todos os organismos produzem uma baixa concentração de formaldeído como resultado de reações de desmetilação. O

formaldeído foi provavelmente um dos produtos químicos orgânicos mais abundantes em tempos geológicos remotos (Yurimoto, *et al*, 2005).

Assim, no decurso da evolução, todos os organismos vivos "precisaram" adquirir a função metabólica para desintoxicação do formaldeído para se adaptar às condições ambientais. A principal questão tem surgido a respeito de como esse metabolito tóxico é administrado em altas condições de fluxo em células metilotróficas, como é o caso da espécie estudada neste trabalho.

2.9 Considerações relacionadas ao pigmento expresso por metilotróficas

Segundo uma Publicação da Sociedad Española de Microbiología, em Junho de 1987, a espécie *Methylobacterium organophylum* é considerada uma bactéria aeróbica, heterotrófica, com a presença de bacterioclorofila. Na tabela retirada dessa publicação, destaca-se a espécie como produtora do pigmento (figura 2.12).

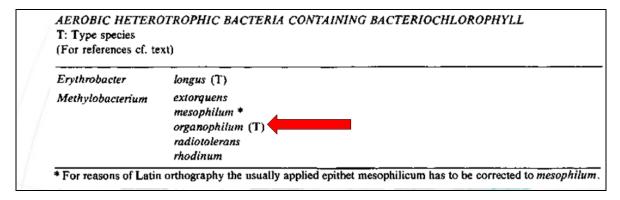


Figura 2.12: Tabela retirada de Sociedad Española De Microbiología, 1987, associando a espécie *Methylobacterium organophylum* à capacidade de produzir bacterioclorofila

Em outro trabalho, é constatado a partir de biodegradação do resíduo usado em cromatografia (metanol), a formação de pigmento natural, um carotenóide, de interesse biotecnológico, levando a um maior valor agregado (Fonte: Stepnowski, P. *et al.*; 2004).

A análise direta do extrato mostrou um padrão complexo de carotenóides não identificáveis. Nenhum dos carotenóides conhecidos sob a forma livre pôde ser detectada. Aplicar o processo de saponificação levou a uma hidrólise eficaz de todos os derivados, produzindo dois picos. Os tempos de retenção foram encontrados entre os padrões de astaxantina e luteína (tempos de retenção, máxima de absorvância e picos de íon molecular) e são apresentados na tabela 2.6 apresentada no artigo.

Tabela 2.6: Propriedades químicas de carotenóides foram analisadas. Comparação dos tempos de retenção, de absorvância máxima e massas moleculares de íons. Fonte: Stepnowski. *et al.*(2004)

Carotenóides	Tempo de retenção	$\lambda_{max}(nm)$	Íon Molecular (M+H)	Log P
Astaxantina	4.34	480	597	13.26
Carotenóide extraído	4.65	462, 488, 520	569	-
(pico principal)				
Luteína	5.02	429, 456, 485	569	14.82
Cantaxantina	6.55	485	565	14.10
β-caroteno	10.15	427, 450, 475	537	17.62
Spheroidene	-	-	569	16.92
1,1' ou 2,2' dihidroxilicopeno	-	-	569	14.71
2' dehidroximixol	-	-	569	14.83

Padrões de carotenóides foram separados dentro de uma execução de cromatografia, obtendo-se assim tempos de retenção e espectros de absorção visíveis. Picos de íon molecular foram detectados para β - caroteno (m/z 537 [M + H]), cantaxantina (m/z 565 [M + H]), luteína (m/z 569 [M + H]) e astaxantina (597 [M + H] m/z) e estes são mostrados na tabela 2.6 e na figura 2.20. Os autores propõem carotenóides com as estruturas dihidroxi licopeno ou myxol, este último conhecido por ser isolado a partir de variadas espécies de bactérias (Figura 2.13).

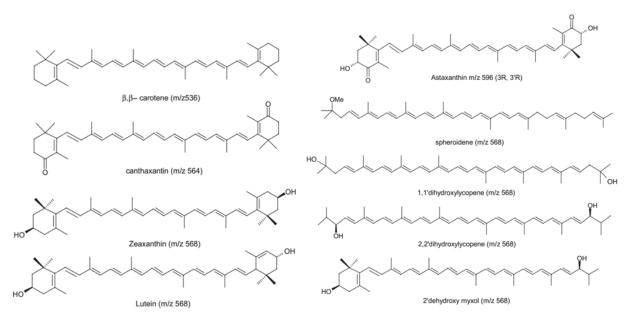


Figura 2.13: Estruturas analisadas no trabalho e carotenóides hipotéticos (nomes semi sistemáticos). Fonte: Stepnowski, *et al.*, 2004.

É de conhecimento geral que os carotenóides são pigmentos naturais importantes encontrados amplamente em plantas e microrganismos. Eles são, obviamente, essenciais para as plantas, para a fotossíntese, atuando na coleta de luz e, especialmente, na proteção contra fotooxidação destrutiva (Stepnowski, *et al.*; 2004).

O ser humano requer um fornecimento de β - caroteno e compostos relacionados para adição como corantes para muitos fabricados alimentos, bebidas e animal alimenta-se, sob a forma de extratos naturais ou como fabricados pela síntese química de compostos puros. Carotenóides são, por exemplo, usados como corantes naturais de alimento ou aditivos para a alimentação na aquicultura e alguns possuem alto valor agregado. (Stepnowski, *et al.*; 2004).

Vários estudos têm mostrado que carotenóides combatem vários tipos de câncer e outras doenças por causa de sua função como antioxidante e/ou provitamina A (Stepnowski, *et al.* 2004).

2.10 Crescimento da espécie Methylobacterium organophylum em metano

Em publicação da *American Society for Microbiology*, de Patras & Tang, de 1987, foi constatada a capacidade dessa espécie em crescer também em metano, o que a torna uma bactéria metanotrófica também e não somente metilotrófica.

Verifica-se a capacidade da espécie de crescer no metano, metanol, extrato de levedura, no aminoácido serina e no formaldeído.

A taxa de crescimento específico em metano é inferior do que a de outros substratos. Isto é esperado uma vez que a solubilidade do metano em água é mais difícil. Quando cultivadas anteriormente num substrato multicarbono, como glicose, por exemplo, requerem várias transferências em um novo meio sem essa fonte de carbono, para que ocorra crescimento em metano novamente. Este estado "inativo" da espécie foi explicado pelos autores como uma necessidade de a bactéria possuir uma membrana intracitoplasmática para o metabolismo do metano poder ocorrer. Os relatos da literatura relacionados com a bactéria *Methylobacterium organophylum*, mostram que ela contém uma membrana intracitoplasmática quando cultivada em metano, mas esta membrana não está presente durante o crescimento em substratos, tais como o metanol e glicose.

Afigura-se ainda que o metanol acumulou-se durante os períodos de não crescimento do metabolismo em metano por *Methylobacterium organophylum*. O ácido fórmico e ácido acético foram produtos associados ao crescimento por fermentação da serina (Patras & Tang,1987).

Na figura 2.14, retirada do trabalho de Patras & Tang, de 1987, pode ser visualizada a cinética de crescimento da espécie em variadas fontes de carbono.

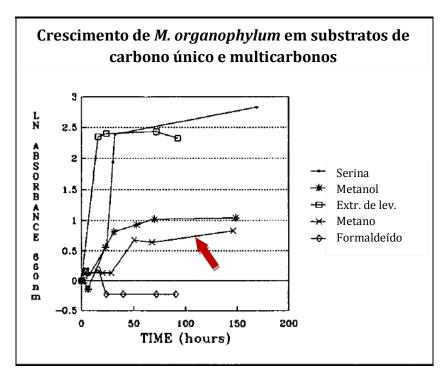


Figura 2.14: Crescimento de *Methylobacterium organophylum* em fontes de carbono e substratos multicarbono, (destaque para o crescimento em metano). Retirado de Patras & Tang (1987).

2.11 Considerações Finais

Entre o final do ano de 1970 e meados dos anos 1980, numerosos processos microbianos para a obtenção de produtos biológicos úteis (por exemplo, proteínas, aminoácidos e vitaminas) foram desenvolvidos utilizando metanol como fonte de carbono. No entanto, algumas destas aplicações não atingiram realidade comercial, principalmente devido ao elevado custo do substrato e uma produtividade relativamente baixa em comparação com processos mais convencionais. No entanto, o metanol é uma matéria-prima promissora porque pode ser produzido a partir de recursos renováveis (ou seja, biomassa microbiana). Recentemente, houve o entendimento da genética e do metabolismo de organismos metilotróficos, especialmente sobre

a conversão metabólica do intermediário central, o formaldeído. Uma variedade de sistemas de expressão de genes heterólogos usando metilotróficos foram esclarecidos e estabelecidos. A engenharia genética de metilotróficos permitiu introduzir sistemas enzimáticos de outros organismos para a engenharia metabólica. Assim, considera-se que as espécies metilotróficas são agentes ideais para a produção biotecnológica de compostos úteis e mais pesquisas nesta área podem estabelecer o papel desempenhado na natureza por esses organismos no ciclo do carbono.

Há, no entanto, vasta gama de substratos para a produção de proteínas de unicelulares. O custo dos substratos utilizados na produção de proteínas de unicelulares podem representar de 40 a 75% do custo total de produção. Estima-se no processo que representa cerca de 50% dos custos do produto final, quando destinado para alimentação animal (Nasseri et al, 2011). O metanol é um subproduto da indústria petroquímica, podendo ser obtido por um processo que envolve a reação de H₂ e CO (gás de síntese) em presença de óxido metálico como catalisador em altas temperaturas e pressões. Tem muitas vantagens sobre outros hidrocarbonetos na produção de proteínas de unicelulares, pois o metano e outros hidrocarbonetos são pouco ou ligeiramente solúveis em água e a sua utilização pelas espécies microbianas é limitada pela sua taxa de transferência de massa. O metanol exige baixa taxa de oxigênio em comparação com o metano, o que significa redução de custos de refrigeração. Pode ser produzido através da oxidação do metano, de forma relativamente barata. Almeja-se que a utilização de metanol como um substrato de fermentação leva a um maior rendimento e diminuição do consumo de oxigênio e resfriamento. O metanol tem a vantagem de ser muito mais solúvel em água e mais fácil de ser manuseado do que o metano. Em termos de toxicidade, o metanol, por ter um ponto de ebulição mais baixo até mesmo do que o etanol, não representará riscos após o processamento da biomassa microbiana. A biomassa passa por um processo de dessecamento, a altas temperaturas e este eliminaria qualquer resíduo desse metanol ainda presente na suspensão celular.

Diversos processos foram desenvolvidos para a produção de alimentos para animais usando metanol como um substrato, como já citado nessa revisão de bibliografia.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

A potencialidade biotecnológica em utilizar bactérias capazes de incorporar compostos de carbono simples em sua via metabólica constitui uma perspectiva para a produção de diversos produtos como, por exemplo, da chamada proteína de unicelular, ou *single cell protein* (SCP) a ser usada como suplemento em ração tanto humana quanto animal, bem como abre perspectivas para a produção de outras substancias com valor agregado, como PHB, pigmentos e vitaminas.

O metanol como substrato no meio de cultura possibilita o uso dessa commodity gerando uma nova perspectiva para a indústria em escala de produção. Considerando ainda ser um substrato miscível em água, fácil de ser transportando e estocado e encontrado em alto grau de pureza.

3.1 OBJETIVO GERAL

Esta dissertação teve como objetivo geral, o estudo sobre a capacidade da espécie *Methylobacterium organophylum* - DSMZ - 18172, de crescer em um meio estritamente mineral,

utilizando o metanol como única fonte de carbono, com a finalidade de se acompanhar a biomassa bacteriana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Levantar o perfil cinético da linhagem *Methylobacterium organophylum* DSMZ
 18172 em meio mineral e metanol como substrato, em temperatura e agitação específicas, determinadas previamente em literatura consultada, quantificando o consumo do metanol residual por meio de *CLAE*, associado ao crescimento microbiano;
- Estudar o comportamento de *Methylobacterium organophylum* DSMZ 18172 em cultivo em frascos, utilizando meio mineral, sob temperatura definida e com acompanhamento do pH, com variações na concentração do inóculo e das faixas de metanol utilizadas,
- Verificar a produção de biomassa bacteriana em um meio de cultivo mineral básico, adicionando extrato de levedura, com a finalidade de aumentar o fornecimento de uma fonte de nitrogênio, alterando a relação C:N, através de experimentos preliminares em frasco e de um planejamento experimental do tipo fatorial completo.
- Realização de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para verificação do biofilme formado durante os cultivos;
- Analisar o perfil cinético da linhagem em biorreator instrumentado com e sem controle de pH e oxigênio dissolvido, através do emprego de batelada simples;
- Avaliar o crescimento da linhagem em biorreator instrumentado empregando a estratégia de batelada alimentada por pulso do substrato metanol em meio mineral;
- Avaliar de modo preliminar o crescimento de *Methylobacterium organophylum* DSMZ 18172 em presença de metano, em cultivo realizado em Provetas adaptadas para entrada de gás natural e oxigênio.

CAPÍTULO 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão expostos os materiais e metodologias utilizadas para o desenvolvimento dos experimentos deste trabalho. Estes se iniciaram após a ativação da espécie estudada, com posterior manutenção e manipulação da bactéria metilotrófica, bem como o preparo dos inóculos e a elaboração dos ensaios conduzidos nos meios de cultivo estudados. A metodologia experimental utilizada para obtenção da biomassa microbiana foi desenvolvida, inicialmente, em frascos agitados com posteriores ensaios em biorreator instrumentado. Para a otimização do processo, em meio adicionado de extrato de levedura, foi utilizado planejamento experimental com análise das respostas em ferramenta computacional de trabalho, nesse caso o programa *Design Expert*, garantindo um controle mais acautelado das condições operacionais do processo.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos, localizado no Núcleo de Biocombustíveis, Petróleo e Derivados, da Escola de Química da UFRJ, na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.1. Ativação, isolamento e manutenção da linhagem estudada - Methylobacterium organophylum - DSMZ - 18172

A espécie bacteriana em estudo, *Methylobacterium organophylum* DSMZ – 18172 foi adquirida pelo laboratório de desenvolvimento de bioprocessos da Escola de Química da UFRJ–LADEBIO - através do banco alemão de coleções de microrganismos, denominado *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ).

A bactéria adquirida em condição liofilizada foi ativada seguindo as recomendações do banco de coleções e foi semeada em placas de Petri e tubos de ensaio com meio de cultura de agar inclinado, sendo usados os meios: mineral, nutritivo e com glicerol, além de ter sido cultivada para estoque e distribuída em criotubos, armazenadas em freezer e mantidas em meio nutritivo com glicerol. A ativação foi realizada utilizando meio mineral básico, como descrito em trabalhos relacionados ao tema, disponíveis na literatura, bem como sugerido pela DSMZ para a referida espécie.

A espécie microbiana foi conservada em placas e tubos com agar inclinado nos seguintes meios: meio mineral com metanol (MMS); meio com glicerol e peptona (tabela 4.2 a); meio nutritivo com metanol (tabela 4.2 b); e foram também usadas placas com meio mineral, extrato de levedura e metanol (meio mineral básico com agar, acrescido de 1 g/L de extrato de levedura). A bactéria foi semeada mensalmente em placas de Petri e em tubos inclinados com os meios descritos acima, incubadas a 30°C durante pelo menos quatro dias e armazenadas posteriormente em geladeira a 5°C para conservação (figura 4.1).

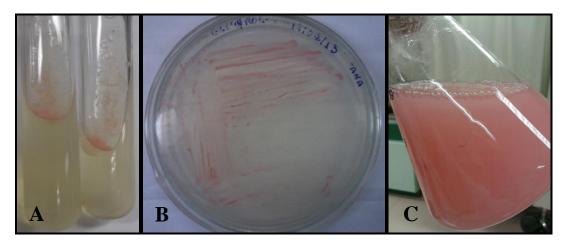


Figura 4.1: Colônias crescidas de *Methylobacterium organophylum*-DSMZ-1817 em agar nutritivo inclinado (A); em placa de Petri com meio mineral e glicerol (B) e o aspecto do crescimento da bactéria em estudo em meio mineral líquido metanol após 36 h de ensaio em biorreator instrumentado (C).

A coloração pelo método Gram (figura 4.2) confirmou a característica Gram negativa da espécie. As células são visualizadas mais frequentemente, de forma individualizada, mas algumas rosetas ou agrupamentos podem ser identificados nas micrografias.

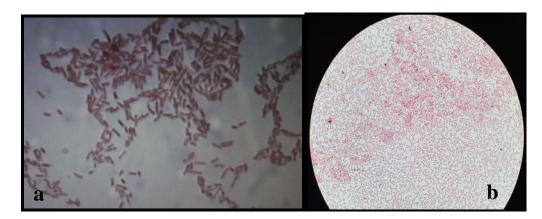


Figura 4.2: Micrografias da espécie *Methylobacterium organophylum* realizadas após a ativação e durante o crescimento em frasco, sendo (a) imagem obtida a partir de um programa de computador, estando este acoplado ao microscópio e (b) imagem obtida do microscópio óptico por câmera comum (aumentos de 100x).

Como descrito em Jafari *et al* (2008), o meio mineral (figura 4.3) deve possuir metanol - CH₃OH (aproximadamente 5g/L) como fonte de carbono e um sal nitrato - KNO₃ (aproximadamente 1g/L) como fonte de nitrogênio. Além destes, ainda são inseridas as fontes de fosfato, sendo usado o ácido fosfórico ou sais de fosfato como o fosfato dissódico (NaHPO₄.7H₂O) e para fonte de magnésio, o sulfato de magnésio hidratado (MgSO₄. 7 H₂O). Também foi adicionado ácido bórico e para suprir a estirpe de elementos traço, foram acrescentados o cobre, cobalto, manganês, zinco e molibdênio.



Figura 4.3: Comparação entre o meio mineral líquido com crescimento bacteriano (à esquerda) e sem crescimento

Os componentes do meio mineral são descritos na tabela 4.1 e foram autoclavados em soluções 1 e 2 separadamente a 121° C por 20 minutos. O metanol, adicionado posteriormente, na devida concentração a ser estudada, após a temperatura do meio de cultura estar em torno de 30 a 40°C, após a retirada da autoclave, para evitar que o metanol inflamasse, um álcool com temperatura de inflamabilidade em torno de 64°C.

Tabela 4.1: Composição do meio de cultivo mineral (MMS) para ativação e crescimento

	Concentração
SOLUÇÃO 1	
KNO ₃ (nitrato de potássio)	1 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O (sulfato de magnésio)	0,20 g/L
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (cloreto de cálcio)	0,02 g/L
FeSO ₄ x 7 H ₂ O (sulfato de ferro)	1 mg/L
CuSO ₄ x 5 H ₂ O (sulfato de cobre)	5 μg/L
H ₃ BO ₃ (ácido bórico)	10 μg/L
MnSO ₄ x 5 H ₂ O (sulfato de manganês)	10 μg/L
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O (sulfato de zinco)	70 μg/L
Na ₂ MoO ₄ x 5 H ₂ O (molibdato de sódio)	10 μg/L
CoCl ₂ x 6 H ₂ O (cloreto de cobalto)	5 μg/L
SOLUÇÃO 2	
Na ₂ HPO ₄ (fosfato de sódio dibásico)	0,23 g/L
NH ₂ PO ₄ (fosfato de sódio monobásico)	0,07 g/L

Para um estoque da espécie após o crescimento, foi utilizado um meio de cultivo sugerido por *Green* (2006), com glicerol e peptona (tabela 4.2 a), assim como para manutenção foi utilizado um meio nutritivo (tabela 4.2 b).

Tabela 4.2: Composição dos meios de cultivo em placa usados para estoque (a) e manutenção (b)

b.

a.	Meio Glicerol/peptona	Concentração
•	Agar	15 g/L
	Glicerol	10 g/L
	Peptona	10 g/L

Meio Nutritivo Concentração

Agar 15 g/L

Extrato de carne 3 g/L

Extrato de carne 3 g/L
Peptona 5 g/L

4.1.1. Estratégia de esterilização do meio de cultivo

O meio de cultura (tabela 4.1) preparado para o crescimento celular em em frascos ou em biorreatores era autoclavado a 121°C por 20 min em soluções separadas, conforme apresentado na tabela 4.1, com os componentes divididos em 2 soluções, pois a combinação de fosfatos tende a complexar com os demais elementos da solução 1 e precipitam. Por isso, foi obtido um melhor resultado, ao autoclavar as soluções separadas. Estas eram misturadas no momento dos ensaios.

4.2. Estimativa da concentração de células por espectrofotometria

Esta metodologia, realizada para estimativa da correlação entre a concentração celular e densidade óptica, foi empregada a partir do cultivo de *Methylobacterium organophylum*-DSMZ-1817 em meio mineral (**Tabela 4.1**) com 7,7 g/L de metanol. Para o acompanhamento do perfil cinético de crescimento celular foi realizada leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀), durante 96 horas. Para este fim, alíquotas de 2 mL do meio foram coletadas no início do cultivo e a cada 12 horas até que a DO₆₀₀ atingisse um valor constante, indicando a fase estacionária. Desta amostra de 2 mL, separou-se o sobrenadante da biomassa bacteriana por centrifugação a 10.000 rpm (rotações por minuto) por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi enviado para análise da concentração de metanol. O pellet restante foi ressuspendido, com água destilada e homogeneizado em um vórtex, para então ocorrer a leitura por D.O _{600nm}. Essas medidas do crescimento inicial foram realizadas em triplicata. Com a finalidade de estabelecer uma relação entre a concentração celular e os valores de densidade óptica (absorvância), medidos no comprimento de onda de 600 nm, foi utilizado o método convencional de determinação do peso de matéria seca de células.

Ao final do cultivo, realizado até a obtenção de uma fase estacionária, quando a D.O_{600 nm} apresentava leituras pouco variadas (indicativo de uma fase estacionária), as alíquotas foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm e o precipitado obtido foi ressuspendido com água destilada, em um mesmo volume que fora retirado. Foram amostrados 2 mL desse volume para 10 eppendorfs, previamente lavados, secos e pesados para determinação do peso de cada um deles. Os volumes desses eppendorfs foram centrifugados por 10.000 rpm em 10 minutos e o sobrenadante (1800 μL) foi retirado para então serem colocados em estufa para acompanhamento e verificação de um peso constante. A cada 24 horas, os eppendorfs eram retirados da estufa, colocados em dessecador por no mínimo meia hora, para então serem pesados. Esse

procedimento foi realizado por quatro dias até que fosse observado um peso constante. Posteriormente fez-se uma média entre os pesos obtidos para estimativa da massa seca de células.

Da mesma suspensão celular, em que foram feitas as amostragens utilizadas para estimativa da massa seca de células, foram preparadas nove diluições diferentes em triplicata para leitura em espectrofotômetro das densidades ópticas a 600 nm. Cada leitura foi correlacionada a uma determinada concentração celular através do valor obtido na etapa de determinação do peso de matéria seca de células. Obteve-se, a partir dessa correlação, a curva de calibração utilizada nos ensaios para estimativa da concentração de *Methylobacterium organophylum*-DSMZ-1817 (Figura 4.4)

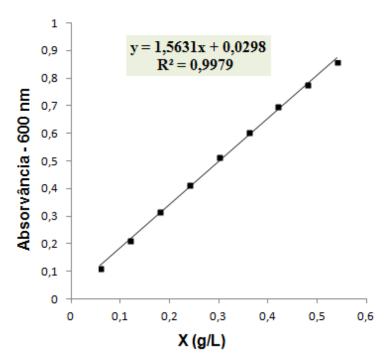


Figura 4.4: Correlação entre densidade óptica e concentração celular para o substrato metanol, da curva de calibração de biomassa bacteriana.

O cultivo foi feito em frascos agitados utilizando o Shaker rotatório (New Brunswick Scientific – Edison N. J.; U.S.A.) em uma rotação de 200 rpm, a 30 °C.

4.3 Ensaios de produção de biomassa microbiana em frascos

4.3.1. Ensaios preliminares de produção de biomassa microbiana em frascos

Esta etapa foi realizada com a finalidade de se alcançar as concentrações de inóculo a serem empregadas em todos os ensaios de produção de biomassa. Após o preparo do pré-inóculo, a absorvância da suspensão celular obtida foi estimada em espectrofotômetro, a 600 nm, e a concentração de células foi determinada através da relação obtida na equação resultante da curva padrão.

O volume da suspensão celular do pré inoculo foi centrifugado em condições assépticas, a 10.000 rpm, durante 10 minutos. A biomassa obtida foi separada do sobrenadante e ressuspensa em meio MMS obtendo, assim, uma suspensão de células que foi empregado como inóculo (Figura 4.5) para os ensaios realizados.



Figura 4.5: Visualização do pré inóculo centrifugado e utilizado como inoculo para o crescimento

Segundo Carvalho & Sato (2001), para que um bioprocesso seja eficiente o inóculo deve ser preparado de forma a obter uma concentração celular adequada, com capacidade produtiva elevada, garantindo bons rendimentos e/ou produtividades. Em cultivos visando a produção de biomassa, consegue-se produzir maiores concentrações celulares se o inóculo contiver células na fase logarítmica de crescimento. Desta forma, o inóculo de *Methylobacterium organophylum* utilizado nos ensaios foi obtido com aproximadamente 30 horas de cultivo em meio mineral. A concentração de metanol utilizada no pré inóculo foi de 1 g/L.

Os valores de concentração de metanol utilizados nesses ensaios foram 1,6 g/L; 5,4 g/L; 6,9 g/L e 8,3 g/L. A concentração de metanol adicionada nos frascos de todos os ensaios foi calculada, considerando a densidade de 0,79 g·cm⁻³. Foi utilizada a estratégia de diluição do

metanol em água para diminuir a sua capacidade tóxica durante o manuseio do mesmo nos experimentos. Em outros momentos foi utilizada mascara de segurança durante os ensaios.

4.3.2 Ensaios de produção de biomassa microbiana em frascos com aumento da concentração do inóculo e faixa de metanol inicial

Os ensaios foram conduzidos partindo-se de um inoculo de 10 ml de suspensão microbiana em 190 ml de meio mineral (5% v/v) em frascos de volumes totais, cada um, de 500 mL, nas condições de 30°C e 250 rpm.

O tempo de obtenção do pré inóculo foi maior do que nos ensaios preliminares, sendo de 40 horas, observando-se uma maior densidade da cultura, procedendo leituras de D.O. e usando uma concentração de metanol inicial de 5 g/L nesse crescimento. Esse valor ficou próximo de uma média dos valores de concentração de metanol utilizados nos ensaios com 1g/L, 4 g/L, 7 g/L, 12 g/L e 17 g/L.

Este pré inóculo foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos e retirada uma parte do sobrenadante (50 mL do volume total de 100 mL), ou seja, o centrifugado de células foi ressuspendido com metade do meio mineral de crescimento, concentrando mais as células e removendo os possíveis metabólitos e outras substâncias que influenciam essa amostra de células.

4.3.3 Ensaios de crescimento em frasco, com meio mineral, extrato de levedura e metanol

O extrato de levedura foi um componente escolhido para ser adicionado ao meio mineral, por conter com cerca de 10 a 11,8 % de nitrogênio total em sua composição final, além de vitaminas do complexo B e alguns ácidos, conforme descrito a seguir.

Nesse ensaio foi utilizado um inóculo de 20 ml em 180 ml de meio mineral (10% v/v) + extrato de levedura 1g/L em frascos de volumes totais, cada um, de 500 mL de capacidade a 30°c e 220 rpm de agitação.

Em um ensaio posterior foi mantida a concentração de extrato de levedura e utilizada uma maior concentração de metanol (6 g/L), com 200 rpm de agitação e em temperatura de 30 ° C.

O extrato de levedura utilizado, da marca MicroMed tem sua composição listada na tabela 4.3.

Tabela 4.3: Composição do extrato de levedura utilizado nos cultivos

Nitrogênio Tota	al =10 a 11,8%
Nitrogênio amir	no = 4,5 – 5,8 %
Cloreto de sódio	o = 0.5%
	Niacina
	Biotina
	Ácido fólico
Vitaminas	Ácido pantotênico
	Tiamina (B1)
	Riboflavina (B2)
	Piridoxina (B6)

4.4. Planejamento experimental

O Planejamento de Experimentos (em inglês Design of Experiments, DOE) é um conjunto de técnicas utilizadas para se planejar ensaios, ou seja, para definir quais dados, em que quantidade e em que condições devem ser coletadas durante um determinado experimento, buscando, basicamente, satisfazer dois grandes objetivos: a maior precisão estatística possível na resposta e o menor custo do processo. É, portanto, uma técnica de extrema importância para a indústria, pois seu emprego permite resultados mais confiáveis, economizando dinheiro e tempo, parâmetros fundamentais em tempos de concorrência acirrada. A sua aplicação no desenvolvimento de novos produtos é muito importante, onde uma maior qualidade dos resultados dos testes pode levar a um projeto com desempenho superior seja em termos de suas características funcionais como também sua robustez (Box *et al*, 1978).

Nesse método são realizados planejamentos fatoriais, para cujos resultados são ajustados modelos matemáticos. Estas etapas, conhecidas como etapa de deslocamento e modelamento, respectivamente, são repetidas várias vezes, mapeando a superfície de respostas obtidas na direção da região ponto de ótimo desejado. A modelagem normalmente é feita ajustando-se os modelos mais simples, como o linear e o quadrático. Por sua vez, o planejamento fatorial executado geralmente constitui-se de um número pequeno e pré determinado de experimentos, que são determinados através do ajuste conseguido para o modelo que foi aplicado na etapa imediatamente anterior (Rodrigues & Iemma, 2005). Outro detalhe importante é o uso das variáveis em sua forma escalonada, de forma que suas grandezas não interfiram no desenvolvimento do processo de otimização. Os cuidados na realização dos experimentos e de suas replicatas devem ser observados (Box et al, 1978). Foi feito, portanto, nesse trabalho, um experimento do tipo Fatorial completo com duas variáveis independentes, com 3 pontos centrais.

Na tabela 4.3 são mostrados os níveis em relação às variáveis estudadas. Para esse planejamento foram combinadas as variáveis: Extrato de levedura e Metanol.

Variáveis		Níveis	
	-1	+1	0 (PC)
Extrato de Levedura (g/L)	5 g/L	15 g/L	10 g/L
Metanol (g/L)	2 g/L	12 g/L	7 g/L

Tabela 4.4. Variáveis e níveis propostos no Planejamento Fatorial completo 2²+ 2 PC

O cultivo de ativação do pré inóculo para os ensaios do planejamento foi de 40 h e o mesmo foi centrifugado e ressuspendido na solução de fosfatos que faz parte do meio de cultivo final. Foi adicionado 100 mL de suspensão celular em 900 mL de meio mineral. Estes 900 mL foram autoclavados dentro do vaso do reator a 121 ° C por 20 minutos. O cultivo de ativação foi em torno de 40 h (7 g/L -metanol), posteriormente centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos, retirado 100 mL do sobrenadante e ressuspendido com a solução de fosfatos. Foi adicionado 10 mL de suspensão celular em 190 mL de meio mineral em todos os frascos do ensaio de planejamento.

O meio foi esterilizado seguindo as recomendações de separação das soluções já citadas do meio de cultivo, com adição de metanol em momento posterior, quando o meio já se

encontrava resfriado. O extrato de levedura foi misturado com uma das soluções para a autoclavação.

A matriz experimental encontra-se na tabela 4.4. A variável de resposta foi a biomassa bacteriana em gramas por litro.

Tabela 4.5: Matriz do planejamento para as 2 variáveis com triplicata no ponto central

Ensaios	Variáveis Indepe	endentes
	Extrato de Levedura (g/L)	Metanol (g/L)
1	5 g/L	2 g/L
2	15 g/L	2 g/L
3	5 g/L	12g/L
4	15 g/L	12 g/L
5	10 g/L	7 g/L
6	10 g/L	7g/L
7	10 g/L	7 g/L

4.4.1 Validação da otimização experimental

Para validar e corroborar com a condição ótima predita pelo programa estatístico foi utilizada a função *Desirability* do programa *Design Expert 9.0*. Esta função estatística busca a combinação dos fatores, considerando as variáveis de resposta de maneira a serem maximizadas simultaneamente. O valor *Desirability* (D) tem uma amplitude que varia de 0 a 1, onde D=1 corresponde a plena obtenção dos objetivos e D=0 corresponde à impossibilidade de satisfação dos objetivos (MONTGOMERY, 2001). Os fatores otimizados por esta função foram extrato de levedura e metanol. Para este experimento, realizou-se uma fermentação nas condições ótimas de extrato de levedura e metanol, apontadas pelo modelo, em triplicata. O ensaio foi conduzido em frascos Erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de meio, a 30 °C, 250 rpm durante 48 h.

O cultivo de ativação do pré inóculo foi de 40 h, com uma concentração de metanol de 7 g/L, e o mesmo foi centrifugado, o sobrenadante descartado e ressuspendido na solução de

fosfatos que fazia parte do meio de cultivo final. Foi adicionado 10 mL de suspensão celular em 190 mL de meio mineral em todos os frascos do ensaio de validação experimental.

4.5. Imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram realizadas imagens por microscopia eletrônica de varredura das amostras durante o crescimento em batelada em frascos agitados, pelo Laboratório de Permeação Através de Membranas (PEQ - COPPE/UFRJ).

A amostra obtida do frasco foi centrifugada, retirada uma parte do sobrenadante e a suspensão densa foi colocada em uma placa de Petri de forma a aumentar a área de superfície de contato para uma secagem mais rápida e deixadas em estufa durante 6 h a uma temperatura de 68 °C. A amostra passou por um processo de metalização, recebendo uma camada de ouro, com a finalidade de tornar o material um condutor de elétrons para a obtenção das imagens, para o emprego de elétrons secundários/Alto vácuo em Microscópio FEI Company – Modelo Quanta 200.

4.6. Ensaios em biorreator instrumentado

Após a investigação inicial sobre as concentrações mais bem toleradas pela espécie, optou-se em trabalhar, em biorreator, com as concentrações em torno de 7 g/L de metanol. Sendo inicialmente realizada a batelada simples e posteriormente uma batelada alimentada por pulso.

Os biorreatores utilizados foram o New Bioflo e Biostat B, B. Braun Biotech International – Germany, que podem ser visualizados, respectivamente na figura 4.6.

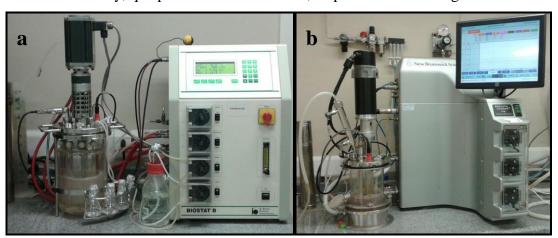


Figura 4.6: Biorreatores (a) Biostat B (B. Braun Biotech International, Alemanha) e (b) Bioflo 310 (New Bunswick Scientific)

Uma parte da solução mineral foi autoclavada dentro do vaso de vidro do biorreator, com sensores e a outra parte da solução mineral foi utilizada para ressuspender a biomassa microbiana obtida no pré inóculo, servindo então de inóculo em uma proporção de 10 % v/v do biorreator.

As leituras foram feitas, retirando-se amostras de 2 mL com pipetas de vidro. Estas alíquotas foram levadas para centrifugação, retirado o sobrenadante (que era enviado à central analítica para avaliação do metanol residual) e o pellet ressuspendido em água destilada para leitura da densidade óptica.

4.7. Crescimento microbiano em metano

O pré inóculo para esse ensaio foi realizado em frascos agitados, utilizando o metanol como fonte de carbono, com o volume de 100 mL em cada frasco, sendo um para cada proveta a ser montada no arranjo.

Esse pré inóculo ficou em sistema de agitação e temperatura controladas (250 rpm e 30° C) até se entrar na fase exponencial da espécie, e que foi de 36 h. Após esse tempo, os volumes de células crescidas desses frascos foram transferidos para frascos para centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos em uma centrífuga apropriada para volumes maiores.

Esse volume centrifugado foi levado para o fluxo laminar, o sobrenadante removido e as células precipitadas ao fundo, ressuspendidas na solução de fosfatos, no volume de 100 mL para então servirem como inoculo para cada proveta (com capacidade total de 1000 mL), que já havia sido previamente autoclavada com a solução de sais restantes, e um volume de 900 mL. Isso determina um percentual de 10% v/v de solução do inoculo.

Foi adicionado então esses 100 mL de suspensão celular em 900 mL de meio mineral, já previamente colocado nas provetas e autoclavados nas mesmas, onde posteriormente foram acopladas em tubos com entrada de metano em uma vazão de 35 mL/min de CH₄. Em ensaios posteriores as vazões foram aumentadas para 75 mL/min de CH₄, para aumentar a capacidade de dissolução do gás no meio líquido. Para promover maior dissolução do gás no meio líquido foram utilizados em uma das provetas o extrato de levedura, como um cofator e em outra proveta, o TWEEN 80, um surfactante com a função de diminuir a tensão superficial do meio.

As provetas foram montadas em colunas ligadas de maneira a receberem o metano, cujo esquema da vista superior pode ser visto na figura 4.7. A amostragem foi feita por meio de seringas esterilizadas, conectadas nas saídas de borracha nas laterais das provetas.

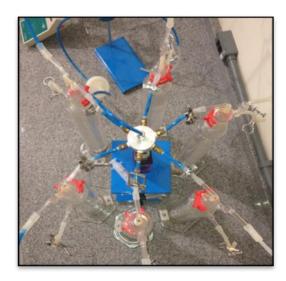


Figura 4.7: Vista superior do sistema de provetas conectadas em arranjo circular

4.8. Análise Estatística

O tratamento estatístico dos dados foi feito com o software *Design Expert 9.0*, o programa para confecção de gráficos *ORIGIN 7.0* e ainda o programa Excel.

4.9. Formas de Amostragem

Em todos os experimentos foram retiradas alíquotas de 2 mL, em média, a cada três horas, com auxílio de ponteiras estéreis do mesmo volume. As amostras eram centrifugadas a 12000 rpm durante 10 minutos, sendo o sobrenadante destinado para dosagens de metanol por HPLC, e o precipitado ressuspendido com água destilada.

O sedimentado foi lavado e completado até 2 mL com água destilada e homogeneizado em agitador tipo vortex, para promover a ressuspensão das células antes da quantificação.

Os procedimentos de amostragem em frascos foram conduzidos com o cuidado na assepsia, em cabine de fluxo laminar. As retiradas de amostras do Biorreator foram feitas utilizando-se fonte de calor próxima a saída do amostrador do mesmo, criando-se assim uma área asséptica.

4.10. Determinações Analíticas e quantitativas do substrato

As concentrações das substâncias analisadas nas amostras foram calculadas por comparação com padrões externos com concentrações conhecidas. A figura 4.8 apresenta um cromatograma típico para um padrão externo de metanol.

A concentração de metanol nas amostras foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Waters, Milford, MA, U.S.A.) equipado com detector de índice de refração (Waters 2414, Milford, MA, U.S.A.). Para a separação foi utilizada a coluna PL Hi-Plex H 8 μm 300 x 7,7mm. O composto H₂SO₄ (0,005mol/L) foi usado como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/min e pressão máxima de 0,5 psi.

A temperatura da coluna foi de cerca de 60 °C e o volume da injeção foi de 20μL. As concentrações nas amostras foram calculadas por comparação com padrões externos de concentração conhecida, com áreas cromatográficas calculadas pelo próprio equipamento.

As concentrações das substâncias analisadas nas amostras foram calculadas por comparação com padrões externos de concentração conhecida, com áreas cromatográficas calculadas pelo próprio equipamento.

O álcool metílico usado em todos os experimentos foi da marca VETEC Química Fina Ind. e Com. Ltda (Brasil). – Padrão analítico/ ACS.

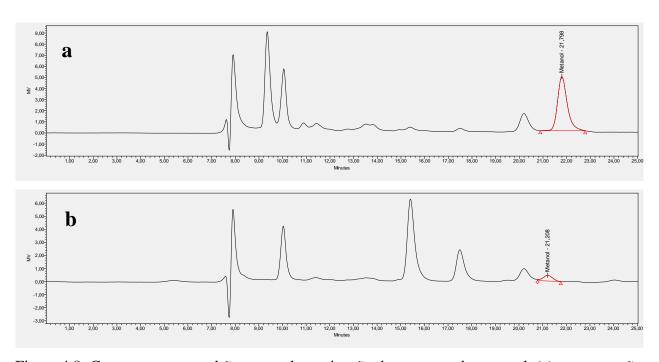


Figura 4.8: Cromatogramas padrão para a determinação de consumo de metanol. (a) concentração de 6 g/L e (b) concentração de 0,6 g/L

4.10.1 Medida do pH

O pH das amostras retiradas do meio de cultivo durante o crescimento em frascos foi determinado utilizando o potenciômetro da MarcaDigimed, modelo MS-21, na temperatura de 25°C.

4.11 Análise dos parâmetros do processo fermentativo

4.11.1 Rendimento em biomassa (Y x/s)

O rendimento em biomassa foi obtido dividindo a quantidade de biomassa produzida (g) pela quantidade de substrato consumido (g), a partir da expressão. O fator de conversão de substrato (metanol) em células é expresso pela equação 2.

$$Y_{X/S} = \frac{X_{m\acute{a}x} - X_{0}}{S_{0} - S_{Xm\acute{a}x}}$$
(Equação 2)

Onde:

Y x/s = fator de conversão de substrato em biomassa (células), expresso em g de matéria seca por g de substrato consumido.

 $X_0 = \text{Concentração inicial celular (g.L)}$

X_m = Concentração máxima celular (g.L)

 S_0 = Concentração de metanol (g.L)

 $S_{xmáx}$ = Concentração de metanol quando a biomassa é máxima (g.L)

4.11.2 Produtividade volumétrica em biomassa microbiana (Q_x)

Para a avaliação do desempenho do processo, calculou-se a produtividade em biomassa, utilizando a relação expressa na equação 3.

$$Q_X(g.L^{-1}.h^{-1}) = \frac{X - Xo}{t}$$
 (Equação 3)

Onde:

 $Q_X = \text{produtividade em biomassa (g.L.h}^{-1});$

X = concentração celular máxima (g.L);

 $X_0 = \text{concentração celular inicial (g.L)};$

t = tempo de cultivo quando a biomassa é máxima (h)

4.11.3 Velocidade específica de crescimento celular

Obtida durante a fase exponencial de crescimento, a partir do coeficiente angular da reta formada através da relação existente entre o logaritmo da concentração celular e o tempo de cultivo. Durante o intervalo de tempo (dt), o aumento de números de células (dx), na fase exponencial, onde as células absorvem os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e se duplicando, pode ser representado por:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \Rightarrow \mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \Rightarrow \mu = d \cdot \frac{LnX}{dt} [T^{-1}]$$
(Equação 4)

Onde:

 μ_x : taxa específica de crescimento celular (h⁻¹);

X (em μ): concentração celular no tempo t (g.L⁻¹).

4.11.4 Redução percentual do substrato

$$RPS(\%) = \frac{(S_0 - S)}{S_0} \times 100$$
(Equação 4)

Onde:

RPS: redução percentual de substrato (%);

S: concentração final de metanol (g.L⁻¹).

 S_0 : concentração inicial de metanol (g.L⁻¹);

4.11.5 Tempo de duplicação

O tempo de geração (tg_d) que é o tempo de duplicação da massa celular pode ser representado por:

$$Ln~2X_0/X_0=\mu_x$$
 .
 tg = $Ln~2/\mu_m~$ ->
 t_d = 0,693/ μ (Equação 5)

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Verificação da capacidade metilotrófica, por meio da ativação da linhagem $Methylobacterium\ organophylum\ DSMZ-18172\ em\ metanol$

Este ensaio teve como objetivo levantar preliminarmente o perfil cinético do crescimento da bactéria *Methylobacterium organophylum* em metanol a partir das medidas de concentração de biomassa microbiana e de metanol em meio mineral, cujos resultados estão apresentados na figura 5.1.

A ativação da cultura mostrou-se essencial para que a fase de aclimatação durante o crescimento bacteriano fosse eliminada, pois as células entraram diretamente na fase exponencial até o tempo de 84 horas, após o qual se observa o início da fase de desaceleração do crescimento.

Na Tabela 5.1 estão organizadas as principais variáveis de resposta obtidas neste ensaio. O fator de conversão de substrato em células (**Y**_{X/S}) e produtividade volumétrica em células, **Q**_x, assumiram, respectivamente, os valores de **0,32 g.g**⁻¹ e **19 mg. L**⁻¹.h⁻¹, em 96 horas de cultivo. Por outro lado, que o metanol não foi totalmente consumido, resultando em um valor percentual de 76% de consumo deste substrato. A taxa específica de crescimento da espécie em estudo

assumiu o valor de 0,31 h⁻¹, correspondendo a um tempo de duplicação da massa bacteriana de 2,24 horas. Em se tratando de um ensaio preliminar, os resultados se mostraram bastante promissores e motivaram os desenvolvimentos subsequentes.

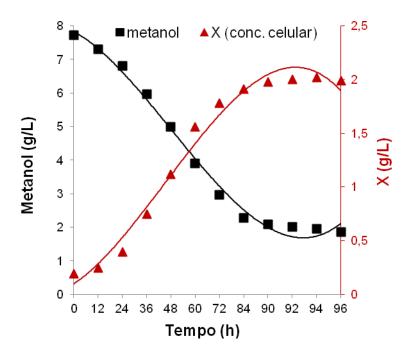


Figura 5.1: Perfil cinético do crescimento microbiano e consumo de substrato em biorreator, empregando metanol a uma concentração de 7,7 g/L.

Parâmetros: Temperatura: 30 °C; Velocidade de agitação: 250 rpm; pH inicial: 7,0 e X₀: 400 mg/L

Tabela 5.1: Variáveis de resposta do perfil cinético.

$\mu_x(h^{-1})$	RPS (%)	$Y_{X/S}(g.g^{-1})$	$Q_x(mg. L^{-1}.h^{-1})$	$t_d(h^{-1})$
0,37	76	0,32	19	1,87

5.2. Ensaios de produção de biomassa microbiana em frascos

Foram realizados ensaios preliminares com a finalidade de determinar algumas variáveis importantes antes da etapa de otimização por meio de técnicas de planejamento experimental, como: concentração do substrato, concentração inicial de células e tempo de cultivo do préinóculo. Tais variáveis foram também acompanhadas com o objetivo de verificar a resposta da espécie microbiana frente a diferentes relações de carbono e nitrogênio (C:N), variação do pH, tempo de consumo do substrato para a obtenção de uma maior concentração de biomassa microbiana. O meio básico utilizado foi o mineral, cuja composição foi descrita no capítulo

Material e Métodos, com a adição do metanol como fonte de carbono e em alguns ensaios foi adicionado o extrato de levedura.

5.2.1 Ensaios preliminares de produção de biomassa microbiana variando a concentração inicial de metanol

Neste ensaio preliminar, cuja finalidade era investigar a capacidade da espécie em metabolizar o substrato metanol, em concentrações variadas, em um meio essencialmente mineral foram acompanhadas as variáveis de resposta de produção de biomassa microbiana, de consumo de metanol e variação de pH em diferentes concentrações de metanol. O consumo total do substrato variou de 48 horas (na concentração de 1,6 g/L) até cerca 150 horas (na concentração de 8,3 g/L), sinalizando a necessidade de se aumentar a concentração do inóculo para os ensaios posteriores, já que neste ensaio a concentração inicial de células foi baixa (0,05 g/L). Os resultados destes ensaios preliminares estão apresentados nas tabelas que se seguem.

Outro ponto a ser destacado após o tempo de acompanhamento do crescimento nos frascos foi a variação de pH em todas as concentrações. Nota-se que nas concentrações de metanol de 1,6 g/L e 5,4 g/L o pH começa a variar a partir do momento em que o substrato não se encontra mais presente no meio (Tabela 5.3). Enquanto o metanol ainda se encontra no meio de cultivo, o pH mantêm-se em torno de 7,0 a 7,8, somente aumentando para 8,0 ou mais, quando o metanol já não está disponível em todas as concentrações de metanol ensaiadas. Isto pode provavelmente estar associado à lise celular observada após esgotamento do substrato (Tabela 5.2). Sabe-se que o pH elevado significa uma baixa concentração de íons H⁺ e é capaz de alterar a integridade da membrana citoplasmática através de injúrias químicas aos componentes orgânicos e quanto ao transporte de nutrientes, ou por meio da destruição de fosfolipídios ou ácidos graxos insaturados da membrana citoplasmática.

Os rendimentos de substrato em biomassa foram calculados conforme as equações descritas em Material e Métodos. Verifica-se que o ensaio que apresentou o melhor valor para esta variável de resposta (Y_{X/S}=0,70 g/g) foi aquele em que a concentração inicial de substrato era de 5,4 g/L, o mesmo ocorrendo para a produtividade volumétrica em células (40 mg/L.h), que foi obtida na mesma concentração de substrato inicial.

As relações C:N foram estimadas considerando a concentração de metanol para a quantidade de nitrogênio (a partir do nitrato de potássio) adicionado ao meio na concentração de 1 g/L. Como a concentração de nitrogênio permaneceu constante somente com a variação da

concentração do substrato, a relação C:N guarda uma proporcionalidade com as concentrações iniciais de metanol. Desta forma, a concentração inicial de metanol correspondeu a relação C:N de 14,5, que foi considerada como a ótimas nesses ensaios preliminares.

Foi verificado que na concentração de 1,6 g/L de metanol inicial, que mesmo após o consumo integral de substrato, a célula ainda manteve um crescimento em biomassa por pelo menos mais 30 horas. Pode-se inferir que a bactéria mantenha algum tipo de reserva do carbono inicial, como por exemplo, polihidroxibutirato, que é uma das características de espécies metilotróficas capazes de crescerem em substratos de carbono único (ZÚÑIGA *et al*, 2011).

Há uma espécie de litotrofia quando o metanol está esgotado no meio, ou seja, a espécie utiliza possivelmente uma via assimilatória de CO₂.

Tabela 5.2: Ensaios preliminares do crescimento (X g/L) de *Methylobacterium organophylum* DSMZ – 18172 em metanol (CH₃OH g/L)

Tempo	[CH ₃ OH] ₀ =1,6g/L	[CH ₃ OH]	[CH ₃ OH] ₀ =5,4g/L] ₀ 6,9g/L	[CH ₃ OH] ₀ 8,3g/L		
(hs)	СН ₃ ОН	X (g/L)	СН ₃ ОН	X (g/L)	СН ₃ ОН	X (g/L)	СН ₃ ОН	X (g/L)	
0	1,63	0,05	5,43	0,05	6,90	0,05	8,27	0,05	
24	1,23	0,23	4,86	0,23	6,40	0,16	7,47	0,28	
31,5	0,21	0,47	4,54	0,41	5,22	0,47	6,91	0,32	
48	0	0,45	3,38	2,11	3,81	2,23	5,68	2,14	
58	0	0,55	2,21	2,30	2,39	2,76	4,44	2,22	
75	0	0,56	2,33	2,31	2,83	3,01	2,47	2,30	
101,5	0	0,15	1,01	2,24	0,58	3,18	2,40	2,31	
125,5	0	0,06	0	0,41	0	1,91	1,03	2,39	
149	0	0,06	0	0,29	0	1,77	0	2,05	
173	0	0,06	0	0,05	0	0,31	0	0,26	

	pH									
Tempo (h)	CH ₃ OH - 1,6g/l	CH ₃ OH - 5,4g/l	CH ₃ OH - 6,9g/l	CH ₃ OH - 8,3g/l						
0	7,43	7,23	7,10	7,08						
24	7,50	7,26	7,15	7,21						
31,5	7,71	7,74	7,70	7,82						
48	8,10	7,88	7,92	7,78						
58	8,66	7,99	8,16	7,89						
75	8,56	7,84	8,00	7,94						
101,5	9,00	8,05	8,08	8,02						
125,5	9,94	8,79	8,15	8,08						
149	8,84	8,62	8,87	8,51						
173	8,44	8,58	8,85	8,57						

Tabela 5.3: Variações de pH para as concentrações de metanol iniciais estudadas

Tabela 5.4: Variáveis de resposta do cultivo nas diferentes concentrações de CH₃OH

Metanol	μ_{x} (h^{-1})	<i>RPS</i> (%)	$\mathbf{Y}_{\mathbf{X/S}}$ $(\mathbf{g.g^{-1}})$	Q _x (mg/L.h)	X _m (g/L)	t _{Xm} (h)	t _d (h ⁻¹)	C:N
1,6 g/L	0,08	100	0,31	8,6	0,55	58	8,7	4,3
5,4 g/L	0,09	100	0,70	40	2,30	58	7,7	14,5
6,9 g/L	0,07	100	0,49	30	3,18	101,5	9,9	18,5
8,3 g/L	0,03	100	0,32	20	2,39	125,5	23	22,2

No que concerne às outras variáveis de resposta (tabela 5.4), observa-se que, mesmo com um meio de composição mínima a bactéria foi capaz de crescer eficientemente em todas as concentrações de metanol ensaiadas, consumindo integralmente este importante substrato. Por outro lado, as baixas taxas específicas de crescimento, variando de 0,03 a 0,09, denotam que a concentração do inoculo necessita ser aumentada e também que o meio deve ser otimizado, incluindo a incorporação de outros nutrientes a fim de não só aumentar a concentração celular, mas também aumentar a taxa específica de crescimento bacteriano.

5.2.2. Aumento da concentração do inóculo e da faixa de utilização de metanol para a produção de biomassa bacteriana.

Considerando os resultados iniciais, que apresentaram tempos realmente longos de cultivo tanto para a geração de biomassa bacteriana quanto para o consumo do substrato metanol, foi realizado um novo ensaio, com aumento da faixa de concentração inicial de substrato, bem

como empregando-se concentrações mais altas do inóculo. Os resultados desse ensaio estão apresentados na figura 5.2.

Observa-se, novamente, que a estratégia de ativação e de preparo do inoculo foi bem sucedida, na medida em que em todas as condições, as células entraram diretamente na fase exponencial do crescimento.

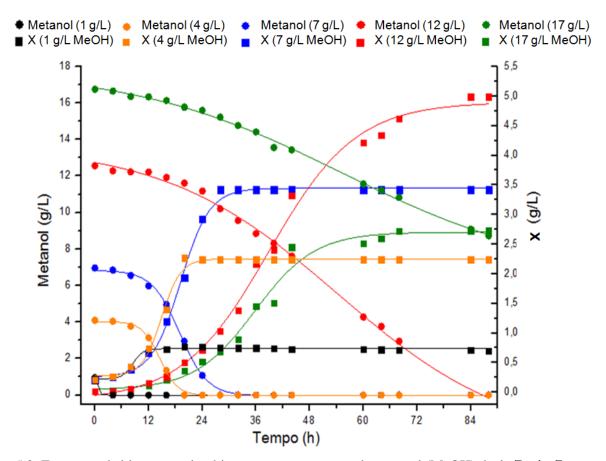


Figura 5.2: Formação de biomassa microbiana em concentrações de metanol (MeOH) de **1g/L**; **4 g/L**; **7 g/L**; **12g/L**; e **17 g/L**. (■) biomassa microbiana e (●) metanol. Temperatura: 30°C; Velocidade de agitação: 250 rpm; pH: 7,0 e X₀: ~ 0,2 g/L

Ressalta-se o extraordinário maquinário metabólico da linhagem utilizada no presente trabalho no que tange à capacidade de utilização de um substrato considerado tóxico para um grande número de organismos vivos. A bactéria foi capaz de consumir metanol em contrações tão altas quanto 17 g/L, mesmo que nesta concentração não tenha ocorrido o consumo total deste álcool. Verifica-se, ainda, que *Methylobacterium organophylum* cresce com taxas específicas de crescimento muito próximas para concentrações de substrato variando de 1 a 7 g/L. Para esta mesma faixa de concentração de substrato, as variações de pH ficaram dentro da faixa de

neutralidade entre 7,2 e 7,6. O aumento do pH após esgotamento do substrato nesta faixa de concentração não foi verificado, pois os ensaios foram interrompidos quando a concentração de metanol atingiu o valor nulo. Para concentrações iniciais de metanol de 12 g/L o pH ao final de 84 horas, ficou em 7,9 e na concentração de 17g/L em torno de 8,4, ao final deste mesmo tempo. Isto pode estar associado à toxicidade do metanol em concentrações mais elevadas, em que pese a habilidade das células em consumi-lo.

As principais variáveis de resposta dessa série experimental estão apresentadas na tabela 5.5, onde se pode verificar que, ao se compararem os resultados obtidos com aqueles dos ensaios preliminares, a estratégia de se aumentar a concentração do inoculo resultou no aumento da taxa específica de crescimento da bactéria, bem como da produtividade volumétrica em célula, que assumiu valores mais de duas vezes elevados em relação ao ensaio anterior.

Metanol inicial	μ _x (h ⁻¹)	RPS (%)	Y _{X/S} (g.g ⁻¹)	Q _x (mg/L.h)	X _m (g/L)	t _{Xm} (h)	t _d (h ⁻¹)	C:N
1 g/L	0,12	100	0,60	32	0,77	20	5,8	2,8
4 g/L	0,14	100	0,50	103	2,27	20	4,9	10,7
7 g/L	0,10	100	0,46	115	3,42	28	6,9	18,7
12 g/L	0,08	100	0,39	60	4,99	48	8,7	31,1
17 g/L	0,07	47,9	0,35	40	2,72	68	9,9	45,5

Tabela 5.5: Variáveis de resposta do cultivo em concentrações entre 1 g/L e 17 g/L de CH₃OH

A maior concentração celular (ca. 5g/L) foi obtida para a concentração inicial de metanol de 12 g/L, que foi integralmente consumido ao cabo de 84 horas de cultivo. Para a mais elevada concentração inicial de metanol, mesmo que tenha sido observada a tendência de continuidade do consumo, este ensaio foi interrompido, devido à redução da concentração celular final (ca. 2,7g/L) quando comparada àquela obtida com a concentração inicial de substrato de 12g/L. Para a mais alta concentração inicial de substrato (17 g/L) a redução percentual de substrato ficou em aproximadamente 48%. Nas demais houve consumo total do substrato.

Considerando a produtividade volumétrica em células, que leva em conta o tempo no qual a concentração celular máxima (3,42 g/L) foi obtida, o melhor valor para a relação C:N situou-se em 18,7 para a concentração de substrato inicial de 7 g/L.

Na figura 5.3, verificam-se os frascos dos ensaios utilizando 12 g/L e 17 g/L de metanol. A coloração da suspensão celular apresenta um tom rosáceo (característico dessa espécie), mais

forte na concentração 12 g/L do que na de 17 g/L, confirmando a concentração celular mais alta obtida a partir de 12 g/L de metanol do que aquela obtida a partir de 17 g/L.

Abbot & Clamen (1973), que calcularam os valores de rendimento bacteriano em relação a variadas fontes de carbono, destacam o rendimento de metanol em células de 0,40 g/g, assim como o rendimento e etanol em células de 0,68 g/g e para o metano em 0,62 g/g. Os resultados obtidos na presente dissertação estão em consonância com os preconizados por estes autores.

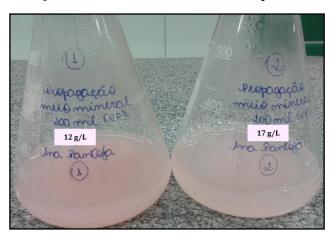


Figura 5.3: Frascos de cultivo nas concentrações de metanol de 12 e 17 g/L

Para uma maior ilustração, na figura 5.4 estão apresentados graficamente os valores de rendimento celular por substrato consumido, das taxas específicas de crescimento e concentração celular máxima obtidas para as relações C:N investigadas. Verifica-se que os valores de rendimento de metanol em células decaem com o aumento da relação C:N, seguramente pelos efeitos inibitórios causados pelo incremento desta importante relação. Por outro lado, a maior taxa específica de crescimento (0,14 h⁻¹) foi obtida para a relação C:N de 10,7; diminuindo para valores maiores da relação C:N.

Levando em consideração o desempenho satisfatório da linhagem bacteriana, em menor tempo, e com total conversão do substrato em células, verifica-se que a concentração inicial de metanol de 7 g/L (C:N=18,7) foi a escolhida como a melhor, sinalizando para um ensaio em batelada alimentada, mantendo-se a relação C:N abaixo de 20, o que indica uma boa relação entre estes elementos para o crescimento microbiano.

Como pode ser confirmada, ao se observar a figura 5.4, a concentração da biomassa microbiana máxima alcança valores mais altos para as relações de carbono e nitrogênio entre 18 e 31. No entanto, deve ser destacado que na maior concentração (ca. 5 g/L) foi obtida em um tempo de cultivo elevado de aproximadamente 85 horas.

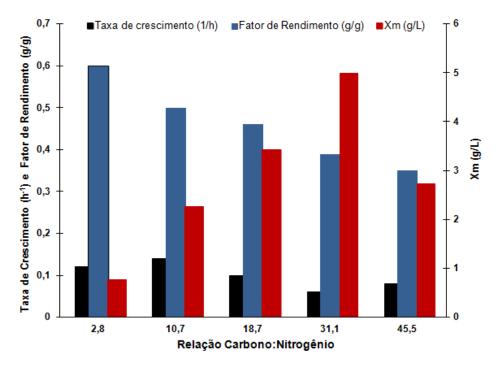


Figura 5.4: Relação entre os fatores de rendimento para a relação carbono e nitrogênio

5.2.3. Efeito do extrato de levedura no crescimento bacteriano em meio mineral com metanol como substrato

Com a finalidade de favorecer o crescimento, já que o produto desta dissertação é a própria biomassa bacteriana, foi utilizado o extrato de levedura como um componente ao meio mineral e metanol, que fornece não só fonte de nitrogênio, mas também vitaminas do complexo B, ácidos, co-fatores e precursores do crescimento celular. O extrato de levedura é um componente com cerca de 10 a 11,8 % de nitrogênio total em sua composição final, conforme descrito no capítulo Material e Métodos.

Os ensaios com adição de extrato de levedura foram realizados, a partir de experimentos preliminares de verificação da resposta da espécie bacteriana a esse incremento ao meio de cultivo, com baixa concentração de metanol e do extrato de levedura (ambas em 1 g/L). Os resultados apontaram para a possibilidade de se usar o extrato de levedura junto ao meio mineral (MMS), conforme ilustrado na figura 5.5. Neste gráfico é possível verificar que mesmo utilizando um inóculo quatro vezes menor para o ensaio com extrato de levedura em relação

aquele realizado em meio mineral, há uma maior geração de biomassa em torno de 90%, considerando ainda uma relação C:N de 1,5. O substrato metanol foi totalmente consumido no ensaio preliminar com extrato de levedura, levando-se em consideração que se encontrava em uma concentração de 1 g/L.

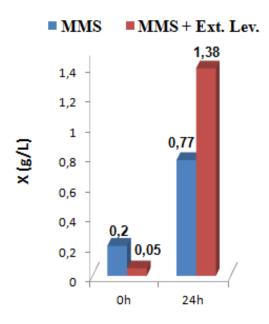


Figura 5.5: Efeito do extrato de levedura no crescimento de *Methylobacterium organophylum* DSMZ 18172. Parâmetros: Temperatura: 30° C; Velocidade de agitação: 200 rpm; pH: 7,0 e X_0 : 0,2 g/L (MMS) e X_0 :0,05 g /L (MMS + Extrato de levedura) e concentração de metanol usada: 1 g/L em ambos os ensaios.

Para os ensaios posteriores com a adição de extrato de levedura foram calculadas as relações C:N baseadas em uma concentração de nitrogênio total em 11% somada a concentração de nitrogênio presente no nitrato de potássio utilizado, que foi de 1 g/L.

Verifica-se um bom rendimento em células quando se utiliza o extrato de levedura, considerando que o mesmo apresenta vitaminas que potencializam a atividade das enzimas que compõem o metabolismo bacteriano. Para os ensaios posteriores foi mantida a concentração de 1g /L de extrato de levedura, variando-se as concentrações de metanol no meio de cultivo. Os resultados deste segundo ensaio e seus respectivos cálculos de produtividade volumétrica, fatores de rendimento e parâmetros cinéticos estão apresentados nas tabelas 5.7 e 5.8.

Constata-se que quando se usa uma concentração inicial de células mais baixa pode-se levar a uma geração de biomassa microbiana mais alta do que aquela obtida somente em meio mineral e metanol.

Os microrganismos dependem da disponibilidade tanto da fonte de carbono como também da fonte de nitrogênio. Os seres microbianos utilizam o nitrogênio na produção de aminoácidos, ácidos nucleicos, componentes da membrana celular e proteínas, por isso, a utilização do extrato de levedura no meio altera essa relação C:N no meio de cultivo. Para o ensaio representado na tabela 5.6, foi utilizada uma concentração mais alta de substrato, mantendo a concentração de 1 g/L de extrato de levedura no meio. Verifica-se que a concentração celular máxima alcançada foi de 4,9 g/L em um tempo de 28 h de cultivo. O substrato foi completamente consumido nesse ensaio e os valores de variáveis de resposta são apresentados na tabela 5.7.

Tabela 5.6: Resultados da produção de células e consumo de metanol em meio mineral com extrato de levedura. Parâmetros: Temperatura: 30 °C; Velocidade de agitação: 200 rpm; pH: 7,0 e X₀: 0,4 g/L, concentração de extrato de levedura utilizado: 1g/L e concentração de metanol inicial usada:~ 6 g/L.

Tempo (hs)	СН ₃ ОН	X (g/L)
	6g/L	
0	5,87	0,38
4	5,77	0,49
8	5,62	1,69
12	5,02	2,18
16	4,35	2,99
20	3,48	3,78
24	3,16	4,19
28	2,71	4,92
32	2,21	4,57
36	1,93	4,49
40	0,00	4,11

Tabela 5.7: Variáveis de resposta do cultivo na concentração de ca. de 6 g/L de CH₃OH

Metanol inicial	μ _x (h ⁻¹)	RPS (%)	Y _{X/S} (g.g ⁻¹)	Q _x (g/L.h)	X _m (g/L)	t _{Xm} (h)	t _d (h ⁻¹)	C:N
6 g/L	0,05	100	1,4	0,16	4,92	28	14	8,8

5.3. Planejamento experimental fatorial completo utilizando extrato de levedura

Tendo em vista os resultados promissores logrados com o estudo do efeito potencializador do extrato de levedura e com a finalidade de se maximar a produção de células bacterianas, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo $2^2 + 3$ PC (pontos centrais), conforme

descrito em Materiais e Métodos, avaliando o efeito combinado dos fatores: concentração de extrato de levedura e metanol.

Na figura 5.6 podem ser visualizados os meios de produção microbiana neste planejamento citado. Obviamente, a utilização de extrato de levedura no meio de cultivo eleva as concentrações de nitrogênio e reduzem as relações C:N.



Figura 5.6: Frascos do início dos ensaios (acima) e no tempo de 30 h de fermentação (em baixo).

Os resultados da matriz experimental estão apresentados na tabela 5.8, que exibe valores para a concentração de biomassa bacteriana variando de 5,56 a 9,49 g/L. Nota-se que a estratégia do planejamento experimental foi bem sucedida, já que os resultados desta principal variável de resposta, obtidos nos experimentos anteriores, não ultrapassaram 5 g/L.

Foi analisada a máxima concentração de biomassa microbiana obtida em cada ensaio do planejamento, nos tempos de cultivo indicados na tabela 5.8. Podem ser verificadas concentrações máximas de biomassa microbiana em torno de 9 g/L, de acordo com o ensaios 2 e 4, com concentração de substrato (metanol) de 2g/L e 12 g/L, respectivamente, para uma concentração de extrato de levedura de 15 g/L nos dois ensaios.

Tabela 5.8: Fatores estudados e respostas em rendimentos em biomassa

	Fator 1	Fator 2	Variável de Resposta	
Ensaios	A:extrato de levedura	B:metanol	biomassa bacteriana	C:N
	g/L	g/L	g/L	
1	5,00	2,00	5,56	1,1
2	15,00	2,00	9,43	0,4
3	5,00	12,00	5,85	6,5
4	15,00	12,00	9,49	2,5
5 (PC)	10,00	7,00	7,96	2,1
6 (PC)	10,00	7,00	7,56	2,1
7 (PC)	10,00	7,00	7,72	2,1

As relações C:N foram calculadas considerando a concentração de extrato de levedura usada, somada à concentração de nitrato de potássio componente do meio mineral (1 g/L). Verifica-se que as maiores concentrações celulares foram alcançadas nos ensaios 2 e 4, nos quais a relação C:N foi de 0,4 e 2,5 respectivamente, conforme tabelas 5.8 e 5.9.

Tabela 5.9: Valores de biomassa microbiana gerada em cada ensaio (X) e consumo de metanol (MetOH) do Planejamento Fatorial Completo (em g/L).

T		1		2		3		4	5	(PC)	6	(PC)	7	(PC)
(h)	X	MetOH												
0	0,07	2	0,11	2	0,09	12,7	0,08	12,8	0,08	7,70	0,09	7,89	0,17	7,73
6	0,12	1,48	0,12	1,68	0,11	12,83	0,11	12,7	0,11	7,65	0,11	7,88	0,12	7,26
12	0,48	1,16	0,50	1,58	0,36	12,48	0,30	11,9	0,43	7,24	0,42	6,54	0,39	7,18
18	3,21	0,69	3,18	1,49	1,75	12,04	2,46	11,04	2,74	6,84	2,74	6,34	2,17	7,10
25	4,69	0,46	5,95	1,29	4,58	10,92	4,70	11,04	5,34	6,56	5,42	6,27	4,94	6,80
30	5,56	0	6,93	1,26	5,85	9,80	6,53	11,04	6,84	5,93	5,49	6,12	6,19	5,93
37	5,15	0	7,29	1,22	5,72	9,61	6,98	10,70	7,53	5,93	7,56	5,70	6,68	5,86
43			7,60	1,17			8,06	10,04	7,96	5,92	7,48	4,21	7,72	5,67
49			9,23	1,07			8,83	9,91	7,59	5,78	6,07	2,11	7,01	5,56
55			9,43	0,00			9,49	9,85					_	
67			4,09	0,00			4,13	9,78					_	

Nos valores apresentados para a análise de variância (ANOVA), é importante considerar que o modelo é bastante significativo, com um valor de Fisher (116,31) mais alto quando comparado com o valor tabelado p (0,0085).

Iniciando a análise do R², um parâmetro importante a ser analisado é o coeficiente de determinação da variabilidade da resposta. Este parâmetro mede a qualidade de ajustamento da reta aos pontos experimentais. Verifica-se que o valor de 0,994 indica que 99% das variações na concentração de biomassa bacteriana são explicados pelo modelo ajustado, e que a regressão é significativa podendo ser utilizada para fins preditivos (tabela 5.10).

O valor de F da curvatura apresentado (1,14) sinaliza que a curvatura (como medida pela diferença entre a média dos pontos centrais e a média dos pontos fatoriais) na análise das respostas não é significativa em relação ao ruído. Há uma chance de 39,75% de que este ocorre devido ao ruído, ou seja, podem ser entendidos como falhas na execução dos ensaios.

A média quadrática visualizada para o erro puro apresenta um valor baixo (0,041), que torna os testes de significância, para uma falta de ajuste, irrelevantes, corroborando com os valores encontrados, pois o programa não calculou o valor de *lack of fit*, ou falta de ajuste, oque significa que o modelo se ajustou adequadamente aos pontos experimentais, representando com confiabilidade os resultados.

Através da soma dos quadrados é possível observar qual parâmetro apresenta maior efeito dentre os fatores avaliados. O extrato de levedura foi o fator mais significativo, seguido do metanol. A combinação entre o extrato de levedura e o metanol não foi significativa, portanto, esta variável pode ser retirada do modelo.

Tabela 5.10 :Tabela da ANOVA para a resposta em biomassa bacteriana.
--

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p	
Model	14,14	3	4.71	116,31	0,0085	Significativo
A-Extrato de Levedura	14,10	1	14,10	347,86	0,0029	
B-Metanol	0.031	1	0,031	0,76	0,4764	
A x B	0,013	1	0,013	0,33	0,6255	
Curvatura		1	0,046	1,14	0,3975	Não significativo
Erro puro	0,081	2	0,041			
Total	14,27	6				
\mathbb{R}^2	0,994					

Porém, é naturalmente perceptível que independente das concentrações de extrato de levedura, há uma considerável produção de biomassa microbiana, independente da concentração de metanol presente no meio.

Comparando as respostas experimentais com os valores preditos pelo modelo pode-se analisar que os valores experimentais revelam que os mesmos estão próximos da reta e, que, além disso, os desvios entre eles estão distribuídos normalmente, ou seja, os desvios positivos e negativos estão na mesma proporção, indicando que este é um bom modelo (figura 5.7).

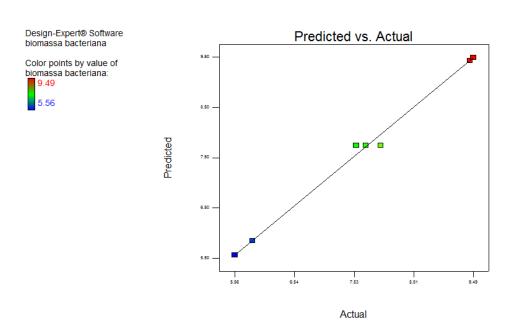


Figura 5.7: Gráfico dos valores preditos em relação aos encontrados nos ensaios para produtividade em biomassa microbiana máxima

O diagrama de Pareto também corrobora com a análise de que o extrato de levedura foi o fator mais importante, conforme se observa na figura 5.8. O referido histograma confirma que a influência do extrato de levedura (1) é maior em relação ao metanol (2), para um intervalo de confiança de 95%. A interação entre os dois fatores é considerada negativa.

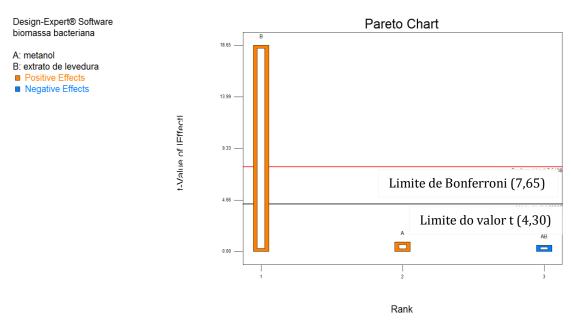


Figura 5.8: Histograma de Pareto da influência das variáveis e suas interações, de acordo com a soma quadrática (*Sum of Squares*), para as análises, considerando uma produção em biomassa bacteriana máxima. Análise para o intervalo de confiança de 95% (p<0,5).

Na figura 5.9, podem ser observados que todos os ensaios apresentam-se dentro de uma faixa normal prevista em percentual e todos eles estão próximos a reta principal, principalmente as concentrações da biomassa bacteriana em torno de 5,56 g/L. Pode-se considerar que o modelo proposto descreve bem os dados experimentais, visto que muitos dos pontos ficam próximos à linha da probabilidade normal, sendo observada a normalidade desses resíduos na presente série experimental .

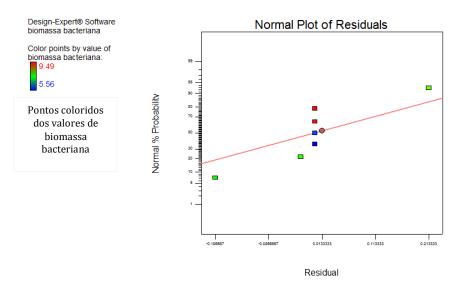


Figura 5.9: Gráfico de normalidade dos resíduos para produtividade em biomassa microbiana máxima

5.3.1 Validação da otimização do Planejamento

Empregando-se a função *desirability* (desejabilidade) para atingir um ótimo desejável, ou seja, uma mais alta concentração da biomassa bacteriana, pode ser observada na figura 5.10, a sugestão de um conjunto de condições que maximiza esse rendimento global. Os valores são de uma concentração de extrato de levedura entre 13 g/L e 15 g/L para uma concentração de metanol que pode variar entre 2g/L e 12 g/L. Nessas condições, a variável de resposta, que é a concentração da biomassa bacteriana, expressa em g/L, pode gerar valores entre 8,5g/L e 9,5g/L.

O programa sugere uma concentração de extrato de levedura fixada em torno de 15 g/ L, combinada a uma concentração de metanol de 12 g/L, não sendo este um fator de maior impacto na geração de biomassa bacteriana, já que pode-se verificar que a mesma praticamente não varia, independente da concentração de metanol que se usa.

Para a realização do experimento, os valores gerados pelo programa *Design Expert* 9.0, já anteriormente descritos foram usados nesse ensaio.

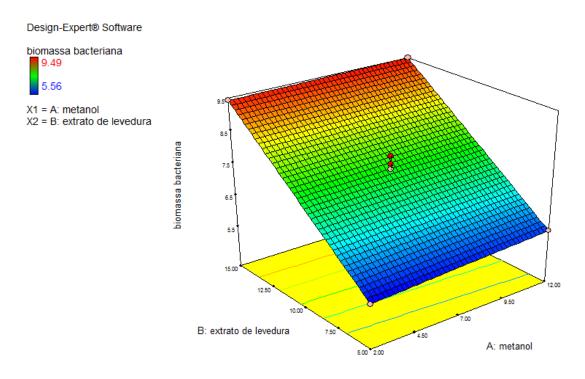


Figura 5.10: Superfície de Resposta em 3D para biomassa bacteriana, da função desirability.

Para efeito de comparação, na tabela 5.11 encontram-se os valores preditos e o valor obtido no experimento de validação (7,2 g/L). Este se mostra um pouco abaixo da faixa inferior e superior preditas, que foram de 8,7 e 10,3 g/L de biomassa bacteriana. Porém, o resultado

demonstrou que a faixa de concentração de metanol sugerida pelo programa poderia ser mais baixa para que se obtivessem melhores resultados nesse ensaio de validação.

As combinações de metanol e extrato de levedura utilizadas nesse ensaio de validação foram de 2 g/L e 12 g/L respectivamente e a biomassa obtida nesse ensaio foi de 7,2 g/L, abaixo do valor previsto pelo programa que foi de 9,5 g/L, como pode ser visto na tabela 5.11.

Tabela 5.11: Valor de biomassa predita e experimental de acordo com a função *desirability* para a produtividade em biomassa microbiana máxima

	Limite inferior	Limite superior	Biomassa Predita	Valor Experimental
Biomassa bacteriana (g/L)	8,67	10,31	9,5	7,2

5.4. Observação macroscópica e microscópica da formação de biofilme por *Methylobacterium organophylum* DSMZ – 18172 em metanol

A partir de observações dos frascos e do crescimento em biorreator, foram realizadas imagens por micrografia eletrônica, com o intuito de verificar mais detalhadamente, como se revelaria esse tipo de formação que se apresentou como uma espécie de biofilme microbiano (seta), observado ao se acumular na interface superior dos frascos durante o acompanhamento do processo, como pode ser verificado na figura 5.11 a.

Constata-se um tipo de matriz onde as bactérias estão inseridas, parecendo estarem protegidas da ação do substrato às suas estruturas celulares. Essa característica é visualizada na figuras 5.11 b a e 5.11 d, nas quais se percebe uma matriz homogênea onde estão inseridas as células microbianas.

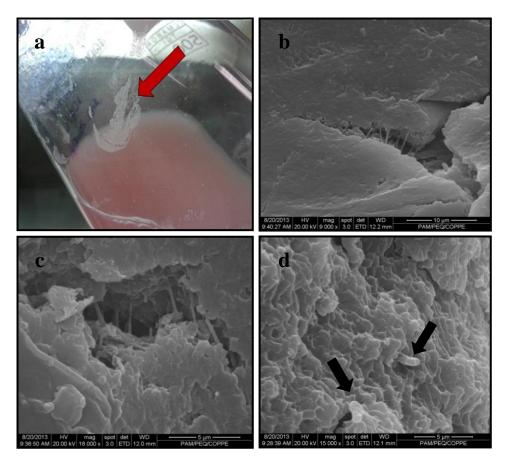


Figura 5.11: Formação de um tipo de biofilme microbiano na interface superior do meio de cultivo em frasco (a) e Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) de amostra de crescimento em frasco ao término do ensaio em batelada simples (12g/L de metanol inicial). A imagem ${\bf b}$ mostra uma resolução de maior tamanno 10 μ m, diminuindo para 5 μ m nas imagens ${\bf c}$ e ${\bf d}$.

5.5. Ensaios de crescimento em biorreator instrumentado

Foram realizados ensaios em biorreator instrumentado, nos quais o intuito era validar e corroborar com os resultados encontrados nos ensaios em frascos agitados, porém, com maior controle do processo, em relação ao pH e ao oxigênio dissolvido no meio. Inicialmente, foram escolhidas concentrações de metanol ligeiramente acima de 7 g/L, por ter sido a faixa que apresentou melhores resultados de conversão de substrato em células e de taxa específica de crescimento bacteriano, nos ensaios em frasco. Foram realizados ensaios sem e com controle de pH para comparar com os resultados em frasco e verificar a influência de tal estratégia de processo na geração de biomassa bacteriana.

5.5.1. Batelada simples sem controle de pH e O.D.

Em um primeiro ensaio utilizando biorreator instrumentado foi acompanhado o crescimento celular durante um tempo de 50 horas. Neste ensaio não foi controlado o pH e o oxigênio dissolvido (O.D.) e a temperatura foi mantida a 30°C e agitação em 250 rpm. A vazão de ar foi fixada em 1,0 vvm. O inóculo consistiu de 10 % (v/v) e o volume útil do biorreator foi de 1 litro. Ressalta-se que o meio de cultivo foi o de composição básica (meio mineral e metanol). Verifica-se um aumento considerável no pH do meio ao longo do crescimento, conforme é mostrado na figura 5.12.

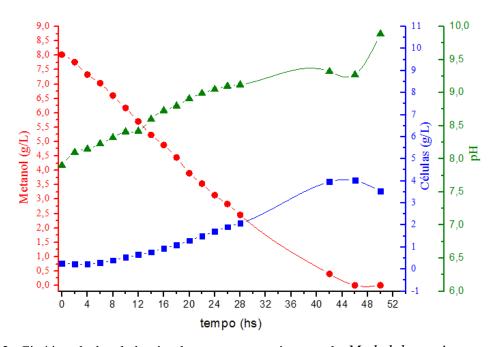


Figura 5.12: Cinética da batelada simples para o crescimento de *Methylobacterium organophylum* DSMZ 18172 em biorreator instrumentado sem controle de pH.

O metanol é completamente consumido no meio de cultivo, porém somente após 45 horas. A concentração celular máxima foi de aproximadamente 4,0 g/L, alcançada em 45 horas. O pH inicial foi de 7,9 e aumentou gradativamente como o curso do processo de crescimento, atingindo o valor de 9,3 no momento em que se atingiu a concentração celular máxima. As variáveis de resposta para esse ensaio e seus valores são indicadas na tabela 5.12.

Verifica-se, nessa condição, um valor pequeno para a taxa específica de crescimento, que resultou em um valor elevado para o tempo de duplicação da biomassa bacteriana, o que

provavelmente pode ser atribuído a ausência de fatores de crescimento (co-fatores e aminoácidos). No entanto, a bactéria foi capaz de crescer eficientemente e apresentou um fator de conversão de substrato em células de 0,47 g/g. A bactéria consumiu integralmente o metanole apresentou um valor para a produtividade volumétrica em células de 80 mg/L.h.

Tabela 5.12: Fatores de rendimento para biorreator em batelada simples com 8 g/L de Metanol

Metanol	μ _x (h ⁻¹)	RPS (%)	Y _{X/S} (g.g ⁻¹)	Q_x (mg. L ⁻¹ .h ⁻¹)	X _m (g/l)	t _{Xm} (h)	t _d (h ⁻¹)	C:N
8 g/L	0,05	100	0,47	80	4,02	46	13,0	21,4

5.5.2 Batelada Simples com controle de pH e O.D.

Nesse ensaio, também em biorreator instrumentado, foi acompanhado o crescimento celular durante cerca de 30 horas, em uma temperatura de 30°C e agitação mecânica de 250 rpm. A concentração do inóculo foi a mesma do ensaio anterior. A taxa específica de aeração foi fixada em 1,5 vvm, maior do que no caso anterior (ensaio sem controle de pH). Os resultados deste experimento estão apresentados na figura 5.13, na qual se observa que o pH foi razoavelmente fixado em valores próximos da neutralidade e o oxigênio dissolvido foi mantido em 80% da saturação. A concentração celular máxima foi de 3,9 g/L, alcançada em apenas 18 horas de cultivo, aproximadamente a mesma obtida no ensaio sem controle de pH, bem como o fator de conversão de metanol em célula. Fica claro, como o controle do pH e a alta disponibilidade de oxigênio favoreceram o crescimento bacteriano, refletido nos valores das variáveis de processo relacionadas ao tempo, como taxa específica de crescimento que aumento aproximadamente em três vezes. O tempo de cultivo para a obtenção da concentração celular máxima foi reduzido de 45 para 18 horas. Os fatores de rendimento desse ensaio estão na tabela 5.13.

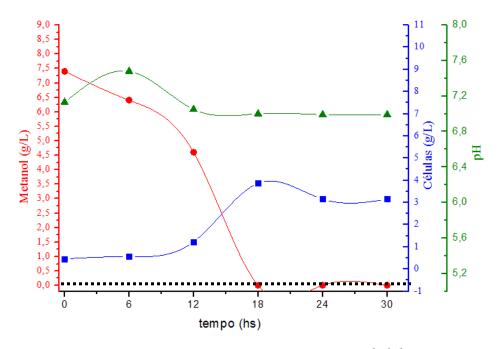


Figura 5.13: Cinética da batelada simples para o crescimento de *Methylobacterium organophylum* DSMZ 18172 em biorreator instrumentado com controle de pH.

Tabela 5.13: Fatores de rendimento para biorreator em batelada simples com 7 g/L de Metanol

Metanol	μ _x (h- ¹)	<i>RPS</i> (%)	$\mathbf{Y}_{\mathbf{x}/\mathbf{s}}$ $(\mathbf{g}.\mathbf{g}^{-1})$	Q_x (mg. L ⁻¹ .h ⁻¹)	X _m (g/l)	t _{Xm} (h)	t _d (h ⁻¹)	C:N
7 g/L	0,16	100	0,48	190	3,87	18	4,3	19,8

Segundo Borzani *et al.* (2005), o suprimento de oxigênio durante um processo fermentativo ocorre a partir da transferência desse gás da fase gasosa para a líquida (meio de cultura), sendo que esta depende da interface gás e líquido circundante às bolhas de ar, de uma distribuição do oxigênio até as células que depende de uma agitação eficiente do meio de cultura, do consumo de oxigênio pelas células, que apresentam uma resistência em função da película existente na superfície das mesmas e, também, pela taxa da reação de absorção do oxigênio. Mantida a velocidade de rotação em 250 rpm, mas com uma maior vazão de ar (1,5 vvm) observou-se um melhor resultado no processo em termos de tempo, consumo de substrato a partir desta condição, como discutido anteriormente.

O fator de conversão de metanol em células de 0,48 g/g é semelhante ao encontrado no trabalho de Prokop *et AL* (1984), no qual o rendimento máximo de biomassa da cultura utilizada no estudo foi de 0,48 g/g com 30 g de metanol/L na alimentação. A diferença encontra-se na concentração de metanol utilizada, pois no presente trabalho foi utilizada uma concentração bem

mais baixa, obtendo-se um rendimento semelhante ao encontrado pelos autores citados. No trabalho de Prokop *et al* (1984) não foram especificadas as espécies utilizadas, porém a condução do processo foi contínua. Os autores citam ainda que o rendimento em torno de 0,48 g/g foi obtido em fermentador de 14 litros com diferentes taxas de diluição; no entanto, não citam a concentração celular encontrada ao final do processo, apenas mencionam o perfil de proteínas e aminoácidos determinados pelo método Kjeldahl.

Na figura 5.14 (a), novamente, observa-se com nitidez, a formação de um biofilme pigmentado na interface meio e *headspace*. No entanto, o pigmento se mostra com uma coloração em tom alaranjado, diferentemente do tom percebido no meio durante o cultivo. Essa observação corrobora com a informação de que a célula realmente produz algum tipo de pigmento do tipo carotenoide, como pode ser visualizado no frasco da figura 5.14 b, ao término desse ensaio.



Figura 5.14: Formação de um biofilme com pigmento visível, acumulado na interface superior do biorreator (a) e Crescimento bacteriano em meio mineral ao final do cultivo em biorreator (b), como coloração da suspensão de células em tom rosáceo, denotando a produção de pigmentos do tipo carotenoides pela espécie *Methylobacterium organophylum* DSMZ 18172.

5.5.3. Batelada alimentada por pulso de metanol em meio mineral

Neste ensaio, realizado em biorreator, o pH foi controlado no valor 7.0 e oxigênio dissolvido inicialmente mantido em 85% da saturação, com agitação de 250 rpm. A taxa específica de aeração inicial (1,0 vvm) foi aumentada de forma gradativa (a cada 6 horas, iniciando em 6 horas de cultivo) até o valor de 4,0 vvm, considerando o aumento da biomassa microbiana, cuja demanda aumenta proporcionalmente. De forma que o sistema operou sem

limitação de oxigênio. O processo total durou 36 horas. Os resultados desta série experimental estão apresentados na figura 5.15.

O experimento iniciou-se com uma batelada simples com uma concentração inicial de metanol de 5,72 g/L, que se esgotou em 18 horas, tempo em que se atingiu a concentração de células de 3,6 g/L. Na sequência, uma alimentação de metanol em meio mineral foi realizada a fim de se atingir a mesma concentração inicial de metanol no meio de cultivo (5,48 g/L), o que foi realizado com sucesso. Observa-se que a bactéria, uma vez aclimatada, foi capaz de consumir mais eficientemente o metanol, em um tempo mais reduzido (12 horas) do que a batelada inicial (18 horas), atingindo um valor de concentração final de células de 10,14 g/L. Nas duas etapas o metanol foi consumido integralmente.

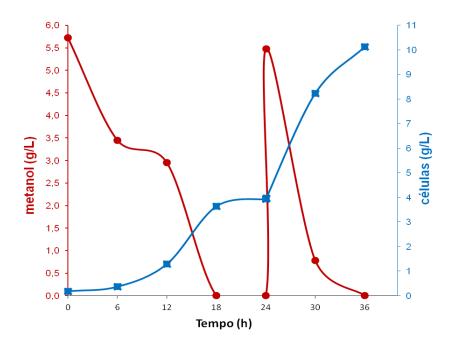


Figura 5.15: Crescimento de *Methylobacterium organophylum* DSMZ 18172 por batelada com alimentação por pulso de metanol e meio mineral

De acordo com as variáveis de resposta apresentadas na tabela 5.14, verifica-se um fator de conversão de substrato em células bem maior do que nos demais ensaios realizados, confirmando que a estratégia da batelada alimentada se mostrou altamente eficiente para se lograrem altas densidades celulares. Outro aspecto que merece destaque relaciona-se à

produtividade volumétrica em células que aumentou em 3,2 vezes na etapa de batelada alimentada propriamente dita.

Tabela 5.14: Variáveis de resposta do crescimento em biorreator em batelada alimentada por pulso	Tabela 5.14: Variá	veis de resposta de	o crescimento en	biorreator em	batelada alim	entada por pulso.
--	--------------------	---------------------	------------------	---------------	---------------	-------------------

Metanol Inicial 5,8g/L	μ _x (h ⁻¹)	<i>RPS</i> (%)	Y _{X/S} (g.g ⁻¹)	Q_x (mg. L ⁻¹ .h ⁻¹)	X _m (g/l)	t _d (h ⁻¹)	C:N
Batelada inicial	0,173	100	0,62	160	3,64	4,1	15,5
Batelada alimentada	0,123	100	1,13	510	10,14	5,6	13,3

O aspecto dos biorreatores se encontra na figura 5.16, onde pode ser observado que em um intervalo de 24 horas, há um considerável aumento da densidade celular no meio de cultivo.



Figura 5.16 Biorreatores *Biostat B* mostrando o crescimento de *Methylobacterium organophylum* DSMZ 18172 no início (a) e em um intervalo de 24 h (b).

5.6. Evolução dos valores de concentração celular e produtividade volumétrica em todos os ensaios realizados em metanol

Os resultados obtidos na presente dissertação de mestrado, aqui representados pela concentração da biomassa bacteriana e pela produtividade volumétrica, mostram significativo avanço no desenvolvimento de um bioprocesso para a produção de proteína de unicelular a partir de metanol. Verifica-se (Figura 5.17), que se aumentou a concentração celular e a produtividade volumétrica em células em 3,2 e 17 vezes, respectivamente.

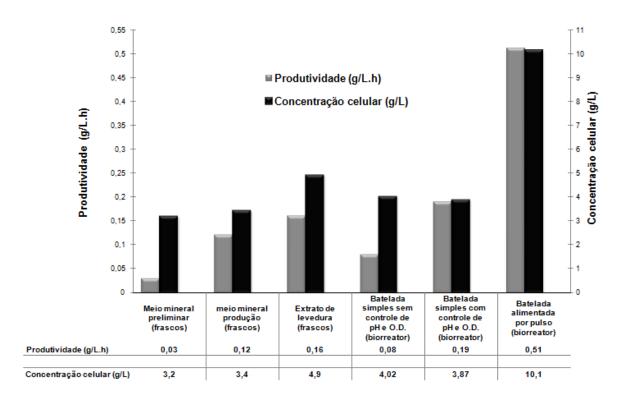


Figura 5.17: Visão geral dos resultados obtidos em todos os ensaios realizados em frascos agitados e biorreator realizadas em metanol

5.7. Ensaio de crescimento microbiano em meio mineral com metano como fonte de carbono

Com a finalidade de verificar o comportamento da espécie quando em meio mineral com metano como fonte de carbono, foram realizados ensaios utilizando provetas montadas em colunas conectadas para permitir a entrada do substrato metano (figura 5.18). A temperatura não pôde ser controlada na faixa ideal para o crescimento da espécie bacteriana, que é de 30 °C, ficando as provetas submetidas a variações da temperatura ambiente.

Adicionalmente, os borbulhadores, localizados na região inferior das provetas, não promoveram uma boa homogeneidade do sistema, originando uma sedimentação das células e baixos tempos de retenção do metano e oxigênio. Este menor crescimento se deve a vários fatores como: meio de composição simples associado à baixa solubilidade de metano em meio aquoso, considerando ainda a possível variação na temperatura do cultivo, que não pode ser controlada na faixa necessária.

Em um ensaio preliminar, somente utilizando meio mineral, havia sido estabelecida uma vazão de ar/metano de 35 mL por minuto, os resultados não foram satisfatórios, com crescimento

microbiano não expressivo, o que foi atribuído à baixa vazão de gases que não gerava uma circulação homogênea ao longo da proveta, comprometendo a transferência de massa da fase gasosa para líquida, tanto de oxigênio quanto de metano. Verificou-se a necessidade de se aumentar a vazão de gases para promover uma dissolução maior desses substratos gasosos no meio líquido.

Nesta série experimental foi utilizada uma maior vazão de gases (metano e oxigênio) e foram adicionados outros fatores que pudessem promover uma maior dissolução dos gases no meio líquido. Adicionalmente, outros componentes foram adicionados ao meio. O extrato de levedura que foi sinalizado no planejamento experimental como um fator de grande importância no metabolismo da bactéria em investigação. O surfactante Tween 80 foi escolhido com a finalidade de se promover uma melhor transferência dos gases no meio líquido. Desta forma, o uso do surfactante visou diminuir a tensão superficial e, consequentemente, aumentar a solubilização do metano e do oxigênio, fazendo com que estes nutrientes pudessem ser usados pelas células de maneira mais efetiva. Portanto, foram realizados experimentos nas seguintes condições:

- 1. (MMS) Meio mineral + 50% CH₄ (75 mL/min);
- 2. (EL+MMS) Meio mineral + Extrato de levedura (0,5 g/L) + 50% CH₄ (75 mL/min);
- 3. (SURF.+MMS) Meio mineral + Surfactante Tween 80 (0,5% v/v) + 50% CH₄ (75 mL/min).

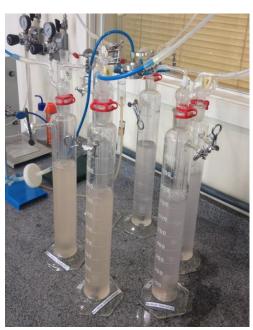


Figura 5.18: Sistema constituído de provetas para o crescimento de *Methylobacterium organophylum* DSMZ 18172 em metano para diferentes condições de ensaio.

Os resultados mostram importantes variações nas concentrações celulares quando se utilizam o extrato de levedura adicionado ao meio mineral alimentado com o metano e o surfatante Tween 80. Mais uma vez, fica comprovada a importância do extrato de levedura como agente complementar do crescimento bacteriano. Mesmo acreditando que o surfactante representasse uma fonte de carbono adicional para as células, além de sua ação tenso ativa, o baixo crescimento com a adição desse componente ao meio mineral mostrou não ser uma estratégia interessante para o desenvolvimento desse bioprocesso.

Considerando que a concentração do inóculo foi de 0,15 g/L, observa-se que a concentração celular no ensaio com meio mineral (MMS) duplica em 40 h de cultivo. Por outro lado, o resultado da concentração final de células no meio mineral combinado ao extrato de levedura (EL+MMS) foi de 0,58 g/L, atingida em 120 horas de cultivo, correspondendo a um aumento de aproximadamente 4 vezes quando comparado a concentração do inóculo. O elevado tempo para obtenção de concentrações relativamente baixas quando comparadas aos ensaios com metanol está certamente relacionado às resistências opostas à transferência dos solutos gasosos, como mencionado anteriormente. Os resultados dos perfis cinéticos das condições ensaiadas estão apresentados na figura 5.19.

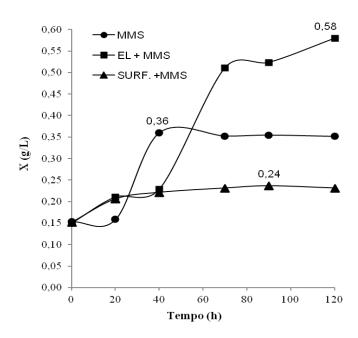


Figura 5.19: Resultados do crescimento em meio mineral, meio mineral com extrato de levedura e meio mineral com surfactante.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

- Ensaios preliminares permitiram confirmar a característica metilotrófica da linhagem *Methylobacterium organophylum* DSMZ 18172. Em uma condição ainda não otimizada, a bactéria foi capaz de converter o substrato metanol em biomassa com valores de **Y**_{X/S} de **0,32 g.g** e da taxa específica de crescimento, **μ**_x, de **0,31 h**-1, correspondendo a um tempo de duplicação de **2,24 h**. Verificou-se uma coloração rosácea nos meios de cultivo em frascos, avocando a atenção para essa característica particular da espécie. A morfologia foi também comprovada como Gram negativa e a forma de bacilo da espécie foi confirmada.
- A bactéria foi capaz de utilizar metanol em concentrações variando de 1g/L a 17 g/L. Verificou-se uma redução nos valores da taxa específica de crescimento (μ_x) de $0,12 h^{-1}$ (para a menor concentração de metanol de 1 g/L) a $0,07 h^{-1}$ (para a maior concentração de metanol de 17 g/L). O mesmo ocorrendo para o fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) que assumiu o valor de $0,6 g.g^{-1}$ para a menor concentração de metanol, reduzindo-se para $0,38 g.g^{-1}$ para a maior concentração de metanol.

- A investigação do efeito do extrato de levedura no crescimento de *Methylobacterium* organophylum DSMZ 18172 mostrou ser esse insumo um importante componente para o crescimento. A adição de apenas 1 g/L de extrato de levedura em meio mineral combinada a apenas 1 g/L de metanol foi capaz de aumentar a concentração final de células em aproximadamente 28 vezes, quando comparada ao meio mineral sem o extrato de levedura. Na sequência, aumentando a concentração de metanol para 6 g/L e mantendo-se a concentração de extrato de levedura em 1 g/L, logrou-se uma concentração de células de aproximadamente 5g/L.
- Empregando a técnica do planejamento fatorial completo foi possível obter concentrações de células tão altas quanto 9,5 g/L em meio mineral contendo metanol e extrato de levedura. Nesta série experimental, ficou mais do que confirmada a imprescindibilidade do extrato de levedura como potencializador do crescimento. Isso foi confirmado através das análises realizadas no *software* estatístico *Design Expert 7*, que apontou a maior influência do extrato de levedura em relação ao metanol e à combinação destes dois fatores combinados. O diagrama de Pareto mostrou ser o extrato de levedura o fator de maior efeito, assim como analisando os valores de média quadrática e teste F, que foram bastante significativos.
- Foi observado um tipo de biofilme aderido à superfície do frasco contendo meio de cultivo, não tendo sido encontrado na literatura nenhuma referência que elucidasse a composição desse material, que se apresenta como um filme espesso, com a visualização de poucas células aparentes, o que foi confirmado pela microscopia eletrônica de varredura.
- Através do emprego da batelada alimentada por pulsos com metanol em meio mineral foi possível atingir concentrações tão altas quanto 10,0 g/L em um tempo de 36 horas, com um valor para a taxa específica de crescimento, μ_x , de 0,1 h^{-1} e para o fator de conversão de metanol em células, $Y_{X/S}$, de 1,13 $g.g^{-1}$.
- Nos cultivos em batelada simples, sem e com controle do pH, verificou-se ser de suma importância o controle deste parâmetro, cujos ensaios apresentaram valores de μ_x de $0.05h^{-1}$ e $0.16h^{-1}$ respectivamente. Os valores de produtividade volumétrica em células foram de,

respectivamente, **80 mg.L⁻¹.h⁻¹** e de **190 mg.L⁻¹.h⁻¹** (mais de 2 vezes maior quando comparado com o ensaio sem controle de pH). Há, portanto um ganho em produtividade e em valor de μ_x quando se controla esse importante parâmetro. Nos experimentos em biorreator ficou mais uma vez evidenciada a característica rosácea do meio de cultivo.

• Foi observada a capacidade da espécie *Methylobacterium organophylum* DSMZ – 18172 de crescer em meio mineral com **metano** como substrato e, novamente, confirmada a importância da utilização do extrato de levedura como potencializador do crescimento bacteriano, obtendo-se uma concentração celular de **0,58 g/L**, em 120 horas de cultivo. Obviamente que a menor concentração celular e o maior tempo quando comparados com aqueles atingidos em metanol estão associados a baixa taxa de transferência de massa do metano da fase gasosa para a líquida.

6.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Analisar estratégias de cultivo de *Methylobacterium organophilum* DSMZ 18172 visando à produção de carotenoides e outros produtos de valor agregado, como PHB (poli hidroxibutiratos), tendo o metano, como uma fonte de carbono, além do metanol.
- Caracterização da biomassa bacteriana para identificar o conteúdo nutricional (teor de proteínas, perfil de aminoácidos, ácidos nucléicos, lipídios e carboidratos totais), bem como de sais minerais presentes, a fim de se avaliar o potencial destas células para o consumo humano e animal.
- Ensaiar outras formas de operação do bioprocesso, como a batelada com alimentação estendida e a condução contínua, visando aumentar a produtividade em células.
- Avançar no desenvolvimento de um bioprocesso tendo metano como substrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQUIM. Associação Brasileira da Indústria Química. Anuário da Indústria Química (2010) São Paulo: ABIQUIM.

ABBOTT, B.J.; CLAMEN, A. (1973) The relationship of substrate, Growth rate and maintenance coefficient to single cell protein production. Biotechnology Bioengineering. 15, 117.

ABOU-ZEID A.; ABOU-ZEID; BAGHLAF, A. O. (1983) Methanol as the Carbon Source of Production of Single-Cell Proteins (SCP-s). Department of Chemistry. King Abdulaziz University. Joddah/ Saudi Arabia. Zentralblatt für Mikrobiologie. Volume 138, Issue 6, Pages 451–464

ABOU-ZEID, A.-Z. A.; KHAN, J. A.; ABULNAJA, K. O. (1995) On methods for reduction of nucleic acids content in a single-cell protein from gas oil. Bioresource Technology, v.52, n.1, p.21-24.

ANUPAMA; RAVINDRA P. (2000) Value-added food: single-cell protein. Biotechnology Advances, v.18, n.6, p.459-479.

ANTHONY, C. (1982). The biochemistry of methylotrophs. Department of Biochemistry. University of Southampton. England. London: Academic Press.

ANTHONY C.; GHOSH, M. (1998) The structure and function of the PQQ- containing quinoprotein dehydrogenases. Progress in Biophysics & Molecular Biology. 69: 1-21.

ANTHONY C.; WILLIAMS, P. (2003) The structure and mechanism of methanol dehydrogenase. Biochimica et Biophysica Acta 1647, 18–23.

ASTHANA, H; HUMPHERY, MORITZ, A. E V. (1971). Growth of yeast on methanol as the sole carbon substrate. Biotechnology and Bioengineering. Volume 13, Issue 6, pages 923–929, November 1971

BARTHOLOMEW, W.H.; REISMAN, H.B. (1979). Economics of fermentation processes in microbial technology. In: PepplerHJ, PerlmannD, editors. Fermentation technology, 2nd ed., vol. 2. New York: Academic Press. p 463–496. Bioengineering AG. Manufacturers.

BAXTER, N.J.; HIRT, R.P.; BODROSSY, L.; KOVACS, K.L.; EMBLEY, T.M.; PROSSER, J.I.; MURRELL, J.C. (2002) The ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase gene cluster of Methylococcus capsulatus (Bath). Arch Microbiol. Apr;177(4):279-89.

BIODIESELBR (2014) Metanol de biomassa.

Disponível em: http://www.biodieselbr.com/energia/alcool/metanol-biomassa.htm
Acesso em Jan. 2014

BLACKMORE, M. A.; QUAYLE, J. R.; WALKER, I. O. (1968) Biochem. 1. 107: 699-704, 705-13 Apud DONOVAN, P.K. (1971) Autotrophy: concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism. Annu. Rev. Microbiology. 25:177-210

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; AQUARONE, E. Biotecnologia. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2005. V. 2: Processos fermentatitos e enzimáticos.

BRUNS, R.E, NETO B., B., SCARMÍNIO, I.S, (1995) Planejamento e Otimização de experimentos. Editora UNICAMP.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. (1978). Statistics for experimenters. New York: John Willey & Sons.

BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. (1991) Biotecnologia básica. Zaragoza: Acríbia.

BURIN, Rodrigo, (2011). Variabilidade da qualidade da água e do estado trófico do reservatório do vacacaí mirim. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Tecnologia. Programa de pós-graduação em Engenharia Civil e Ambiental. 120 p.

CARVALHO, J. C. M. de; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCHMIDELL, W.et al. (Coords.). Biotecnologia industrial: volume 2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 541 p.

CHESNAIS, F. (1982) The impact of biotechnology on industrial process. Discussion paper. SJ, s.ed., (mimeo).

CAMARGO, A. M. (2007) Inventário do ciclo de vida do metanol para as condições brasileiras. Ed. rev. -- São Paulo, 117 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

CICLO DO CARBONO. Esquema simplificado. Disponível em: http://materiais.dbio.uevora.pt/Micro/bonus2.html Acesso em: Março 2014.

CHEN, Y.; CROMBIE A.; RAHMAN, M. T.; DEDYSH, S. N.; LIESACK. W.; STOTT M. B.; ALAM, M.; THEISEN, A. R.; J. MURRELL, C.; DUNFIELD. P. F. (2010) Complete Genome Sequence of the Aerobic Facultative Methanotroph Methylocella silvestris BL2. J Bacteriol. Jul 2010; 192(14): 3840–3841.

CHIOU, P. W. S. (2001) Value of *Aspergillus niger* fermentation product as a dietary ingredient for broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v.91, n.3-4, p.171-182.

COPENOR- Companhia Petroquímica do Nordeste Camaçari - Bahia - Brasil (**2011**) Relatório da Administração de 2011. Disponível em: http://www.copenor.com.br Acesso em Nov 2012

CORREIO DA MANHÃ (**1966**). Gás Natural produz proteínas. Jornal Coluna Agrícola. Rio de Janeiro, 16 Outubro de 1966, Página 7.

COSTA, R.G. (1988). O gás natural no brasil. Boletim técnico PETROBRÁS, Rio de Janeiro, v. 31(4): 253-257, out./dez.88.

DABBAH, R. (1970) Protein from microorganisms. Food Technology, Chicago, v.24, n.6, p.569-666.

DATTA, R. & OGELTREE, J. (1983), Methanol bioconversion by *Butyribacterium methylotrophicum* batch fermentation yield and kinetics. Biotechnol. Bioeng., 25: 991–998.

DE MARCO, Paolo (2004) Methylotrophy versus heterotrophy: a misconception. Microbiology June, 150:1606-1607

DEMAIN, A. L. (2000) Small bugs, big business: the economic power of the microbe. Biotechnology Advances, v.18, n.6, p.499-514.

DONOVAN, P.K. (1971) Autotrophy: concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism. Annu. Rev. Microbiology. 25:177-210

EL NAWAWY, A. S.; GNAN, S. O. (1983), Isolation and propagation of new methanol-utilizing microorganisms. Biotechnol. Bioeng., 25: 863–865. doi: 10.1002/bit.260250319

ELSAIED, H.E.; KANEKO, R.; NAGANUMA T. (2006) Molecular characterization of a deep-sea methanotrophic mussel symbiont that carries a RuBisCO gene. Mar Biotechnology (NY) Set-Out; 8 (5):511-20.

ERICSSON, M., EBBINGHAUS, L. and LINDBLOM, M. (1981), Single-cell protein from methanol: Economic aspects of the Norprotein® process. J. Chem. Technol. Biotechnol., 31: 33–43.

FURIGO, A. (1995) Estudos do processo de obtenção de proteínas celulares a partir de gás natural. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Coordenação dos Programas de Pós-Graduação de Engenharia, Programa de Engenharia Química, 1995.

GOOL, A. V.; LAUDELOUT, H. (1966) Biochim. Biophys. Acta 127:295-301. Apud DONOVAN, P.K. (1971) Autotrophy: concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism. Annu. Rev. Microbiology. 25:177-210

GREEN, P. N. (2006) Methylobacterium. Prokaryotes CHAPTER 3.1.13. 5:257–265

GREEN, P. N.; BOUSFIELD, I. J.; (1981) The taxonomy of pink pigmented facultatively methylotrophic bacteria. In: H. Dalton (Ed.) Microbial Growth on C1-compounds. Heyden and Son. London, 285–293.

GREEN, P. N.; BOUSFIELD, I. J.; (1983) Emendation of *Methylobacterium* patt, Cole and Hanson 1976, Methylobacterium rhodinum (Heumann 1962) comb. nov. corrig.; *Methylobacterium radiotolerans* (Ito and Iizuka 1971), comb. nov. corrig., and *Methylobacterium mesophilicum* (Austin and Goodfellow 1979) comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 33:875–877.

GPC QUÍMICA- Grupo Peixoto de Castro. Unidade Metanol. Disponível em: http://www.gpcquimica.com.br/portal/metanol.html Acesso em Jan. 2014

HACKING; Andrew J. (1986) Economic Aspects of Biotechnology. Cambridge Studies in Biotechnology. Cambridge University Press.

HANSON, R. S. & HANSON, T. E. (1996) Metanotrophic Bacteria. Microbiology Rev., v60, n2, p.439-471.

HARRISON, D. E.F. (1973) Studies on the Affinity of Methanol- and Methane-utilizing Bacteria for their Carbon Substrates. Journal of Applied Microbiology. Volume 36, Issue 2, pages 301–308, June 1973

HOU, C. T. (1984). Methylotrophs: Microbiology, Biochemistry and Genetics. CRC Press Florida. Apud: GREEN, P. N. (2006) *Methylobacterium*. Prokaryotes CHAPTER 3.1.13. 5:257–265.

ITO, H.; IIZUKA H. (1971) Part XIII: Taxonomic studies on a radio-resistant Pseudomonas. Agric. Biol. Chem. 35:1566–1571. Apud: GREEN, P. N. (2006) Methylobacterium. Prokaryotes CHAPTER 3.1.13. 5:257–265

IVANOVA, S.; FEDOROV, D. N.; DORONINA, N.V., TROTSENKO A. Y. (**2006**) Production of Vitamin B12 in Aerobic Methylotrophic Bacteria. Text;75(4):570-572.

JAFARI P, ZAMANI M, ALMASIAN F, *et al.* (2008) Feed Stuff Production from Methanol by Methylotrophic Microorganisms. Scientia; 15(4):480-486.

JIANG, H.; CHEN, Y.; ZHANG, C.; SMITH, T.J.; MURRELL, J.C; XING, X-H. (2010) Methanotrophs: multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering. Biochemical Engineering Journal, 49, 277-288.

LIDSTROM, M. E. (2006). Aerobic Methylotrophic Prokaryotes. 2006:618-634.

LITCHFIELD, J. H. (1983) Single cell proteins. Science, v.219, p.740-746.

MADIGAN, M. T. (2004) Microbiologia de Brock. São Paulo: Prentice Hall.

METHANOTROPH COMMONS (**2014**). Disponível em: http://methanotroph.org/ Acesso em Fevereiro 2014.

METHANEX (2014). Ficha de dados de segurança. Disponível em: http://www.methanex.com/products/documents/MSDS_EUportugues.pdf Acesso em Julho de 2014.

MONTGOMERY, D.C. (2001) Design and analysis of experiments. Jhon Wiley & Sons, INC. 5th edtion. 684 p. 2001.

NASSERI, A.T.; RASOUL-AMINI, S.; MOROWVAT, M.H.; GHASEMI, Y. (2011). Single Cell Protein: Production and Process. American Journal of Food Technology, 6: 103-116.

NETBIOCHEM (2014) Purine and Pyrimidine Metabolism. Diponível em: http://library.med.utah.edu/NetBiochem Acesso em: Fevereiro 2014

O'CONNOR, M. L.; HANSON, R. S. (1977) Enzyme Regulation in *Methylobacterium* organophilum. Journal of General Microbiology, SOI, 327-332.

OPARIN, A. I. (1957) The Origin of life on the earth. Chap. 6. Edinburgh, London: Oliver & Boyd *Apud* DONOVAN, P.K. (1971) Autotrophy: concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism. Annu. Rev. Microbiology. 25:177-210

PARAJÓ, J. C.; SANTOS, V.; DOMÍNGUEZ, H.; VÁZQUEZ, M. (1995) Protein concentrates from yeast cultured in wood hydrolysates. Food Chemistry, v.53, p.157-163

PATT, T. E., COLE, G. E.; BLAND, J.; HANSON, R. S. (1974) Isolation and characterization of bacteria that grow on methane and organic compounds as sole sources of carbon and energy. Journal Bacteriol. 120:955–964.

PATT, T. E., COLE, G. C.; HANSON, R. S.. (1976). Methylobacterium: a New Genus of Facultatively Methylotrophic Bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology. Apyr. 1976, Vol. 26, No. 2, p. 226-229.

PECK, H. D. (1967) Lectures Theoret. Appl. Aspects Mod. Microbial. (Univ. Maryland) 1-22 apud DONOVAN, P.K. (1971) Autotrophy: concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism. Annu. Rev. Microbiology. 25:177-210

PECK, H. D. (1968) Ann. Rev. Microbial.22:489-518 apud DONOVAN, P.K. (1971) Autotrophy: concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism. Annu. Rev. Microbiology. 25:177-210

PEREIRA JR., (2012) Produção de proteínas para alimentação animal a partir de gás natural – PPGN. 70 p.

PROKOP A.; RATCLIFFE H. D.; FATAYER M.; AL-AWADHI N.; KHARNIS A.; M. MURAD; BOND C.; HARNDAN Y. (1984) Bacterial SCP from Methanol in Kuwait:Product Recovery and Composition. Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXVI, **Pp.** 1085-1089

QUAYLE, J. R;. FERENCI, T. (1978) Evolutionary aspects of autotrophy. Microbiol. Rev. 42:251–273.

QUAYLE, J. R. (1980) The microbial assimilation of C1 compounds. Biochem. Soc. Trans. 8:1–10.

METHANEX (2014). Disponível em: http://www.methanex.com/ Acesso em Jan. 2014

METHANOL INSTITUTE (**2014**) Disponível em: http://www.methanol.org Acesso em Fev. 2014

PINTO, Julia di Domenico (2013) Análise quantitativa de riscos em uma planta de metanol. Rio de Janeiro: UFRJ, 2013.

QUEIROZ, Mozart Schmitt; SANTIAGO, Edite Rodrigues; MOTA, Nilda Maria Brites Leal; RODRIGUES, Elizabete Gaspar Calazans; SILVA, Gabriel Henrique (1988) Produção de proteína a partir de gás natural (parte 1) Boletim técnico PETROBRÁS, Rio de Janeiro, v. 31(4): 291 -302, out./dez.88

QUEIROZ, Mozart Schmitt; SANTIAGO, Edite Rodrigues; MOTA, Nilda Maria Brites Leal; RODRIGUES, Elizabete Gaspar Calazans (1988) Produção de proteína a partir de gás natural (parte 2): Seleção do reator. Boletim técnico PETROBRÁS, Rio de Janeiro, v. 31(4): 283 -290, out./dez.88

REVISTA DE QUÍMICA INDUSTRIAL (1969). Ano XXXVIII. Num. 448. Agosto.

RIBBONS, D. W.; HARRISON, J. E.; WADZINSKI, A. M. (1970) Ann. Rev. Microbial. 24: 1 35-58

ChemiWiki. RuBisCo. Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. Disponível em:

http://chemwiki.ucdavis.edu/Wikitexts/UC_Davis/UCD_Chem_124A%3A_Berben/Ribulose_1%

2C5-bisphosphate_carboxylase_(rubisco)/RuBisCo_Acesso em Fevereiro 2014.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A. F. (2005). Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos. Campinas – SP, Casa do Pão Editora.

Sociedad Española de Microbiología (1987). Volume 3 Editora La Sociedad, Universidade da Califórnia

SORJ, B.; CORADINI, O.; GOODMAN, D.; POMPERMAYER, M.; WILKINSON, J. O Impacto sócio econômico das Biotecnologias: Uma perspectiva internacional. (1984). Cad. Dif. Tecnol., Brasília, 1 (2): 219-244, Maio/Agosto

SMITH, John E. (2009) Biotechnology. Cambridge University Press. 5° edição. 66 páginas

SMITH, A. J., HOARE, D. S., (1968) I.Bacteriol. 95:844-55 Apud DONOVAN, P.K. (1971) Autotrophy: concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism. Annu. Rev. Microbiology. 25:177-210

STEINKRAUS, K. H. (1997) Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. Food Control. Fermented Food Safety. Volume 8, Issues 5–6, October–December 1997, Pages 311–317

STEPNOWSKI, Piotr; BLOTEVOGE, Karl-Heinz; JASTOFF, Bernd (2004) Extraction of carotenoid produced during methanol waste biodegradation. International Biodeterioration & Biodegradation 53: 127 – 132

STIRLING, D. I.; DALTON, H. (1985) Aerobic metabolism of methane and methanol. *Apud:* BULL, A. T.; DALTON, H. (Eds.) Biotechnology, Vol. 1. The Principles of Biotechnology: Scientific Fundamentals. Pergamon. Oxford, 379–408.

TAYLOR, B. F., HOARE, D. S. (1969) J.Bacteriol 100:487-97 Apud DONOVAN, P.K. (1971) Autotrophy: concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism. Annu. Rev. Microbiology. 25:177-210

TAYLOR, S., DALTON, H.; DOW, C. (1980) Purification and initial characterization of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). FEMS Microbiology Letters, 8: 157–160.

TROTSENKO, A; DORONINA N.V.; KHMELENINA, VN. (2005). Biotechnological Potential of Aerobic Methylotrophic Bacteria: A Review of Current State and Future Prospects. Text. 2005;41(5):495-503.

VAN NIEL, C. B. (1949) Photosynthesis in Plants, ed. J. Franck, W. E. Loomis, p. 437. Ames: Iowa State College Press *apud* DONOVAN, P.K. (1971) Autotrophy: concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism. Annu. Rev. Microbiology. 25:177-210

VILLAS BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E. (2000) Bioconversão do bagaço de maçã: enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, v.14, p.38-42.

WHITTENBURY, R. (1969) J. Gen. Microbiol.55: XXIV.

WHITTENBURY, R, PHILLIPS, K.C, WILKINSON, JF (1970). Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. J Gen Microbiol. 1970 May;61(2):205-18.

SENIOR, P. J.; WINDASS, J. (1980) The ICI single cell protein process. Biotechnology Letters. May, Volume 2, Issue 5, pp 205-210.

YURIMOTO, H.; KATO, N.; SAKAI, Y. (2005) Assimilation, Dissimilation, and Detoxification of Formaldehyde, a Central Metabolic Intermediate of Methylotrophic Metabolism. The Japan Chemical Journal Forum and Wiley Periodicals. The Chemical Record, Vol. 5, 367–375. Publicado online em Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)

ZÚÑIGA, C.; MORALES, M.; LE BORGNE, S.; REVAH, S. (2011) Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) by *Methylobacterium organophilum* isolated from a methanotrophic consortium in a two-phase partition bioreactor. Journal of Hazardous Materials 190: 876–882

ZÚÑIGA, C.; MORALES, M.; S.; REVAH, S. (2013) Polyhydroxyalkanoates accumulation by Methylobacterium organophilum CZ-2 during methane degradation using citrate or propionate as cosubstrates. Bioresource Technology 129: 686–689