UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Escola de Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos

PRODUÇÃO DE PROTEÍNA DE UNICELULAR A PARTIR DE METANO EM SISTEMA DE BIORREATORES EM SÉRIE RECHEADOS COM ANÉIS DE PALL

RODRIGO PIMENTEL FERNANDES

Orientadores: **Nei Pereira Jr., *Ph.D.* (EQ/UFRJ) e**
Ricardo Pires Peçanha, *Ph.D.* (EQ/UFRJ)

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Escola de Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de
Processos Químicos e Bioquímicos

RODRIGO PIMENTEL FERNANDES

PRODUÇÃO DE PROTEÍNA DE UNICELULAR A PARTIR DE METANO EM SISTEMA DE BIORREATORES EM SÉRIE RECHEADOS COM ANÉIS DE *PALL*

Documento submetido ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do grau de doutor em ciências (*D.Sc.*).

Orientadores: Nei Pereira Jr., *Ph.D.* (EQ/UFRJ) e
Ricardo Pires Peçanha, *Ph.D.* (EQ/UFRJ)

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
2018

F363p

Fernandes, Rodrigo Pimentel
Produção de Proteína de Unicelular a Partir de Metano em Sistema de Biorreatores em Série Recheados com Anéis de Pall / Rodrigo Pimentel Fernandes. -- Rio de Janeiro, 2018.
168 f.

Orientador: Nei Pereira Jr..
Coorientador: Ricardo Pires Peçanha.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2018.

1. Metano. 2. Bactérias Metanotróficas. 3. Proteína de Unicelular. 4. Colunas de Bolhas. 5. Anéis de Pall. I. Pereira Jr., Nei, orient. II. Peçanha, Ricardo Pires , coorient. III. Título.

RODRIGO PIMENTEL FERNANDES

PRODUÇÃO DE PROTEÍNA DE UNICELULAR A PARTIR DE METANO EM SISTEMA DE BIORREATORES EM SÉRIE RECHEADOS COM ANÉIS DE *PALL*

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Doutor em Ciências (*D.Sc.*).

Aprovada em 15 de Outubro de 2018, por

Nei Pereira Jr, *PhD*

Ricardo Pires Peçanha, *PhD*

Eduardo Falabella Souza Aguiar, *DSc*

Maulori Curié Cabral, *DSc*

Ninoska Isabel Bojorge Ramirez, *DSc*

Eliana Mossé Alhadeff, *DSc*

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

2018

Dedico esta tese aos meus pais, Paulo e Rosangela,
sem os quais eu não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais e à minha irmã, que sempre de forma muito presente, se dedicaram e me incentivaram a seguir firme na minha caminhada em todos os momentos de dificuldade, sem medir esforços para me ver crescer e evoluir pessoal e profissionalmente. Sem vocês nada disso teria sido possível!

À minha parceira de trabalho e de vida, Manuela, que me ajudou a seguir em frente, sempre com uma palavra de carinho e de motivação, mesmo nos momentos onde eu mesmo não acreditava que tudo iria dar certo.

À minha família (e “My Family”), que sempre me incentivou mesmo quando não entendia o que eu tanto fazia no laboratório! Incluo aqui os “tios e tias” que, mesmo não sendo família de sangue, sempre me apoiaram e estiveram prontos para me ajudar no que fosse preciso.

Ao Professor Nei Pereira Jr., que, sempre com o objetivo de tornar seus estudantes melhores pesquisadores, esteve presente em todos os momentos, compartilhando experiências, oferecendo conselhos e dando ideias que, com certeza, enriqueceram e aprimoraram não só esta tese e o meu conhecimento em engenharia bioquímica, mas também o profissional que eu almejo ser.

Ao Professor Ricardo Peçanha, por estar sempre pronto para ajudar, discutir e contribuir de forma significativa para o desenvolvimento do projeto.

Aos meus amigos do Cruzeiro do Sul, da EPCAR, do Fundão e de tantos outros lugares por onde passei e conheci ótimas pessoas, o meu muito obrigado por todos os momentos de descontração, pelos conselhos, pelas experiências que vivemos nesses anos e por me fazerem uma pessoa mais feliz! Tenho certeza que nessa longa caminhada, por mais que em alguns momentos uns tenham se aproximado mais ou se afastado, todos vocês fizeram parte da minha conquista. Em especial ao meu irmão Robertinho, que sempre esteve presente como parte da família!

Aos amigos do Ladebio, que compartilharam os momentos de felicidade, de frustração e de ansiedade pelos resultados, que são inerentes ao trabalho de pesquisa. Meu muito obrigado por todo o incentivo e por fazerem desses anos de convivência os melhores possíveis! Agradeço ainda diretamente aos estudantes e profissionais do Ladebio que trabalharam diretamente comigo no PPGN: Ana

Pantoja, Carina, Luiz André, Juliana, Douglas, Diogo, Lys, Letícia, Isabela, Pedro, Fernando, Manuela, Camila e Isabella. Obrigado pela paciência, por toda a ajuda e espero também ter contribuído de alguma maneira na formação de vocês!

Ao Luizão, ao Jorge e à Janaína, que sempre estiveram presentes no Ladebio e fizeram parte desses anos de formação, ajudando na parte administrativa dos projetos e sendo fundamentais para o bom andamento das atividades no laboratório. Obrigado pelas muitas conversas e por todo o apoio.

A todos do Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese (LEAF), em especial a Professora Anita, que tiveram muita paciência em me ajudar a realizar as análises composicionais. Espero um dia poder retribuir todo o carinho com que fui recebido por vocês!

Aos professores do EPQB, por todo o conhecimento transmitido durante as disciplinas, palestras, conversas informais e diversas outras oportunidades onde pude absorver um pouco mais do que são as engenharias química e bioquímica.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

“Everything should be made as simple as possible, but not simpler.”

Albert Einstein

RESUMO

FERNANDES, Rodrigo P. **Produção de Proteína de Unicelular a Partir de Metano em Sistema de Biorreatores em Série Recheados com Anéis de *Pall.*** Tese de doutorado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - Brasil, 2018.

Orientadores: Nei Pereira Jr. e Ricardo Pires Peçanha

Bactérias metanotróficas são capazes de utilizar metano como fonte de carbono e energia. A capacidade de consumir um gás, agente do efeito estufa, aliada aos esforços mundiais para se encontrar novas fontes de proteína, fazem com que elas sejam promissores agentes para geração de suplementos alimentícios tanto para animais quanto para humanos. Diversas vantagens podem ser observadas na utilização dessa fonte, como a velocidade da síntese proteica nos unicelulares, altos conteúdos em proteína, a facilidade de se modificar geneticamente o microrganismo e a independência de fatores sazonais. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um processo de produção de proteínas a partir de metano, utilizando *Methylocystis hirsuta*, explorando os aspectos relacionados ao cultivo do microrganismo e à engenharia do bioprocesso. Inicialmente, foram realizados ensaios em frascos agitados com atmosfera controlada de metano e ar em meio mineral. Após modificações no meio mineral indicado para o cultivo de *M. hirsuta,* utilizando diferentes concentrações dos componentes iniciais, foram adicionados suplementos no meio, na expectativa de fornecer cofatores e outras moléculas que pudessem acelerar o crescimento da bactéria. O uso de extrato de levedura e casaminoácidos em conjunto com óleo de soja, um surfactante, resultou em um aumento de 0,3 para 1,0 g/L de biomassa seca nos frascos. Levando em consideração a necessidade de melhorar a transferência de massa da mistura gasosa para a fase líquida, foram realizados ensaios de K_La em diferentes configurações de biorreator. Foi desenvolvido no próprio laboratório um sistema reacional de colunas de bolhas em série (RCB) preenchidas com anéis do tipo Pall com o objetivo de aumentar a capacidade de transferência de massa, reaproveitando a corrente gasosa fornecida e reduzindo as perdas de metano. Os ensaios de K_La mostraram o RCB como um modelo promissor, com valores superiores aos de reatores convencionais. Ensaios no sistema RCB apresentaram concentrações celulares de até 4,5 g/L, devido à sua maior capacidade de transferência e à manutenção dos parâmetros ótimos de operação para o dado microrganismo. As concentrações celulares obtidas, além dos altos valores de K_La, tornam o sistema RCB uma nova e promissora opção de reator para bioprocessos aeróbios ou que demandem altas vazões de mistura gasosa. Novas configurações, com mais colunas em série, uso de diferentes tipos de recheio e reciclo da fase gasosa podem ser testadas, aumentando ainda mais a eficiência e a economia deste sistema inovador para o cultivo de metanotróficos.

ABSTRACT

FERNANDES, Rodrigo P. **Produção de Proteína de Unicelular a Partir de Metano em Sistema de Biorreatores em Série Recheados com Anéis de *Pall.*** Tese de doutorado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - Brasil, 2018.

Advisors: Nei Pereira Jr. and Ricardo Pires Peçanha

Methanotrophic bacteria are microorganisms capable of using methane as source of carbon and energy. The ability to consume a greenhouse gas, coupled with the world recent efforts to find new sources of protein, make them promising fermentative agents for the generation of food supplements for both animals and humans. Several advantages can be observed in the use of this source: reduced protein synthesis time in unicellulars compared to superior organisms, high contents of protein, facility to genetically modify the microorganism and independence of seasonal factors. The present work aimed to develop a process of production of proteins from methane utilizing *Mehtylocystis hirsuta,* exploring the aspects related to microorganism culture growth and the engineering of the bioprocess. Initially, experiments were carried out in shaken flasks with controlled atmosphere of methane and air and mineral medium. After modifications in the mineral medium indicated for the cultivation of *M. hirsuta*, using different concentrations of the initial components, supplements were added, in order to provide cofactors and other molecules that could accelerate the growth of bacteria and stimulate protein production. The use of yeast extract and casamino acids together with soybean oil, a surfactant, resulted in an increase of 0.3 to 1.0 g/L of dry biomass in flasks. Taking into consideration the need to improve the mass transfer of the gas mixture to the liquid phase, K_La assays were performed in different bioreactor configurations. A system of three bubble columns reactors in series (BCR) filled with Pall rings was developed in the laboratory with the objective of increasing the mass transfer capacity, reusing the supplied gas stream and reducing wastes of methane. The K_La assays showed the BCR as a promising model, with transfer coefficient values higher than those of conventional reactors. Bioreactor tests, due to the higher mass transfer coefficient and the maintenance of optimum operating parameters for the given microorganism, presented cellular concentrations up to 4.5 g/L. Cell concentrations obtained, in addition to the high K_La values, make the BCR system a new and promising reactor option for aerobic or those requiring high gas flow rates bioprocesses. New configurations for the BCR, with more columns in series, use of different types of filling and gas phase recycle can be tested, further increasing the efficiency and the economy of this innovative system for the cultivation of methanotrophs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Histórico de produção de gás natural no Brasil entre os anos de 2017 e 2018. 25

Figura 2.2: Variação da concentração de metano na atmosfera. 27

Figura 2.3: Vias metabólicas para a utilização do metano por bactérias metanotróficas. 29

Figura 2.4: Esquema da via da ribulose monofosfato (RuMP), via de assimilação de carbono utilizada por bactérias metanotróficas do tipo I. 30

Figura 2.5: Esquema da via da serina, via de assimilação de carbono utilizada por bactérias metanotróficas do tipo II. 31

Figura 2.6: Oxidação do metano pela enzima MMO, e o cometabolismo do tricloroetileno (TCE) por bactérias metanotróficas. 34

Figura 2.7: Esquema básico de produção de proteína de unicelular 40

Figura 2.8: Distribuição cronológica dos depósitos de patentes relacionados ao uso de metanotróficos, proveniente do banco de dados do WIPO. 44

Figura 2.9: Distribuição mundial dos documentos de patente por classe do titular. Dados analisados até 2018. 44

Figura 2.10: Distribuição mundial dos documentos de patente em função da temática principal. Dados analisados até 2018. 45

Figura 2.11: Distribuição mundial dos documentos de patentes relacionados a tecnologias para a produção de produtos químicos e biotecnológicos em processos conduzidos por metanotróficos. Dados analisados até 2018. 46

Figura 2.12: Resistências encontradas no transporte do oxigênio e de outros gases entre as fases líquida e gasosa durante o processo fermentativo. 48

Figura 2.13: Tipos de reator airlift. (a) Circulação interna por placa; (b) Circulação interna por tubo concêntrico; (c) Circulação externa. 49

Figura 2.14: Etapas da transferência de gás da fase gasosa para a fase líquida. P_g e P_i representam a pressão na fase gasosa e na interface, enquanto que C_L e C_i representam as concentrações na fase líquida e na interface, respectivamente. 50

Figura 4.1: Curva padrão de *Methylocystis hirsuta* para correlação entre absorvância e concentração celular. 62

Figura 4.2: Ilustração do comportamento da concentração de OD durante o método da desgaseificação. 70

Figura 4.3: Reator *airlift* utilizado nos ensaios de K_La. 72

Figura 4.4: Recheios randômicos utilizados no reator *airlift*. (A) Sela Intalox 1”; (B) Anéis de Pall 1”. 72

Figura 4.5: Borbulhadores utilizados nos ensaios de K_La no reator *airlift*. (A) 6 furos de 1 mm; (B) 48 furos de 0,386 mm; (C) sinterizado. 73
Figura 4.6: Impelidor de seis pás utilizado na agitação do meio no biorreator BioFlo & Celigen 310. 74
Figura 4.7: Foto do sistema montado para o cálculo do valor de K_La nas colunas em série, com e sem o preenchimento com recheio. 75
Figura 4.8: Anéis de Pall utilizados nos ensaios com o reator tipo coluna de bolhas em série. Diferente das utilizadas nos ensaios em reator airlift, cada peça possui aproximadamente 1,5 cm de diâmetro e altura. 75
Figura 4.9: Biorreator BioFlo® da NewBrunswick utilizado nos experimentos com agitação mecânica. 78
Figura 4.10: Esquematização do ensaio de crescimento celular em biorreator agitado mecanicamente com alimentação por pulsos e reciclo da corrente gasosa. 79
Figura 4.11: Esquema ilustrativo do funcionamento dos reatores tipo coluna de bolhas em série (RCB). As linhas contínuas e pontilhadas representam, respectivamente, as correntes das fases líquida e gasosa. 81
Figura 4.12: Foto do sistema de três colunas em série utilizado nos experimentos. 81
Figura 5.1: Cinética de crescimento de *M. hirsuta.* Ensaios iniciais com diferentes fontes de nitrogênio, suplementos e surfactante Tween 80 (T80). Proporção de metano e ar de 50%. 91
Figura 5.2: Avalição de diferentes fontes de carbono sobre o crescimento de *M. hirsuta*. Experimento sem alimentação com metano. 95
Figura 5.3: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* com variações na concenração de extrato de levedura (EL) no meio NSM1306. Proporção de 30% metano e 70% de ar. 96
Figura 5.4: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* com variações na concentração de peptona (PEP) no meio NMS1306. Proporção de 30% metano e 70% de ar. 96
Figura 5.5: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* com variações na concentração de casaminácidos (CAS) no meio NMS1306. Proporção de 30% metano e 70% de ar. 97
Figura 5.6: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* com variações na concentração da mistura extrato de levedura + peptona (EP) no meio NMS1306. Proporção de 30% metano e 70% de ar. 98
Figura 5.7: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* em meio com diferentes concentrações de extrato de levedura + casaminoácidos (EC). Proporção de 30% de metano e 70% de ar. 99
Figura 5.8: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* com adição de PFC e extrato de levedura + casamino (EC) ao meio de cultivo. Proporção de 30% de metano e 70% de ar. 101
Figura 5.9: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* com acréscimo de 102

óleo vegetal e extrato de levedura + casamino (EC) ao meio de cultivo. Proporção de 30% de metano e 70% de ar.
Figura 5.10: Tabela ANOVA do planejamento experimental DCCR com *M. hirsuta* em meio NMS 1306 e adição de suplementos e óleo de soja. 105
Figura 5.11: Diagrama de Pareto com análise da significância estatística do planejamento experimental DCCR com *M. hirsuta* em meio NMS 1306 e adição de suplementos e óleo de soja. 105
Figura 5.12: Superfícies de resposta do planejamento experimental DCCR com *M. hirsuta* em meio NMS 1306 e adição de suplementos e óleo de soja. 106
Figura 5.13: Comparação dos valores de K_La obtidos para diferentes vazões em biorreator *airlift* com água deionizada com diferentes tipos de borbulhador, a 30°C e sem recheios randômicos. 112
Figura 5.14: Comparação dos valores de K_La obtidos para diferentes vazões em biorreator *airlift* com água deionizada em diferentes temperaturas, borbulhador sinterizado e sem recheios randômicos. 112
Figura 5.15: Comparação dos valores de K_La obtidos para diferentes vazões em biorreator *airlift* com água deionizada com diferentes tipos de recheio randômico, a 30°C e borbulhador sinterizado. 113
Figura 5.16: Comparação dos valores de K_La obtidos para diferentes vazões em biorreator *airlift* e STR com diferentes fases líquidas a 30°C. 115
Figura 5.17: Comparação dos valores de K_La obtidos para diferentes vazões no sistema RCB com e sem uso de recheios tipo anel Pall a 30°C. 116
Figura 5.18: Comparação dos valores de K_La obtidos para diferentes vazões em dois tipos de biorreator de agitação pneumática: *airlift* e RCB (T= 30°C). 117
Figura 5.19: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* em biorreator agitado mecanicamente em meio NMS1306 com adição de 0,5 g/L de EL e peptona (cada). Proporção de metano e ar de 50%. 119
Figura 5.20: Micrografia observada durante o cultivo de *M. hirsuta* em STR, no momento do crescimento mais acelerado, mostrando a contaminação por bacilos gram positivos. 120
Figura 5.21: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* em biorreator agitado mecanicamente em meio NMS1306 com adições de meio para concentração final de 2 g/L de EL + C (cada). Proporção de 30% de metano e 70% de ar. 121
Figura 5.22: Micrografia do cultivo de *M. hirsuta* em STR contendo apenas bactérias gram negativas de mesmo formato, evidenciando a pureza do cultivo. 122
Figura 5.23: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* em biorreator tipo STR com alimentação intermitente em meio NMS1306 suplementado. Proporção de 30% de metano e 70% de ar. 124

Figura 5.24: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* em sistema de coluna de bolhas (RCB) preenchida com anéis de Pall com meio NMS1306 com adição de 0,5 g/L de EL e peptona (cada) e glicose. Proporção de 30% de metano e 70% de ar. 127
Figura 5.25: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* em sistema RCB preenchido com anéis de Pall com meio NMS1306 modificado e adição de 2 g/L de EL e casaminoácidos (cada). Proporção de alimentação de 30% de metano e 70% de ar. 128
Figura 5.26: Micrografia obtida durante cultivo de *M. hirsuta* no sistema RCB. 129
Figura 5.27: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* em sistema RCB com diferentes condições de operação. Meio NMS1306 modificado com e sem recheio, NMS 1306 suplementado com e sem metano e NMS 1306 suplementado com adição de óleo de soja (1% v/v). Proporção de alimentação de 30% de metano e 70% de ar. 130
Figura 5.28: Sistema RCB no final do cultivo de *M. hirsuta,* com elevada concentração celular e nítida turbidez do meio. 132
Figura 5.29: Micrografia obtida no final do cultivo de *M. hirsuta* no sistema RCB com a presença de óleo de soja. 132
Figura 5.30: Evolução das concentrações celulares durante o desenvolvimento da tese. 133

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Composição do gás natural bruto de diferentes locais de produção pelo mundo em condições normai de temperatura e pressão (CNTP). 24

Tabela 2.2: Características dos principais gêneros de bactérias metanotróficas do tipo I. O símbolo “+” indica a presença da característica, enzima ou capacidade no gênero, enquanto o símbolo “–“ representa a sua ausência. 30

Tabela 2.3: Características dos gêneros padrão de bactérias metanotróficas do tipo II. O símbolo “+” indica a presença da característica, enzima ou capacidade no gênero, enquanto o símbolo “–“ representa a sua ausência. 31

Tabela 2.4: Linhagens de metanotróficas e suas vias de assimilação de carbono, relacionadas à produção de PHB. 35

Tabela 2.5: Composição da massa seca de um cultivo de *Methylococcus capsulatus* para produção de PTU. 37

Tabela 2.6: Composição média das PTUs (% em massa seca). 38

Tabela 2.7: Diferentes matérias-primas utilizadas na produção de PTU. 42

Tabela 4.1: Composição do meio mineral 1306 (ATCC). 58

Tabela 4.2: Planejamento experimental para modificação do meio NMS1306 visando a obtenção de densidades celulares mais elevadas. 64

Tabela 4.3: Meio de cultivo NMS1306 modificado e com adição de suplementos utilizado no experimento. 65

Tabela 4.4: Concentrações de cada suplemento para os diferentes ensaios. 67

Tabela 4.5: Concentrações dos aditivos no meio NMS1306 modificado para os ensaios com PFC e óleo vegetal. 68

Tabela 4.6: Planejamento experimental DCCR utilizando extrato de levedura (EL), casaminoácidos (CAS) e óleo de soja. 69

Tabela 4.7: Parâmetros avaliados nos experimentos para medição do K_La com água deionizada. 73

Tabela 5.1: Valores de crescimento de *M. hirsuta* com variações na composição do meio de cultivo. Proporção de metano e ar de 50%. 89

Tabela 5.2: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* para diferentes proporções de metano e ar. 93

Tabela 5.3: Concentração celular final obtida no planejamento experimental DCCR com *M. hirsuta* em NMS 1306 modificado variando as concentrações de extrato de levedura (EL), casaminoácidos (CAS) e óleo de soja (Óleo). 103

Tabela 5.4: Coeficiente de absorção de oxigênio (K_La) para diferentes borbulhadores e T=30°C em reator *airlift*. 109

Tabela 5.5: Coeficiente volumétrico de absorção de oxigênio (K_La) para diferentes temperaturas e borbulhador sinterizado em reator *airlift*. 110
Tabela 5.6: Coeficiente volumétrico de absorção de oxigênio (K_La) para os diferentes tipos de recheio randômico em reator *airlift*. 111
Tabela 5.7: Coeficiente volumétrico de absorção de oxigênio (K_La) para diferentes configurações de reator e fases líquidas. 113
Tabela 5.8: Coeficiente volumétrico de absorção de metano ($(K_La)_{CH4}$) para as três diferentes configurações de reator. 118
Tabela 5.9: Composição nutricional das biomassas secas obtidas com *M. hirsuta* em três diferentes meios de cultivo. 134

SUMÁRIO

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO 20

Capítulo 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 23

2.1. O gás natural 23

2.1.1. Metano 26

2.2. Bactérias metanotróficas 28

2.2.1. Filogenia e taxonomia 29

2.3. Aplicações das bactérias metanotróficas 33

2.3.1. Biorremediação 33

2.3.2. Produção de Biopolímeros 34

2.3.3. Fixação de Nitrogênio 35

2.3.4. Produção de Proteínas 36

2.4. Proteínas de unicelulares 37

2.4.1. Aspectos tecnológicos 41

2.4.2. Prospecção tecnológica 43

2.5. Fermentação de substratos gasosos 47

2.5.1. Tipos de reatores mais utilizados 48

2.6. Coeficiente volumétrico de transferência de massa - K_La 50

2.6.1. Métodos de determinação do K_La 52

2.6.2. Estimativa de K_La para o metano ($K_La_{(CH4)}$) 53

2.7. Considerações gerais 54

Capítulo 3 - OBJETIVOS 56

3.1. Objetivo geral 56

3.2. Objetivos específicos 56

Capítulo 4 - MATERIAIS E MÉTODOS 57

4.1. Preparo dos meios de cultivo 57

4.2. Ativação da bactéria metanotrófica *Methylocystis hirsuta* 58

4.3. Determinação do peso seco 61

4.4. Cultivo e experimentos em frascos com atmosfera controlada 62

4.4.1. Otimização das concentrações dos componentes do meio 63

4.4.2. Ensaios preliminares com suplementação do meio e outras fontes de nitrogênio 65
4.4.3. Ensaio com diferentes proporções de alimentação de metano e ar 66
4.4.4. Uso de fontes alternativas de carbono 66
4.4.5. Combinação de suplementos no meio de cultivo 67
4.4.6. Uso de perfluorocarbono e óleo vegetal 68
4.4.7. Planejamento Experimental com variação da concentração de suplementos e óleo vegetal 69
4.5. Determinação do K_La 69
4.5.1. Ensaios de K_La em reatores do tipo *airlift* e agitado mecanicamente 71
4.5.2. Ensaios de K_La em reator tipo coluna de bolhas (RCB) 74
4.5.3. Correlação dos valores do coeficiente de transferência de massa para oxigênio (K_La) e metano ($K_La_{(CH4)}$) 76
4.6. Ensaios em biorreatores 76
4.6.1. Ensaios em biorreatores agitados mecanicamente (STR) 76
4.6.2. Ensaios em biorreatores agitados mecanicamente (STR) com alimentação intermitente 78
4.6.3. Ensaios em biorreatores tipo coluna de bolhas em série (RCB) preenchidas com recheios randômicos 80
4.7. Ensaios para caracterização da biomassa bacteriana 82
4.7.1. Análise de proteínas totais 82
4.7.2. Análise de carboidratos 84
4.7.3. Análise de lipídios 85
4.7.4. Análise de cinzas 86
Capítulo 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO 88
5.1. Ensaios em frascos agitados 88
5.1.1. Otimização das concentrações dos componentes do meio 88

5.1.2. Ensaios preliminares com suplementação do meio e outras fontes de nitrogênio 90

5.1.3. Ensaio com diferentes proporções de alimentação de metano e ar 93

5.1.4. Uso de fontes alternativas de carbono 94

5.1.5. Combinação de suplementos no meio de cultivo 95

5.1.6. Uso de perfluorocarbono e óleo vegetal 100

5.1.7. Planejamento Experimental com variação das proporções de suplementos e óleo vegetal 103

5.1.8. Conclusões parciais relativas aos ensaios em frascos 107

5.2. Determinação do K_La 108

5.2.1. Ensaios de K_La em biorreator airlift 108

5.2.2. Ensaios de K_La em reator tipo coluna de bolhas (RCB) 115

5.2.3. Correlação dos valores do coeficiente de transferência de massa para oxigênio (K_La) e metano ($(K_La)_{CH4}$) 118

5.3. Ensaios em biorreatores 118

5.3.1. Ensaios em biorreatores agitados mecanicamente (STR) 119

5.3.2. Ensaios em biorreatores agitados mecanicamente (STR) com alimentação intermitente 123

5.3.3. Ensaios em biorreatores tipo coluna de bolhas em série (RCB) preenchidas com recheios randômicos 125

5.4. Avanços obtidos no cultivo de *M. hirsuta* 133

5.5. Ensaios para caracterização da biomassa bacteriana 133

Capítulo 6 - CONCLUSÕES 136

Propostas de continuação do trabalho 141

Referências bibliográficas 142

Anexos 152

Capítulo 1

Introdução

O crescimento populacional, aliado ao consequente aumento da demanda por alimentos, é responsável por uma crescente deficiência mundial de proteínas, tornando imprescindível a busca por novas fontes destes compostos. Com início na década de 1950, apesar de alguns períodos de estagnação nas pesquisas relacionadas a esse tema, intensivos esforços foram realizados a fim de se explorar o uso de fontes alternativas e não convencionais, como a obtenção de proteína a partir de organismos unicelulares (PTU), ou, em inglês, *Single Cell Protein* (SCP). Essa nomenclatura é utilizada para se referir a células microbianas secas ou ao total de proteínas, purificadas ou não, extraídas de uma cultura, que podem ser empregadas como suplemento alimentício para animais ou humanos (Kuhad *et* al, 1997; Nasseri *et al.*, 2011).

O uso de tais proteínas apresenta diversas vantagens em relação às fontes convencionais, podendo ser destacadas: a velocidade da síntese proteica nos unicelulares em relação à produção em sistemas vivos superiores, como bovinos e suínos; o alto conteúdo em proteínas, lipídeos, carboidratos, ácidos nucléicos, vitaminas e sais minerais, bem como o elevado teor de aminoácidos essenciais, como lisina e metionina; a independência de fatores sazonais; a facilidade de se modificar geneticamente o microrganismo visando a composição ótima de aminoácidos; a capacidade de se utilizar resíduos agrícolas e industriais como matéria prima, entre outros (Adebayo *et al.*, 2011; Nasseri *et al.*, 2011). A escolha do microrganismo para a produção da PTU deve ser baseada em fatores relacionados ao seu metabolismo, ao substrato que será utilizado para a produção e ao uso final

do produto, tendo em vista as características únicas de composição celular de cada espécie (Miller & Litsky, 1976).

A capacidade dos microrganismos de consumir diferentes tipos de substratos permite que uma ampla gama de excedentes/resíduos possam ser utilizados, e, nesse contexto de excedentes, pode-se pensar na indústria de petróleo, lançando mão, por exemplo, do gás natural, rico em metano, para a produção de PTU (Bowman, 2006; Durre & Eikmanns, 2015; Vary & Johnson, 1967).

Em território nacional, o gás natural produzido não é capaz de atender à demanda do setor energético do país, no qual ele é majoritariamente empregado. Relatórios da Petrobras, contudo, indicam que, com a exploração dos poços do pré-sal, o volume de gás produzido irá aumentar nos próximos anos, se tornando o suficiente para suprir a demanda interna e ainda permitir o acúmulo de excedentes (Petrobras, 2018). Estudos apontam que a venda desse excesso de gás natural para o mercado externo não é atrativa, devido ao cenário de preços baixos que se projeta para os próximos anos (Infopetro, 2014), o que gera o interesse em outras formas de aproveitar esse gás, inserindo o mesmo no contexto da produção de PTU.

A utilização do gás natural, com teor superior a 70% de metano em sua composição, como substrato, no contexto dos bioprocessos, apresenta diversos desafios, tais como desenvolver um reator que propicie uma alta eficiência na transferência de massa da fase gasosa (substrato) para a fase líquida, sem gastos excessivos com agitação do meio, bem como escolher a melhor condição de processo, para a qual deve ser levado em conta o microrganismo utilizado e, consequentemente, atentando para a composição da célula, as taxas de crescimento, o meio de cultivo, e a taxa de aeração, além da temperatura e da pressão ideais, de forma a tornar o processo viável economicamente.

Para que seja possível o uso do metano como fonte de carbono para a produção de PTU, é necessário que o microrganismo utilizado seja capaz de consumir esse substrato, fator responsável por restringir as opções. Entre essas estão as bactérias metanotróficas, já utilizadas comercialmente para este fim, em virtude de utilizarem metano como fonte de carbono e apresentarem composição média que as torna adequadas para o uso como alimento, para animais ou humanos, após tratamento.

Uma vez que o metano deve ser a única fonte de carbono presente no meio, ele deve ser alimentado a elevadas taxas no biorreator, de forma que o fornecimento seja em quantidade suficiente para o consumo pela célula. Isso significa que um dos pontos críticos do processo é a transferência de massa do metano, tendo em vista sua baixa solubilidade em água e a necessidade de suprimento de grandes volumes.

O coeficiente global de transferência de massa, $K_L a$, é uma medida da eficiência da transferência do gás para a fase líquida. O conhecimento deste coeficiente é importante no sentido de adequar o suprimento do gás à concentração desejada do mesmo dissolvido no meio a ser disponibilizado às células. Como fatores que influenciam o $K_L a$ podem ser citadas a vazão de alimentação do gás, a temperatura do processo e a presença ou não de internos no reator, tendo esses a função de promover um maior contato entre as fases.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1. O Gás Natural

O gás natural, um combustível fóssil e fonte de energia não renovável, é uma mistura de compostos em estado gasoso nas condições ambientes de temperatura e pressão (Vaz *et al*., 2008). Trata-se de uma mistura inodora e incolor de hidrocarbonetos leves, não tóxica e menos densa que o ar, da qual o metano é o principal componente, presente em teores superiores a 70% em volume. A composição do gás natural bruto é função tanto de uma série de fatores naturais que determinaram o seu processo de formação como das condições de acumulação do seu reservatório de origem, do processo de produção, do condicionamento, do processamento e do transporte. É encontrado em reservatórios subterrâneos em diversas localidades do planeta, seja na terra ou sob o mar, tal qual o petróleo, sendo considerável o número de reservatórios que contêm gás natural associado a esse material. Nestes casos, o gás recebe a designação de gás natural associado (GASA), e quando o reservatório contém pouca ou nenhuma quantidade de petróleo o gás natural é dito não associado (GASN) (Schoell, 1980). De modo a exemplificar a diversidade e a variabilidade da composição do gás natural bruto, bem como a predominância do gás metano, é apresentada a Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Composição do gás natural bruto de diferentes locais de produção pelo mundo em condições normais de temperatura e pressão (CNTP).
Fonte: http://gasnet.com.br/gasnatural/gas_completo.asp#gas11.

Origem	COMPOSIÇÃO EM % VOLUME						ρ	PCS
País/Campo	METANO	ETANO	PROPANO	C4 e >	CO_2	N_2		
USA Panhandle	81,8	5,6	3,4	2,2	0,1	6,9	-	42,7
USA/Ashlaw	75,0	24,0	-	-	-	1,0	-	46,7
Canadá	88,5	4,3	1,8	1,8	0,6	2,6	-	43,4
Rússia	97,8	0,5	0,2	0,1	0,1	1,3	-	39,6
Austrália	76,0	4,0	1,0	1,0	16,0	2,0	-	35,0
França	69,2	3,3	1,0	1,1	9,6	0,8	-	36,8
Alemanha	74,0	0,6	-	-	17,8	7,5	-	29,9
Holanda	81,2	2,9	0,4	0,2	0,9	14,4	0,640	31,4
Irã	66,0	14,0	10,5	7,0	1,5	1,0	0,870	52,3
Mar do Norte	94,7	3,0	0,5	0,4	0,1	1,3	0,590	38,6
Argélia	76,0	8,0	3,3	4,4	1,9	6,4	-	46,2
Venezuela	78,1	9,9	5,5	4,9	0,4	1,2	0,702	47,7
Argentina	95,0	4,0	-	-	-	1,0	0,578	40,7
Bolívia	90,8	6,1	1,2	0,0	0,5	1,5	0,607	38,8
Chile	90,0	6,6	2,1	0,8	-	-	0,640	45,2
Brasil								
RJ	89,4	6,7	2,3	0,5	0,3	0,8	0,623	40,2
BA	88,6	9,2	0,4	-	0,6	1,2	0,615	39,3
AL	76,9	10,1	5,8	1,7	1,2	2,0	-	47,7
RN	83,5	11,0	0,4	-	1,9	3,2	0,644	38,5
ES	84,8	8,9	3,0	0,9	0,3	1,6	0,664	46,4
CE	76,1	8,0	7,0	4,3	1,1	1,5	-	52,4

ρ: densidade (kg/m³)
PCS: poder calorífico superior (MJ/N.m^3)

O gás natural não associado apresenta os maiores teores de metano, enquanto o gás natural associado apresenta proporções mais significativas de etano, propano, butano e hidrocarbonetos mais pesados. Além dos hidrocarbonetos, fazem parte da composição do gás natural bruto: dióxido de carbono (CO_2), nitrogênio (N_2), gás sulfídrico (H_2S), água (H_2O), ácido clorídrico (HCl), metanol (CH_3OH) e inorgânicos. A presença e a proporção destes componentes dependem, fundamentalmente, da localização do reservatório, se ele está em terra ou no mar, de sua condição de associado ou não, do tipo de matéria orgânica ou mistura do qual se originou, da geologia do solo e do tipo de rocha onde se encontra o reservatório.

A produção brasileira de gás natural no mês de Maio de 2018 foi de cerca de 112 milhões de m³/dia, segundo o Boletim Mensal da Produção de Petróleo e Gás Natural da ANP (ANP, 2018). Contudo, de acordo com previsões da Petrobras, apresentadas no seu Plano de Negócios e Gestão 2013 – 2017 (Petrobras, 2014),

estão sendo feitos investimentos no setor de Exploração & Produção que permitirão alcançar, com a operação dos campos do Pré-sal, uma produção de cerca de 160 milhões de m³/dia em 2020. O Plano de Negócios de 2018-2022 não apresentou estimativas de produção de gás natural, mas informou da descoberta de diversos novos poços, tanto do pré-sal quanto de outras modalidades de exploração, prevendo um aumento no investimento no setor de Gás & Energia de R$ 3,7 bilhões até 2022 (Petrobras, 2018). Com as informações obtidas através destes e de outros relatórios, é esperado um aumento da oferta, que deverá ser acompanhado pelo desenvolvimento do mercado de gás e da infraestrutura de escoamento dessa matéria-prima, além de um acúmulo de gás que deve ser destinado a outros fins que não o setor energético.

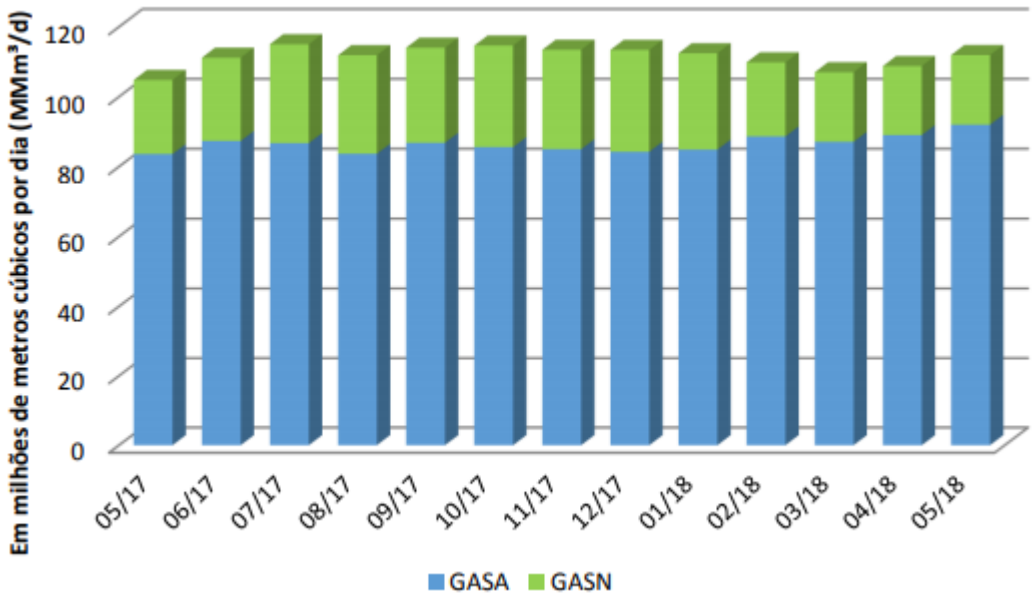

Figura 2.1: Histórico de produção de gás natural no Brasil entre os anos de 2017 e 2018 (ANP, 2018).

No mundo, os crescimentos da produção e da capacidade de exportação vêm contribuindo para a queda do preço do gás natural e para sua desindexação em relação ao preço do petróleo. Nesse cenário global de preços baixos, o desenvolvimento do mercado nacional para o gás natural mostra-se não só essencial, mas também uma grande oportunidade para o aumento da competitividade do Brasil no comércio mundial. Contudo, para que uma oferta em excesso de gás natural não se torne um problema, urge a definição de políticas

energéticas e industriais, integradas e coordenadas entre as diferentes esferas do poder público.

2.1.1. Metano

O metano (CH_4) é um gás de elevada estabilidade termodinâmica, tipicamente encontrado na terra, em depósitos de hidrocarbonetos (petróleo), em hidratos de gás no fundo do mar ou no interior de geleiras, e nas emissões de vulcões de lama, estando neste último caso normalmente acompanhado de hélio, nitrogênio, betume e salmouras ricas em iodo e bromo. Acredita-se ainda que vastas quantidades de metano estejam presentes no interior da terra (manto terrestre) (Methane, 2012). A migração desse metano de camadas mais profundas até níveis mais superficiais ocorre através de grandes fraturas geológicas, denominadas falhas, sobretudo nos limites de placas tectônicas. Em áreas vulcânicas o metano reage com o oxigênio formando o dióxido de carbono que é expelido pelos vulcões (EPA, 2015).

O metano é considerado o segundo maior responsável pelo efeito estufa no mundo, atrás apenas do dióxido de carbono. Este gás apresenta menor tempo de residência na atmosfera quando comparado com o CO_2, no entanto seu potencial de aquecimento é 60 vezes maior. Além da alta capacidade de absorção da radiação infravermelha (calor), o metano pode ajudar a dar origem a outros gases do efeito estufa, a exemplo do CO_2, O_3 troposférico e vapor de água estratosférico (Cicerone & Oremland, 1988; Duxbury *et al*., 1993; Khalil & Rasmussen, 1995). O metano é também conhecido como gás dos pântanos, por se tratar de um subproduto da deterioração de matéria orgânica. Sua concentração vem aumentando à razão aproximada de 1% ao ano (duas vezes mais rápido que a do dióxido de carbono) e seu nível atual já é de aproximadamente 1,7 ppm, o que representa mais do que o dobro do nível pré-industrial. Na Figura 2.2 é possível observar o aumento dessa concentração ao longo do século XIX, e a taxa de aumento, que vem apresentando decréscimo com o passar dos anos.

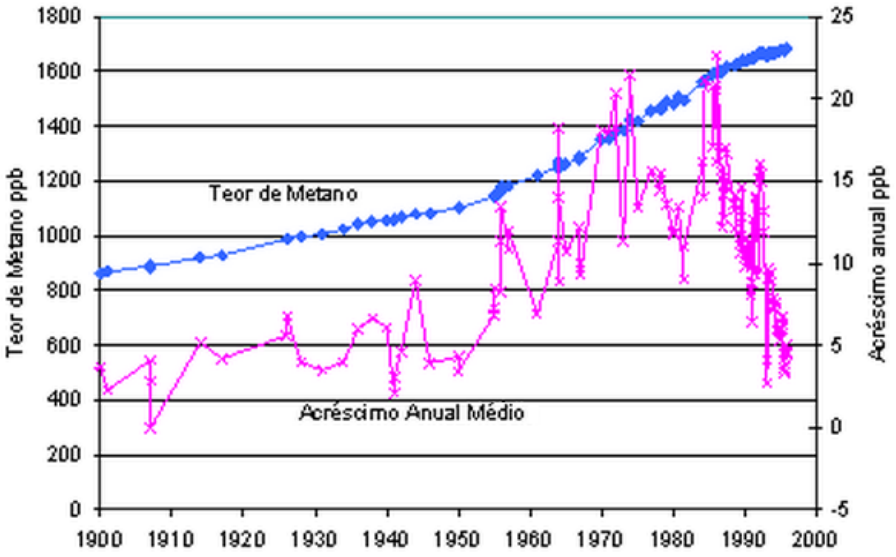

Figura 2.2: Variação da concentração de metano na atmosfera. (ESRL, 2015)

O metano pode ser produzido por processos biogênicos e abiogênicos. Os processos biogênicos são resultado das reações químicas realizadas por bactérias estritamente anaeróbicas (Archaebacteria) durante a decomposição de matéria orgânica. Estas bactérias são denominadas metanogênicas (família Methylococcacea), obtendo energia pela redução hidrogenada do dióxido de carbono, acetato, formato, metanol, CO etc. Elas podem viver em ambientes extremos com alta temperatura, hipersalinidade e extremos de pH. Contudo, estas bactérias só produzem metano em ambiente anóxico. Por sua vez, os processos abiogênicos são aqueles decorrentes da combustão de material orgânico, especialmente combustíveis fósseis.

O biogás, proveniente da digestão anaeróbica de matéria orgânica, como lixo e esgoto, através da ação de microrganismos, tem o metano como seu componente majoritário, contendo ainda menores porcentagens de gás carbônico e sulfeto de hidrogênio. Ele é lançado na atmosfera a um índice anual superior a 500 milhões de toneladas, porém até a era moderna, era eliminado da atmosfera com igual rapidez, de modo que a quantidade não se alterava. Não se sabe por que seu aumento é hoje tão rápido. O gás parece ser proveniente de ambas as extremidades da cadeia alimentar. Numa delas, é emitido pelos seres humanos; por meio da mineração de bolsas de gás natural e pela queima de petróleo, enquanto na outra o é por bactérias anaeróbias através da decomposição de folhas, do húmus e de outros detritos orgânicos de pântanos, charcos e arrozais.

As bactérias que oxidam amônia (família Nitrobacteraceae) são também capazes de oxidar metano, entretanto, são incapazes de se desenvolver apenas por intermédio deste processo. As bactérias metanotróficas, por outro lado, requerem unicamente CH_4 para seu desenvolvimento. Embora o sumidouro no solo seja relativamente pequeno, sua ausência poderia causar um aumento na concentração de CH4 até 1,5 vezes superior a taxa atual (Duxbury *et al.*, 1993).

De acordo com Hogan *et al*. (1991), é possível reduzir em 25% o aumento da temperatura global desde que as emissões de metano sejam estabilizadas, o que reforça a importância do uso consciente deste gás e do seu aproveitamento de forma sustentável.

2.2. Bactérias Metanotróficas

Há um grupo de microrganismos, denominados metilotróficos, capazes de consumir os compostos orgânicos com um único átomo de carbono. Dentro deste grupo, estão compreendidos microrganismos dotados de metabolismo ainda mais específico, capazes de oxidar metano, os metanotróficos. Sua maior importância reside no controle do ciclo de carbono, reduzindo a emissão de metano para a atmosfera através do consumo do mesmo (Semrau *et al*., 2010). Todos os metilotróficos, porém, deparam-se com dois desafios em comum: obter ATP a partir da oxidação de substratos incomuns e de baixo potencial energético, e assimilar o carbono por meio de vias especiais, já que todas as ligações carbono-carbono precisam ser sintetizadas novamente (Anthony, 2011).

As enzimas responsáveis pela etapa inicial, que oxidam o metano a metanol, são as metano-monooxigenases (MMOs) (Lipscomb, 1994), que podem estar presentes sob duas formas distintas: metano monooxigenase particulada (pMMO), inserida na membrana da célula; e metano monooxigenase solúvel (sMMO), dispersa no protoplasma, sendo o tipo de enzima produzida dependente do tipo do microrganismo. O metanol obtido é, então, oxidado, pela ação da metanol desidrogenase periplasmática (MDH), a formaldeído (Anthony, 1982; Davidson *et al*., 1985; Frank *et al*., 1993; Wolf & Hanson, 1978). Este pode seguir duas vias metabólicas distintas para a biossíntese: a via da serina ou a da ribulose monofosfato (Figura 2.3), que serão abordadas com mais detalhes no decorrer do

texto, cabendo, contudo, adiantar que se trata da principal forma pela qual é possível distinguir os grupos filogenéticos dos organismos metanotróficos.

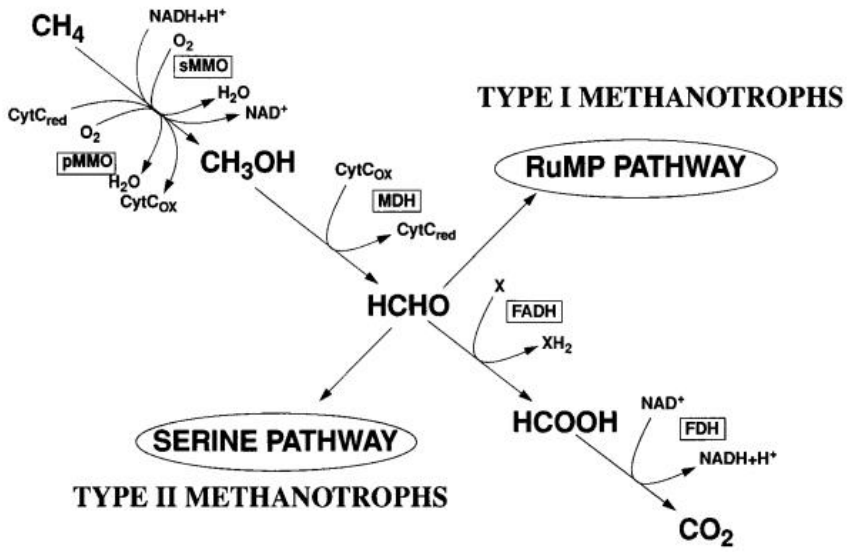

Figura 2.3: Vias metabólicas para a utilização do metano por bactérias metanotróficas. (Hanson & Hanson, 1996)

A etapa seguinte envolve a oxidação do formaldeído a formato, na qual é produzida a maior parte do poder redutor necessário, fazendo uso de um grande número de enzimas, entre elas as aldeído desidrogenases NAD(P)-ligadas. Por último, o formato é oxidado a dióxido de carbono, mediante auxílio da formatodesidrogenase NAD^+-dependente (Anthony, 1991; Dijkhuizen *et al*., 1992).

2.2.1. Filogenia e Taxonomia

De acordo com Hanson & Hanson (1996), as bactérias metanotróficas podem ser separadas em três grupos distintos: Tipo I, Tipo II e Tipo X. As cepas do Tipo I apresentam como características distintivas: membranas intraprotoplasmáticas nas quais são formados os discos vesiculares, utilização da via da Ribulose monofosfato (RuMP) para assimilação de carbono e fosfolipídios característicos com comprimento de 14 a 16 carbonos. De acordo com a sequência do gene 16S rRNA, são agrupadas em *Gammaproteobacteria*s. Alguns gêneros representantes do Tipo I são: *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylomicrobium* e *Methylomona*s. A Tabela 2.2 traz algumas características dos grupos de bactérias metanotróficas do tipo I mais explorados na literatura e a Figura 2.4 a via da ribulose monofosfato.

Tabela 2.2: Características dos principais gêneros de bactérias metanotróficas do tipo I. O símbolo "+" indica a presença da característica, enzima ou capacidade no gênero, enquanto o símbolo "–" representa a sua ausência (Sieburth *et al.*, 1987; Bodrossy *et al.*, 1997; Bowman *et al.*, 1993; Wise *et al.*, 2001; Khmelenina *et al*, 1997; Bowman, 2006; Rahalkar *et al.*, 2007).

Característica	***Methylobacter***	***Methylococcus***	***Methylomicrobium***	***Methylomonas***
Morfologia celular	Cocos elípticos	Cocos bacilos	Bacilos	Bacilos
Mobilidade	Variável	-	+	+
Formação de cistos	+	+	-	+
Resistência a ressecamento	+	-	-	-
sMMO	-	+	-	-
pMMO	+	+	+	+
Fixação de Nitrogênio	-	+	-	Variável
Faixa de pH	5,5 – 9,5	Não reportado	6 – 9	5,5 – 8,5
Temperatura de cultivo (°C)	0 – 40	25 – 65	10 – 30	10 – 42
Tolerância a sais (% NaCl)	0,3 – 4	Não reportado	0,3 – 12	Não reportado

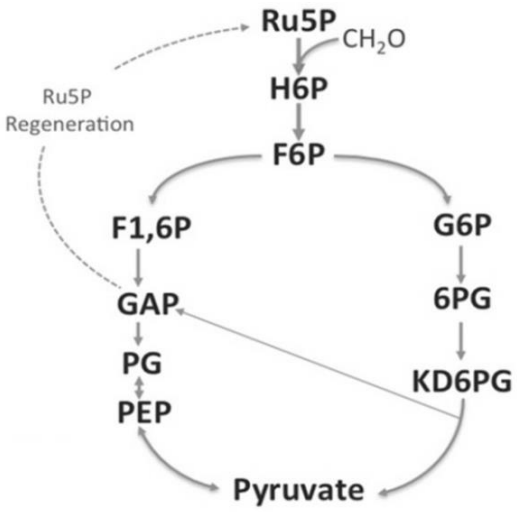

Figura 2.4: Esquema da via da ribulose monofosfato (RuMP), via de assimilação de carbono utilizada por bactérias metanotróficas do tipo I. Adaptado de: http:www.methanotroph.org.

Com relação às bactérias do tipo II, as características distintivas dizem respeito às membranas intracitoplasmáticas alinhadas com a periferia celular, à utilização da via da serina para assimilação de carbono e aos fosfolipídeos característicos com comprimento de 18 carbonos. De acordo com a sequência do gene 16S rRNA, são agrupadas em *Alphaproteobacteria*s. Os gêneros

representantes são o *Methylocystis* e o *Methylosinus.* O metabolismo destas bactérias está representado na Figura 2.5 e características dos principais gêneros estão expostos na Tabela 2.3.

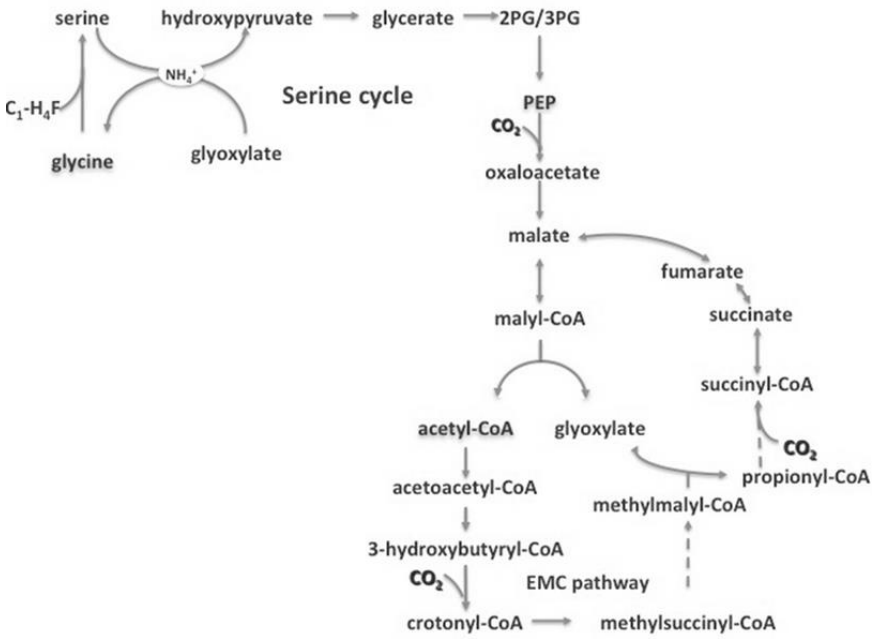

Figura 2.5: Esquema da via da serina, via de assimilação de carbono utilizada por bactérias metanotróficas do tipo II. Adaptado de: http:www.methanotroph.org.

Tabela 2.3: Características dos gêneros padrão de bactérias metanotróficas do tipo II. O símbolo "+" indica a presença da característica, enzima ou capacidade no gênero, enquanto o símbolo "–" representa a sua ausência (Dedysh *et al*, 2000, 2002 e 2004; Dunfield et al, 2003; Bowman, 2006).

Característica	***Methylocystis***	***Methylosinus***
Morfologia celular	Piriforme ou vibróide	Reniforme ou bacilo
Arranjo das membranas intracitoplasmáticas	Paralelo à periferia	Paralelo à periferia
Formação de cistos	Variável	-
Formação de exósporo	-	+
Mobilidade	-	+
sMMO	+	+
pMMO	Variável	+
Cresce em pH 5	-	-
Cresce em 0,5% de sal	+	+

Novos gêneros de *Alphaproteobacteria*s incluem *Methylocella* e *Methylocapsa*, porém tais gêneros apresentam algumas características distintas e não são considerados do tipo II, ou seja, não fazem parte da família *Methylocystaceae*, em virtude de exibirem estruturas únicas das membranas intracelulares e serem moderadamente acidófilas. Essas cepas, do tipo X, apresentam características dos dois grupos, incluindo fosfolipídios com 16 carbonos, a utilização da via RuMP, e crescimento a temperaturas mais elevadas (Hanson & Hanson 1996), sendo então classificadas como um subgrupo do tipo I (Bowman, 1993).

As técnicas de cultivo e isolamento de bactérias metanotróficas somente foram desenvolvidas no início da década de 1970 (Whittenbury *et al*, 1970), e ainda hoje novos grupos e espécies de bactérias consumidoras de metano, fora das descrições padrão anteriormente comentadas, têm surgido com frequência. A biologia molecular também tem prestado importantes contribuições neste sentido. A descrição de bactérias metanotróficas dentro do filo *Verrucomicrobia* (Dunfield *et al*, 2007; Pol *et al*, 2007; Islam *et al*, 2008) é um exemplo. No entanto, embora se saiba que os microrganismos deste filo correspondem a cerca de 10% das bactérias do solo, persistem ainda muitas informações desconhecidas (Buckley & Schmidt, 2002; Sangwan *et al*, 2005; Wagner & Horn, 2006). Estas cepas foram isoladas de locais distantes em países como Rússia, Nova Zelândia e Itália, mas apresentam sequência do 16S rRNA muito similares entre si (>98%), sendo supostos representantes do gênero *Methylacidophilum* (Op den Camp *et al*., 2009). Como características, não possuem membranas intracitoplasmáticas, em seu metabolismo o ciclo de Calvin-Benson-Bassham é completo e seu crescimento é estimulado por CO_2 (Dunfield *et al*., 2007; Pol *et al*., 2007).

Sua diversidade filogenética é muito grande, o que pode ser ilustrado pelo fato de estarem presentes em diferentes filos, sendo uma evidência dessa diversidade os ambientes nos quais tais microrganismos são encontrados (pântanos, sedimentos marinhos e colunas d'água, águas de esgoto, águas subterrâneas, plantações de arroz, entre outros) (Bowman, 2006; Hanson & Hanson, 1996; Dedysh *et al*., 1998). Ainda com o uso de técnicas incipientes, os metanotróficos foram caracterizados como neutrofílicos e mesofílicos, com crescimento ótimo em pH neutro ou próximo de neutro, e temperatura na faixa de

25ºC (Semrau *et al*. 2010). Com o avanço das técnicas, porém, foi constatado que são mais flexíveis, dentre os quais são exemplos as espécies *Methylococcus capsulatus*, com crescimento em temperatura ótima de até 45ºC, e *Methylobacter psychrophilus*, que cresce em temperaturas entre 3 e 10ºC (Omel'chenko *et al*., 1996; Tourova *et al.*, 1999). Outras características destes metanotróficos são a acidofilia (Dedysh *et al*., 1998), a halofilia (Sieburth *et al*., 1987; Lidstrom *et al.*, 1998; Lees *et al*., 1991) e a alcalifilia (Khmelenina *et al.*, 1997; Sorokin *et al*., 2000).

Não obstante a grande diversidade filogenética e de habitat, as principais cepas caracterizadas são metanotróficas obrigatórias, isto é, consomem apenas compostos com um átomo de carbono, a exemplo de metano e metanol, e, em alguns casos, CO_2 e clorometano (Semrau *et al*., 2010). A hipótese de se tratarem de metanotróficas facultativas não foi confirmada, tendo em vista que ou foram descobertas coculturas ou os resultados não puderam ser reproduzidos, sendo necessários mais estudos para uma conclusão definitiva (Theisen & Murrell, 1995).

2.3. Aplicação das Bactérias Metanotróficas

2.3.1. Biorremediação

As enzimas responsáveis pela oxidação do metano, pMMO e sMMO, são inespecíficas, ou seja, são capazes de oxidar outros componentes, como alcanos com até 8 átomos de carbono, ésteres, alcanos cíclicos e hidrocarbonetos aromáticos. Essa habilidade permite que microrganismos produtores dessas enzimas realizem co-metabolismo de moléculas poluentes, a exemplo de hidrocarbonetos clorados (Wilson & Wilson, 1985), uma vez que as células não conseguem utilizar tais componentes para crescimento (Dalton & Stirling, 1982). No entanto, a degradação de componentes como o tricloroetileno tem efeito negativo no crescimento celular, já que este compete com o metano na ligação a MMO, além de consumir os agentes redutores utilizados para o metabolismo do metano, levando à formação de produtos tóxicos, prejudiciais à própria célula. A Figura 2.6 mostra um exemplo de cometabolismo de tricloroetileno.

No contexto da Biorremediação, estudos têm sido conduzidos com o objetivo de estimular a atividade metanotrófica a fim de reduzir as emissões de metano. Acredita-se que tais bactérias sejam capazes de consumir até 90% do metano produzido por bactérias metanogênicas e de 10 a 20% da emissão antropogênica (De Visscher *et al*., 2007; IPCC, 2007).

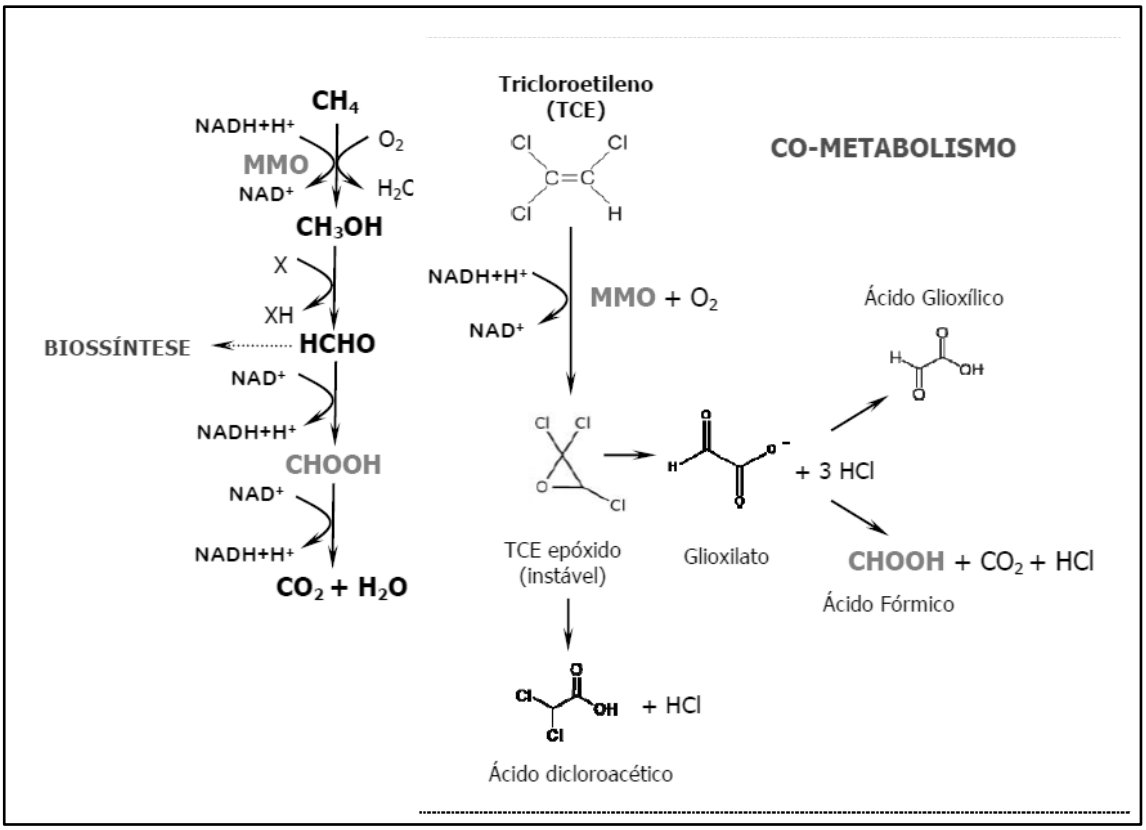

Figura 2.6: Oxidação do metano pela enzima MMO, e o cometabolismo do tricloroetileno (TCE) por bactérias metanotróficas (Oldenhuis *et al*., 1989; Brigmon, 2001).

2.3.2. Produção de Biopolímeros

Os polihidroxialcanoatos (PHAs), como o polihidroxibutirato (PHB), são polímeros acumulados intracelularmente para reserva de carbono e de energia, podendo chegar a até 80% do peso seco de cultivos de microrganismos. Eles são utilizados comercialmente para substituir os plásticos petroquímicos convencionais, porém, devido ao fato de que são produzidos a partir de matérias-primas caras, como milho ou cana-de-açúcar, ainda apresentam um custo elevado, o que limita seu uso e comercialização (Pieja *et al.,* 2011). A utilização de resíduos agrícolas, agro-industriais (gerados nos centros de processamento), ou mesmo de matérias-

primas mais baratas pode levar a uma redução do custo e a viabilização econômica desse produto. O metano, presente em todo o planeta, surge como uma possível fonte de carbono para microrganismos produtores de PHB, como ocorre com uma grande variedade de metanotróficas (Wendlandt *et al.,* 2001).

Tabela 2.4: Linhagens de metanotróficas e suas vias de assimilação de carbono, relacionadas à produção de PHB (Pieja *et al.*, 2011).

Linhagem	Tipo	Via de assimilação de carbono	% PHB
***Methylomonas*LW13**	I	RuMP	0 ± 0
Methylococcus capsulatus	X	RuMP	0 ± 0
***Methylocystis* 42/22**	II	Serina	25 ± 7
***Methylocystis hirsuta* CSC1**	II	Serina	7 ± 2
***Methylocystis parvus* OBBP**	II	Serina	36 ± 8
***Methylocystis* SC2**	II	Serina	30 ± 13
***Methylosinus trichosporium*OB3b**	II	Serina	38 ± 4

2.3.3. Fixação de Nitrogênio

Além da via metabólica utilizada para assimilação de carbono, a capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico também era considerada como um parâmetro diferencial entre os tipos de metanotróficas. As bactérias do Tipo II e as do Tipo X, pertencentes ao gênero Methylococcus, eram consideradas capazes de fixar o nitrogênio, diferenciando-se das do Tipo I (Auman *et al.,* 2001). Entretanto, estudos recentes comprovaram que outros gêneros destas bactérias também são dotados desta habilidade, tornando as metanotróficas um interessante objeto de estudo no que diz respeito ao ciclo do nitrogênio (Khadem *et al.,* 2010).

A fixação microbiológica ocorre mediante a captação do N_2 atmosférico, o qual é convertido em compostos como amônia ou nitrato. O cultivo dessas bactérias como fixadoras de nitrogênio atmosférico na agricultura se constitui, portanto, uma relevante aplicação. Isto, contudo, exige cuidados especiais em relação ao ambiente no qual essas bactérias serão empregadas, tendo em vista que fontes amoniacais

inibem fortemente a atividade nitrogenásica nestas células (Murrel & Dalton, 1983; Pereira Jr., 2012).

2.3.4. Produção de Proteínas

Desde a Primeira Guerra Mundial, o uso de microrganismos como fonte alternativa de proteína, seja para consumo humano ou animal, tem sido considerado, e hoje em dia, com o aumento da população e a dificuldade de prover proteína, esse interesse tem aumentado (Kuhad *et al*., 1997). A proteína microbiana pode ser obtida a partir de leveduras, fungos, algas e bactérias, como as metanotróficas. A empresa Norferm Danmark A/S foi uma das precurssoras nesta linha de pesquisa, tendo iniciado estudos com essa temática e desenvolvido o BioProtein®, porém suas atividades neste ramo já foram encerradas. Em 2014 ocorreu a compra dos direitos de exploração da marca e da tecnologia pela Calysta Nutrition, incluindo a planta já montada na Noruega. Na Dinamarca, a empresa Unibio produz proteína derivada de um consórcio com a bactéria metanotrófica *Methylococcus capsulatus*, com um laboratório avançado de pesquisa nessa linha em parceria com a Universidade Técnica da Dinamarca (DTU). Outras empresas apresentam plantas industriais com produção em larga escala de preparados proteicos compostos de consórcios com metanotróficas, com gás natural como fonte de carbono para esses cultivos, estando inseridas no mercado de ração animal aprovadas pela comissão europeia responsável, e com previsão de aumento em sua produção (Semrau *et al*, 2010; UNIBIO, 2016). Uma das limitações encontradas para a produção de proteína de unicelular diz respeito à característica hidrofóbica do metano, o qual apresenta baixa transferência de massa para a água (solubilidade de apenas 0,019 g CH_4/Kg H_2O), o que ocasionou a necessidade do desenvolvimento de uma tecnologia própria por parte de cada uma das empresas (Han *et al*., 2009). A UNIBIO, por exemplo, tem diversas patentes relacionadas ao seu modelo exclusivo de biorreator e seu produto principal (Uniprotein®), utilizando a tecnologia chamada de U-Loop.

Tabela 2.5: Composição da massa seca de um cultivo de *Methylococcus capsulatus* para produção de PTU (Skrede *et al*., 1998).

Composição	Teor (g/kg)
Massa seca	956
Proteína bruta	702
Gorduras	103
Cinzas	81
RNA	73
DNA	22

Um fator a ser considerado é que, apesar de os biorreatores utilizados pela antiga Norferm e pela Unibio terem sido desenvolvidos para estimular o crescimento de bactérias metanotróficas, o sistema apresentou contaminações constantes por *Aneurinibacillus* sp., *Brevibacillus agri* e *Ralstonia* sp.. Tal contaminação, no entanto, parece ser necessária para estabelecer um crescimento estável, uma vez que consome metabólitos do consumo do metano, que causam a inibição do crescimento bacteriano e comprovou não ser tóxica após testes de qualidade do material resultante das atividades metabólicas do consórcio (Bothe *et al*., 2002).

2.4. Proteínas de Unicelulares

O termo “proteínas de unicelulares” (Single Cell Protein) refere-se às células microbianas secas ou ao total de proteínas extraídas de uma cultura mista ou pura, sendo utilizada como suplemento alimentar para humanos (*Food Grade*) ou animais (*Feed Grade*), assim denominado para diferenciar dos organismos multicelulares mais complexos, a exemplo dos animais e dos vegetais. A composição média dos principais grupos de microrganismos está listada na Tabela 2.6, sendo expressa em porcentagem de massa seca.

Vários aspectos positivos podem ser listados ao se empregar a biomassa microbiana como fonte proteica, destacando-se alguns fatores de maior importância como: o tempo de geração curto, a ampla gama de substratos a serem utilizados, o elevado teor proteico, a capacidade de alteração genética, os fatores ambientais facilmente controlados e a independência da sazonalidade.

Tabela 2.6: Composição média das PTUs (% em massa seca) (Miller & Litsky, 1976).

Componente	Bactérias	Fungos Filamentosos	Microalgas	Leveduras
Proteína	50 - 65	30 - 45	40 - 60	40 - 55
Lipídeos	1,5 - 3	2 - 8	7 - 20	2 - 6
Cinzas	3 - 7	9 - 14	8 - 10	5 - 10
Ácidos nucleicos	10 - 25	7 - 10	3 - 8	6 - 10

A presença dos ácidos nucleicos na célula microbiana representa um motivo com o qual se preocupar, adicionando ao processo uma etapa para sua remoção. Algumas formas de condução dessa remoção seriam a digestão enzimática, o rompimento mecânico por uso de sonicador e a precipitação por tratamento com polietilenoimina. Isso é necessário devido ao possível acúmulo de ácido úrico no organismo, causado pelo consumo excessivo desse componente da PTU, provocando enfermidades como a gota e a formação de cálculos renais em humanos (Parajó *et al*., 1995). Além disso, é necessário aferir a ausência de compostos tóxicos e cancerígenos, possíveis produtos do metabolismo ou decorrentes do processamento posterior (Alvarez & Enriquez, 1988). Outro fator limitante à utilização de microrganismos para consumo humano é a aceitabilidade e familiaridade por parte do mercado consumidor, uma vez que os mesmos são conhecidos apenas pelos efeitos negativos que causam, principalmente as doenças. Nesse sentido, as leveduras apresentam certa vantagem, pois são utilizadas há anos em fermentações tradicionais, como a do vinho e a da cerveja, e na panificação, sendo mais facilmente passíveis de aceitação para consumo. Vale ressaltar ainda que as metanotróficas carregam consigo um outro fator de desconfiança para o consumidor, o fato de elas serem produzidas com uso de metano, ao invés das fontes de carbono tradicionais.

Bactérias possuem, em sua maioria, taxas de crescimento maiores e são menores que os demais microrganismos, o que dificulta a etapa de separação. Entretanto, seu teor proteico é maior quando comparado aos fungos filamentosos, os quais são mais facilmente separados, mas cuja aceitabilidade e taxa de crescimento são menores. Além disso, estes microrganismos concentram metais pesados em sua biomassa, sendo necessárias outras etapas de separação e acarretando no aumento dos custos do processo. Logo, é necessário ponderar a

respeito destes aspectos para que seja tomada a decisão sobre qual tipo de microrganismo utilizar para a produção de proteína de unicelular.

A seguir, na Figura 2.7, está ilustrado um esquema simplificado da produção de proteína de unicelular, sem levar em consideração ações adicionais que variam conforme as condições utilizadas.

Por se tratar de um alimento, algumas precauções se fazem necessárias, principalmente no que tange à matéria-prima a ser utilizada. Isso porque ela é o “principal risco” à segurança do produto final. Testes de toxicidade, entre eles o de toxicidade aguda, de curto prazo, em animais em escala laboratorial, bem como outros mais detalhados e de longo prazo (toxicidade crônica), incluindo seres humanos, devem ser realizados. Por se tratarem de inúmeros testes, pesados investimentos científicos e financeiros são necessários. Além da toxicidade, o sucesso do uso de PTU ainda vai depender da aceitabilidade junto ao mercado consumidor, já que questões relativas à segurança, ao valor nutricional e ao aspecto também são extremamente relevantes para o público.

Em relação aos aspectos econômicos, para a produção de PTU são necessários fermentadores de grande escala, enquanto para a alta produção de biomassa, elevadas taxas de transferência de oxigênio são demandadas, devido às altas taxas de crescimento e respiração celular, o que, consequentemente, aumenta a produção de calor metabólico e, com isso, a necessidade de um sistema eficiente de resfriamento. Os fatores econômicos que devem ser considerados são os mesmos de qualquer processo tecnológico: matéria-prima, energia, investimento, custos operacionais, tratamento dos resíduos, segurança e, por último e talvez mais importante, a inserção/manutenção no mercado.

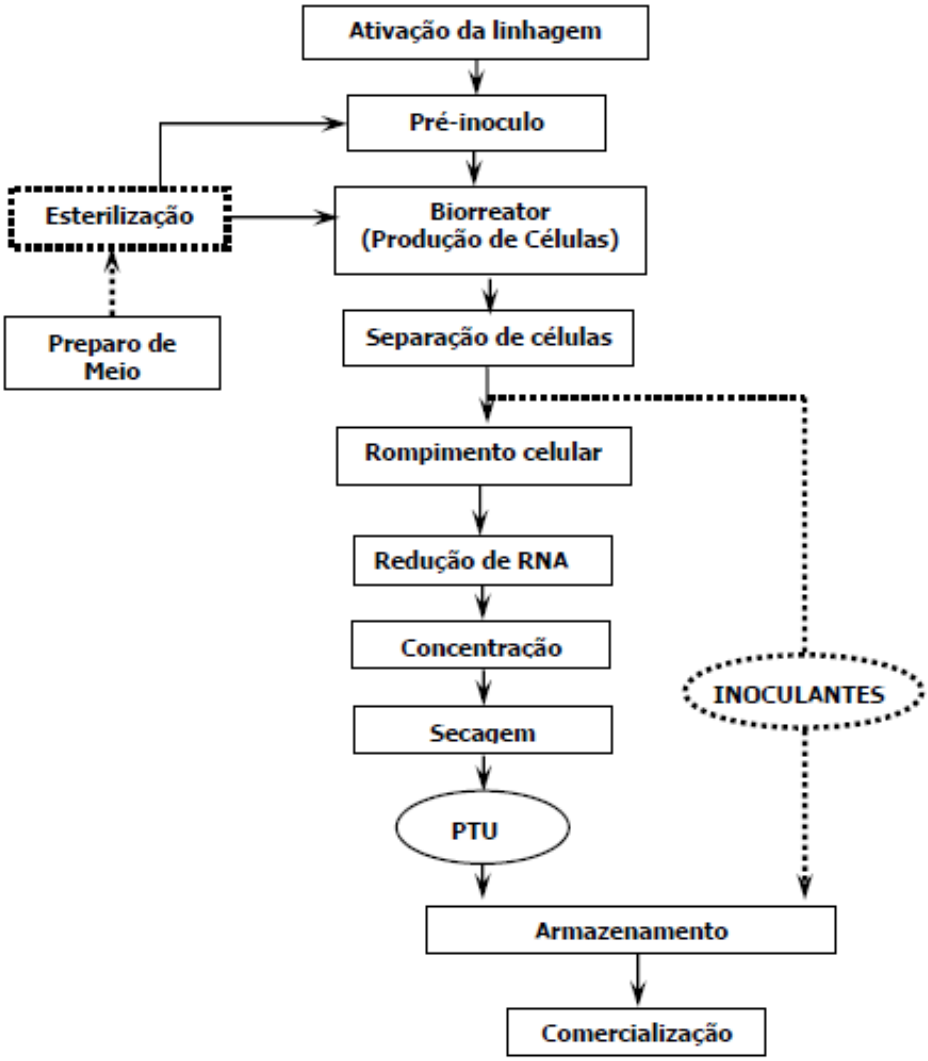

Figura 2.7: Esquema básico de produção de proteína de unicelular (Pereira Jr., 2012).

Os custos com matéria-prima influenciam consideravelmente os custos totais de produção, o que torna de extrema importância optar por fontes baratas, que podem ser encontradas sob a forma de resíduos agrícolas, industriais, entre outros, ou mesmo de fontes fósseis de custos competitivos. Os fatores envolvidos com o custo da matéria-prima são: a produção propriamente dita, o seu rendimento em substrato e a proximidade em relação à planta, o que vai exercer impacto sobre os aspectos logísticos e a capacidade da mesma. A simplificação da etapa de pré-tratamento da matéria-prima pode trazer benefícios econômicos para o processo. Para o produto-alvo desse estudo (PTU), que se enquadra na categoria de “low price high volume”, a economia de escala é um fator de extrema importânica.

Outro fator importante relacionado à economicidade do processo é referente aos gastos com utilidades (por exemplo, água e energia para realização das diversas etapas). Locais que disponibilizem energia elétrica, térmica, ou até mesmo fóssil, de qualidade e com baixo custo, são os preferidos.

Os custos de capital são determinados pelo preço dos equipamentos principais e acessórios do processo e pela capacidade da planta industrial. A principal variável nesse aspecto é o tamanho da planta, e há de se avaliar os elevados custos com investimento de bens e de capital em processos que utilizem matérias-primas baratas e simples, que não requeiram tratamentos prévios onerosos com aqueles que utilizem substratos baratos e tecnologia mais simples.

Evidentemente, a produtividade do processo é um parâmetro que deve ser otimizado antes do escalonamento do processo, já que impacta diretamente no tamanho da planta e consequentemente nos custos de capital. Os custos do processo são cobertos pelo produto obtido. O valor comercial do produto relaciona-se aos custos envolvidos para se atingir a qualidade determinada/especificada pelo mercado, a qual por sua vez está ligada à sua aplicação. Assim, uma melhor qualidade do produto é atingida pelas etapas de *downstream*, que compreendem a recuperação e a purificação da biomassa microbiana.

2.4.1. Aspectos Tecnológicos

Inúmeros fatores precisam ser levados em consideração, e esses vão desde a seleção do microrganismo e a seleção das matérias-primas/substratos, até o processo de separação. Para a seleção do tipo de microrganismo, é necessário que seu cultivo seja tecnológica e economicamente viável, utilizando meios constituídos de nutrientes simples e não onerosos, e também não exigindo esterilidade, sendo, no entanto, necessário garantir que a contaminação não se sobreponha ao microrganismo escolhido nem apresente características nocivas à PTU (acúmulo de metais pesados, toxicidade, produção de enterotoxinas, etc). As matérias-primas que podem ser utilizadas são tão distintas quanto os microrganismos, e algumas já utilizadas estão listadas na Tabela 2.7, acompanhadas dos respectivos microrganismos consumidores.

Tabela 2.7: Diferentes matérias-primas utilizadas na produção de PTU (Silva *et al*., 1995; Anvari & Khayati, 2011; Skogman, 1976).

Matéria-prima	Microrganismo	Observações
Licor da indústria de celulose e papel	*Candida utilis* *Paecilomyces varioti*	Uso durante as Guerras Mundiais pela Alemanha.
Lactose de leite	*Kluyveromyces marxianus*	Pré-tratamento e variação sazonal do fornecimento como fatores negativos.
Amido	*Saccharomyces fibuligera Candida utilis*	Sacarificação e fermentação simultâneas.
Glicose	*Fusarium graminearum*	Produção simultânea de produtos de alto valor agregado.

Outras matérias-primas também apresentam potencial para uso, porém ainda é necessário o desenvolvimento de tecnologias mais avançadas que permitam contornar os obstáculos presentes. Em virtude de sua abundância, a celulose é bastante atrativa. Entretanto sua associação com lignina, além da necessidade de pré-tratamentos, tornam o uso de tal matéria-prima ainda inviável. Alcanos já foram testados para produção de proteína de unicelular por leveduras, (utilizando n-parafinas como fonte de carbono) na Inglaterra, Itália, Japão e Romênia, mas muitos tiveram sua aplicação limitada devido a problemas associados ao potencial carcinogênico (Bamberg, 2000).

Quando se trata de recuperação e purificação de produtos biotecnológicos, os métodos possíveis são extremamente variados. A escolha dos métodos e das etapas necessárias é inerente ao tipo de molécula de interesse, aplicação e pureza exigida (Pereira Jr., 2012). Esse processo de recuperação é feito, normalmente, em duas etapas: concentração e processamento. Na concentração, vários métodos podem ser aplicados, incluindo filtração, sedimentação e centrifugação, resultando em um concentrado ainda com grande porção de água, requerendo uma etapa extra de pós-tratamento. Um procedimento também muito utilizado é o do rompimento das células, o qual deve levar em consideração diferentes fatores tais como o tamanho e a tolerância da célula, a necessidade de controle de temperatura, o gasto de energia, o custo e o capital de investimento. Métodos mecânicos, a exemplo do cisalhamento, e não mecânicos, com tratamentos químicos e enzimáticos são utilizados para este fim.

Após o rompimento celular, obtém-se um homogeneizado contendo moléculas, cátions e ânions intracelulares, fragmentos de tecidos, proteínas, vitaminas, lipídeos e os ácidos nucléicos (considerados no projeto como contaminantes), que podem então ser separados ou removidos por diversos métodos como filtração, centrifugação, precipitação ou extração líquido-líquido. A última etapa envolve a desidratação e secagem da biomassa. Neste estágio, secadores pneumáticos rápidos, compatíveis com a preservação das moléculas e capazes de destruir eventuais agentes contaminantes, são utilizados. Outras opções são a secagem a vácuo e a filtração a alta pressão (Kilikian & Pessoa Jr., 2001).

2.4.2. Prospecção Tecnológica

A busca por documentos de patentes relacionados à produção biotecnológica de proteínas a partir da fermentação de gás natural foi baseada em palavras-chave relacionadas ao tema, devido ao fato de não existirem, na Classificação Internacional de Patentes, itens que caracterizem tecnologias relacionadas ao mesmo. Esta busca foi realizada por integrantes do LADEBIO com o intuito de se obter maiores informações sobre o tema, titulares, empresas e o consequente interesse do mercado neste produto (Pereira Jr., 2012). Os dados foram atualizados para o presente trabalho utilizando o mesmo banco de dados, da WIPO (World Intellectual Property Organization), utilizando a plataforma de busca Patentscope.

A análise foi feita para patentes a partir dos anos 1980, com o primeiro resultado sendo apresentado no ano de 1984, com uma patente da empresa suíça Ciba Geygy. No início da década de 2000, o tema passou a ser explorado de forma mais efetiva, havendo um incremento da quantidade de depósitos, conforme mostrado na Figura 2.8.

Pela análise dos dados obtidos, observou-se que existem microrganismos de diferentes tipos com capacidade de metabolizar o gás metano (como bactérias, leveduras e algas) sendo estudados. As bactérias, contudo, se destacam pelo elevado número de trabalhos que as envolve.

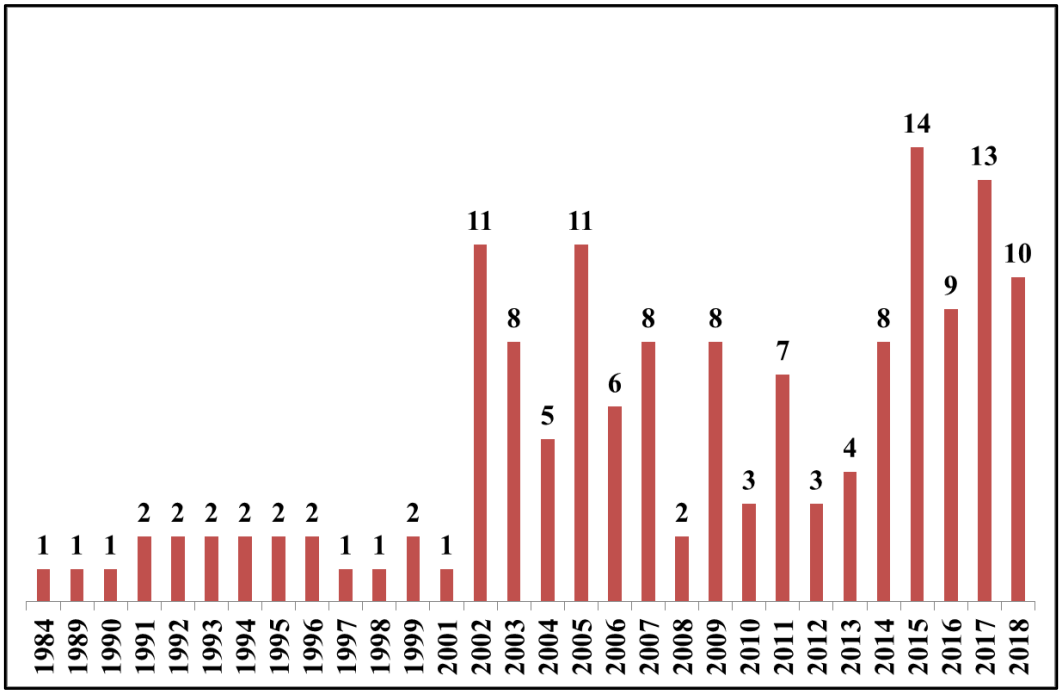

Figura 2.8: Distribuição cronológica dos depósitos de patentes relacionados ao uso de metanotróficos, proveniente do banco de dados do WIPO (Adaptado de Pereira Jr., 2012).

A titularidade das tecnologias que envolvem a temática está bem distribuída entre universidades, empresas, instituições de pesquisa e desenvolvimento e pesquisadores individuais. Conforme mostra a Figura 2.9, o destaque é das empresas, seguidas pelas instituições de pesquisa e pelas universidades, com um número menor de depositantes sendo pesquisadores individuais.

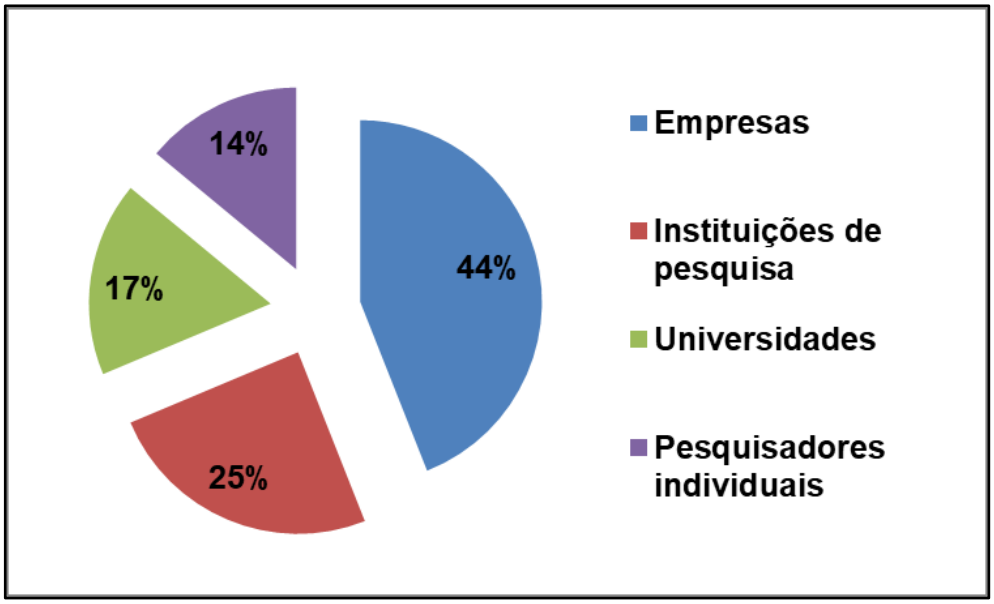

Figura 2.9: Distribuição mundial dos documentos de patente por classe do titular. Dados analisados até 2018. (Adaptado de Pereira Jr., 2012).

A partir deste estudo prospectivo foi possível comprovar que os microrganismos com capacidade de metabolizar metano são bastante versáteis e possuem uma ampla abrangência de aplicações além da produção de proteína microbiana para alimentação. Podem ser aplicados em atividades de biorremediação ambiental, produção de medicamentos, biopolímeros e outros, como apresentado na Figura 2.10, e já comentado anteriormente.

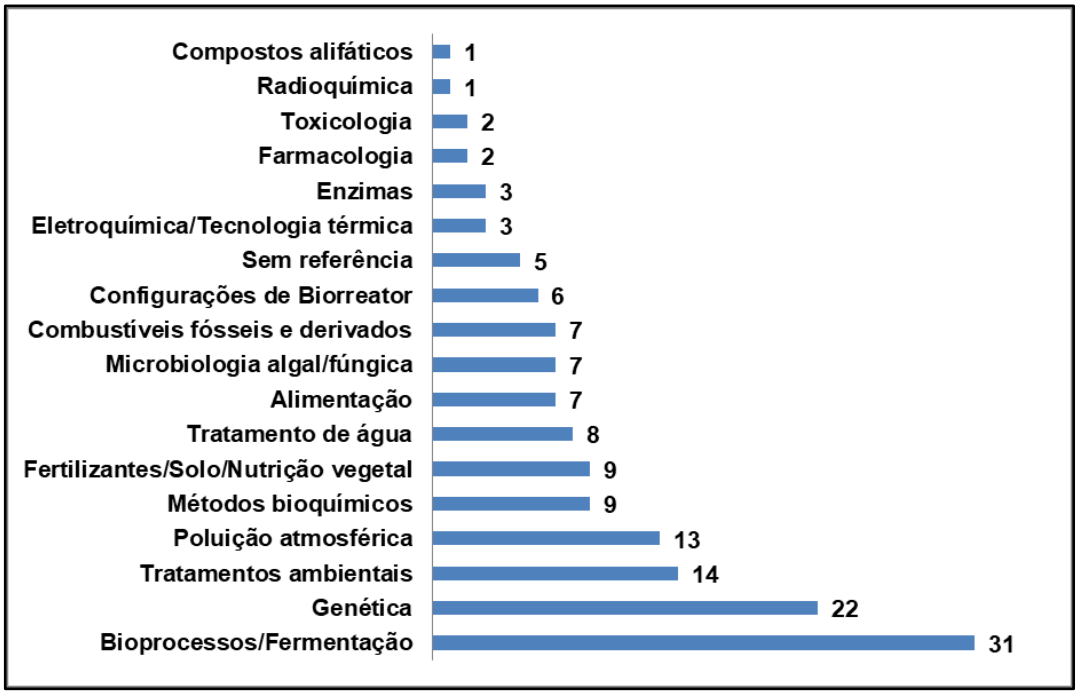

Figura 2.10: Distribuição mundial dos documentos de patente em função da temática principal. Dados analisados até 2018. (Adaptado de Pereira Jr., 2012).

Observa-se que as tecnologias ambientais se destacam de uma forma geral. Estas englobam a remediação de solos contaminados, tratamento de águas e poluição atmosférica, esta última relacionada com a remoção de metano de ambientes confinados. No total, foram levantadas mais de 30 patentes na temática ambiental.

O escopo de aplicação dos metanotróficos vai além dos processos ambientais, uma vez que tais microrganismos produzem diversas substâncias de interesse industrial através de metabolismo fermentativo, tais como solventes, biopolímeros, alimentos, fármacos, produtos da química fina e outros. Existem 55 patentes que tratam de tecnologias para a produção de diferentes tipos de compostos, conforme mostra a Figura 2.11. Constata-se através desta figura uma

série de tecnologias que permitem a produção de uma variedade de compostos em diferentes setores industriais. Ressaltam-se as tecnologias para produção de alimentos, baseadas nos 32 documentos relacionados à produção de proteínas microbianas (PTU), além daquelas para carotenoides, lipídeos e antioxidantes. A produção de solventes, produtos da química fina e da "biopetroquímica" também é explorada a partir dos metanotróficos (polímeros, isoprenoides, terpenoides, óxido de propileno e o próprio metanol).

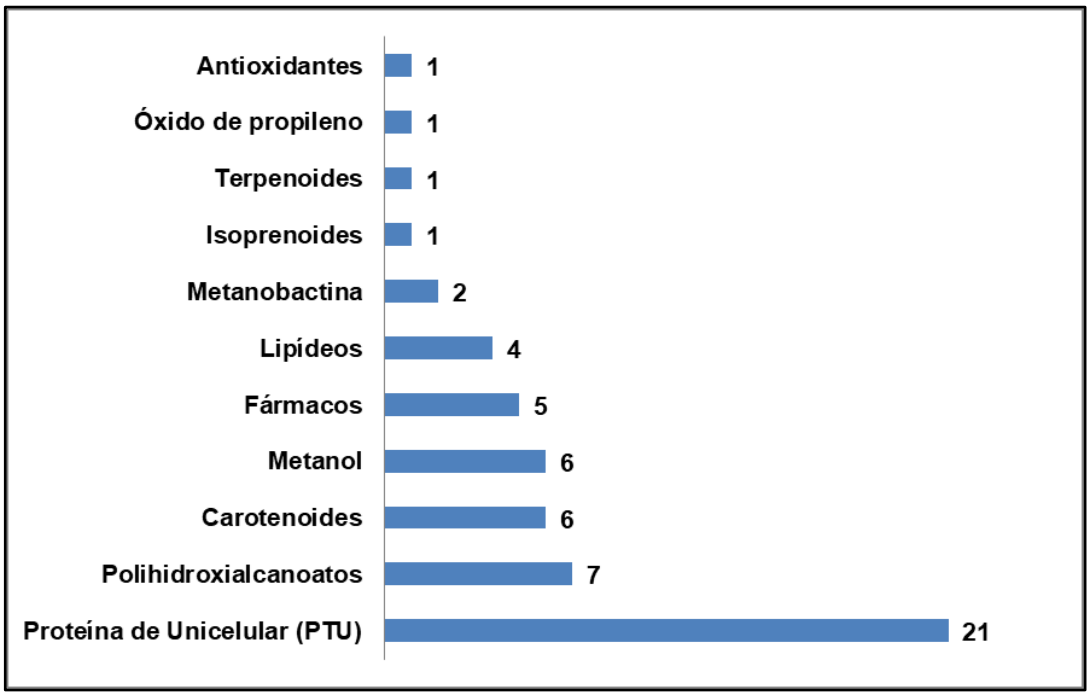

Figura 2.11: Distribuição mundial dos documentos de patentes relacionados a tecnologias para a produção de produtos químicos e biotecnológicos em processos conduzidos por metanotróficos. Dados analisados até 2018. (Adaptado de Pereira Jr., 2012).

Em especial, a produção de proteínas microbianas, ou produção de proteínas a partir de gás natural vem sendo explorada significativamente quando comparada aos demais compostos. Os 21 documentos relacionados à produção de proteína microbiana representam 38% entre as tecnologias para a geração de produtos bioquímicos e 14% dos relacionados aos microrganismos metanotróficos. Em todos os casos os microrganismos utilizados são bactérias, sendo na sua grande maioria dos gêneros *Methylococcus ou Methylobacterium*.

2.5. Fermentação de Substratos Gasosos

Quando se faz referência a bioprocessos, é comum pensar na utilização de açúcares como substrato, por ser este o tipo de fermentação mais conhecido, estudado e, consequentemente, aplicado na indústria há muito tempo. O uso de substratos gasosos ao invés de sólidos, facilmente dissolvidos em água, parece algo difícil e de baixa aplicabilidade, porém isso não condiz com a realidade (Henstra *et al.,* 2007; Daniell *et al.*, 2012).

Com o agravo do efeito estufa e suas consequências, o uso de fontes renováveis e a remoção de gases indesejados da atmosfera se tornaram prioridade em todo o mundo. Esse interesse por biocombustíveis e a necessidade de se aproveitar as fontes de carbono disponíveis fez com que o uso de gás de síntese, do biogás e do próprio gás natural fosse incentivado, gerando grande investimento em pesquisas nessas áreas (Durre & Elkmanns, 2015).

Quando se trata de fermentar um gás, há uma série de desafios a serem enfrentados, dentre os quais estão o tipo de reator a ser utilizado e a transferência de massa da fase gasosa para a fase líquida, essencial para o consumo do substrato pelo microrganismo (Klasson *et al.*, 1992). No caso do metano, principal componente do gás natural, esse problema fica intensificado, levando em consideração a baixa solubilidade deste gás em água (Engineering Toolbox, 2016). A Figura 2.12 apresenta um modelo de transferência de massa entre as fases líquida e gasosa e consequente contato do gás dissolvido com a célula, sendo possível observar que são muitas as resistências associadas a esse processo. Existem barreiras referentes à interface gás-líquido, às próprias resistências das fases (porção do seio do líquido que o gás vai percorrer para entrar em contato com a célula) e, finalmente, à célula em si, que vai impor resistência a essa entrada do gás. Diversos modelos matemáticos têm sido desenvolvidos para explicar da forma mais precisa possível os fenômenos que ocorrem e a melhor forma de lidar com eles, bem como as ações necessárias para que todos os entraves fossem ultrapassados e a transferência fosse eficiente com menor gasto energético.

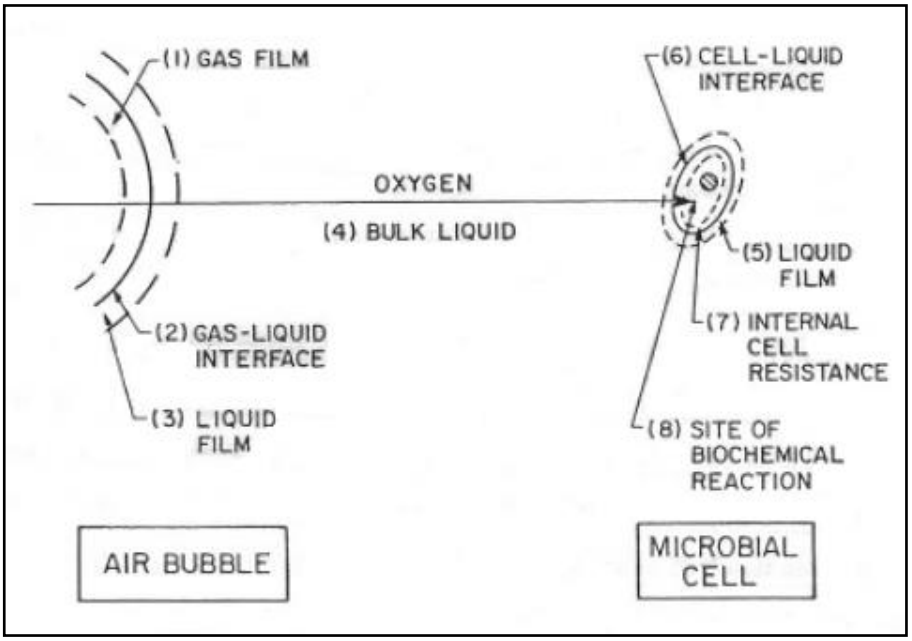

Figura 2.12: Resistências encontradas no transporte do oxigênio e de outros gases entre as fases líquida e gasosa durante o processo fermentativo (Chisti, 1989).

2.5.1. Tipos de Reatores mais Utilizados

Existe uma grande variedade de configurações de biorreatores, dentre as quais os agitados mecanicamente são os mais utilizados nas indústrias. Embora não necessariamente ideais, os tanques agitados apresentam grande versatilidade e fornecem bons resultados para diversos processos. São dotados de um impelidor com pás para promover a agitação do meio e um dispersor de bolhas na região inferior do tanque para aeração. Apesar da sua flexibilidade, demandam grande aporte de energia para a agitação mecânica, tendem a afetar a morfologia celular e devem ser cuidadosamente projetados para produzir adequada mistura e aeração (Pereira Jr. *et al*., 2008; Cerri, 2009).

Os biorreatores agitados pneumaticamente utilizam a energia cinética do líquido, gerada pelo movimento de circulação das bolhas gasosas, para alcançar o grau de mistura desejável no sistema reacional e levar a altas taxas de transferência de massa e calor. Este tipo de biorreator é aplicado a sistemas biológicos suscetíveis às forças cisalhantes e se caracteriza pela elevada relação altura:diâmetro, para que maior tempo de retenção (*hold up*) no seio do líquido seja alcançado. Além disso, elevadas pressões hidrostáticas são geradas na região

próxima à injeção de gases, induzindo o movimento da fase líquida. A presença de dispositivos internos ou externos estabelece a diferença entre a coluna de borbulhamento e o *airlift*, e promove o aumento do grau de mistura, a redução da coalescência das bolhas e à equalização das forças cisalhantes (Pereira Jr. *et al*., 2008; Cerri, 2009).

Os reatores agitados mecanicamente possuem uma série de desvantagens quando utilizados em escalas maiores, como alta complexidade de construção, alto gasto energético, principalmente por parte dos impelidores, e dificuldades no aumento de escala. Já a coluna de bolhas e o airlift não apresentam estes problemas, por não possuírem impelidores e promoverem a homogeneização do meio pela própria injeção dos gases no reator.

Biorreatores do tipo *airlift* possuem duas seções distintas, uma de ascensão do gás, onde fica posicionado o borbulhador, chamada de "*riser*" e uma região de descida, pela qual o líquido retorna, denominada "*downcomer*". Essas regiões se conectam na base e no topo do reator, permitindo a circulação do meio. Os reatores *airlift* podem ser, basicamente, divididos em dois grupos: os de circulação interna e os de circulação externa, conforme mostrado na Figura 2.13

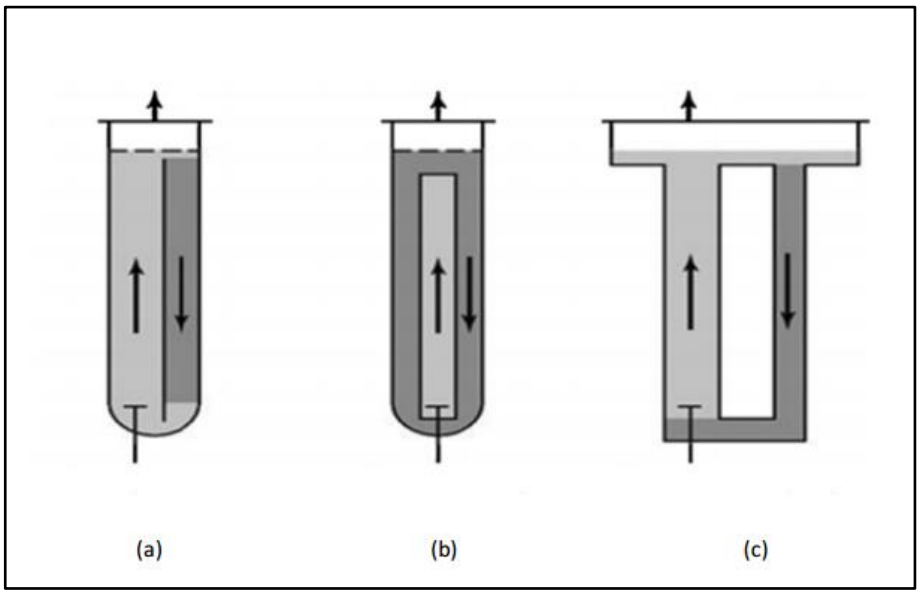

Figura 2.13: Tipos de reator airlift. (a) Circulação interna por placa; (b) Circulação interna por tubo concêntrico; (c) Circulação externa (Adaptado de Chisti, 1989).

. Os de circulação interna podem ter suas regiões separadas por uma placa plana ou por um tubo concêntrico, o que influencia no volume de líquido em cada

uma das regiões, sem, no entanto, interferir nos fenômenos que ocorrem para a circulação e homogeneização do meio (Chisti, 2009; Cerri, 2009).

2.6. Coeficiente Volumétrico de Transferência de Massa - K_La

A transferência dos gases para a fase líquida é um dos fatores limitantes no processo de fermentação de substratos gasosos. Existem três teorias gerais de transferência gasosa: a dos dois filmes de Lewis e Withman (1924), a de penetração de Higbie (1935) e a de renovação de superfície de Danckwerts (1951). As duas últimas são mais complexas, pois levam em consideração os fenômenos físicos envolvidos, porém em mais de 90% dos casos os resultados obtidos com o uso da estratégia mais simples é condizente com o das outras, justificando desta forma o emprego dos dois filmes utilizado neste trabalho (Gulliver, 2007)

Com o aumento da concentração celular no meio, uma maior quantidade de substrato e de oxigênio dissolvidos é exigida pelas células, fazendo com que uma elevada taxa de transferência de massa seja necessária para a manutenção das taxas de crescimento do microrganismo. A Figura 2.14 mostra as etapas envolvidas na passagem do gás da fase gasosa para a fase líquida (Pereira Jr., 2014; Cerri, 2009).

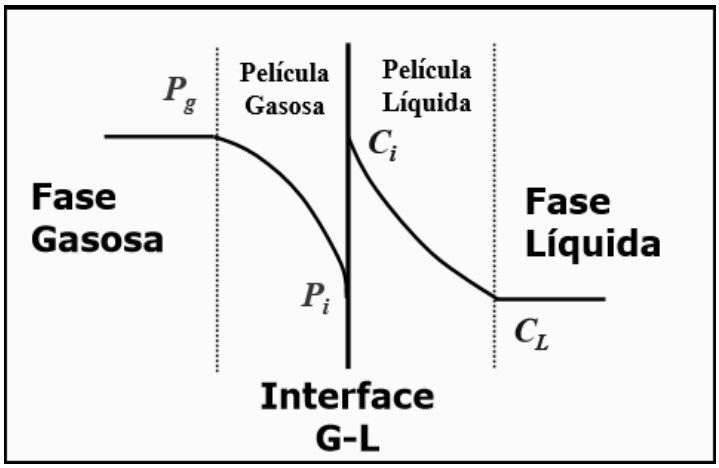

Figura 2.14: Etapas da transferência de gás da fase gasosa para a fase líquida. P_g e P_i representam a pressão na fase gasosa e na interface, enquanto que C_L e C_i representam as concentrações na fase líquida e na interface, respectivamente. (Pereira Jr., 2014).

É possível calcular a eficiência da transferência de massa pelo uso de um parâmetro físico, o coeficiente volumétrico de transferência de massa, ou $K_L a$.

Conforme Kargi e Moo-Young (1985), o K_La é um fator importante na comparação entre a capacidade de aeração de diferentes biorreatores. No caso da fermentação de gases, isso se expande para o substrato, tornando este fator ainda mais importante.

O K_La pode ser definido como o produto de dois termos: um coeficiente global de transferência de massa na fase líquida (K_L) e a área específica da superfície de interface (a).

Admitindo escoamento laminar ao longo da interface gás-líquido, estado estacionário e gás e líquido se comportando como ideais, tem-se que:

$$\frac{dC_L}{dt} \propto (P_G - P_i)a \propto (C_i - C_L)a \tag{2.1}$$

Onde dC_L/dt é a taxa de transferência de oxigênio ou taxa de absorção (mol O_2/m³.h) e *a* é a área específica da superfície de interface (m^{-1}), e P_g e P_i representam a pressão na fase gasosa e na interface, enquanto que C_L e C_i representam as concentrações na fase líquida e na interface, respectivamente. Incorporando-se à equação as resistências na fase gasosa (K_G) e na fase líquida (K_L) ao longo da trajetória do elemento gasoso, temos que:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_Ga(P_G - P_i) = K_La(C_i - C_L) \tag{2.2}$$

Com K_G e K_L sendo os coeficientes globais de transferência de massa nas fases gasosa (mol O_2/m³.h.atm) e líquida (m/h), respectivamente. Levando em consideração que a fase com maior resistência à transferência de massa é a líquida e considerando que $C_i \sim C_s$, onde *Cs* é a concentração de saturação do oxigênio dissolvido (mol O_2/L), a dada temperatura e para água destilada a 1 atm, resulta que:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_La(C_S - C_L) \tag{2.3}$$

Sendo assim, podemos, através dessa correlação, utilizar o K_La (h^{-1}) (e o K_Ga, caso seja de interesse), como uma medida da capacidade de oxigenação do sistema reacional.

Entre os fatores que influenciam o valor do K_La para um determinado sistema, pode-se destacar o regime do escoamento, a geometria do biorreator, o tamanho das bolhas gasosas, a vazão do ar introduzido e o tipo de aeração, além, é claro, das propriedades físico-químicas do meio. Todos estes fatores devem ser observados de modo a maximizar essa transferência de massa e disponibilizar oxigênio e substratos suficientes para o microrganismo (Pereira Jr., 2014).

Esses fatores são subdivididos em três categorias: propriedades do líquido, como densidade, difusividade e tensão superficial; propriedades dinâmicas do líquido, a exemplo da viscosidade e de outros parâmetros reológicos; e propriedades relativas ao processo em si, como intensidade de agitação e fluxo de alimentação de gás. A maior influência no valor de K_La relaciona-se às últimas duas categorias (Cerri, 2009).

2.6.1. Métodos de Determinação do K_La

Existem diversos métodos para determinação do K_La, os quais podem ser classificados como diretos ou indiretos. Os métodos diretos são aqueles nos quais a determinação do K_La é feita na presença do agente biológico, por exemplo o método dinâmico de Taguchi e Humphrey (1966) e o método do balanço gasoso. Ao contrário dos anteriores, os métodos indiretos são realizados sem a presença do microrganismo no meio, sendo medida apenas a capacidade de oxigenação do sistema. São métodos indiretos a desgaseificação, a desoxigenação química com sulfito e a oxidação enzimática da glicose, entre outros.

O método dinâmico, mais utilizado entre os diretos, consiste de duas etapas: uma de interrupção da aeração, com consequente esgotamento do oxigênio dissolvido, e outra de retomada da aeração. É realizado um monitoramento de forma a verificar a taxa específica de consumo de oxigênio pelos microrganismos quando é interrompido o fornecimento de ar e em seguida, quando o mesmo é reiniciado. Um balanço de massa é realizado a fim de avaliar a capacidade do sistema de retornar à condição inicial. Através dessas equações de balanço é possível calcular o valor do K_La do sistema (ASCE, 1984; Garcia-Ochoa & Gomes, 2009).

Os métodos indiretos mais utilizados são o do sulfito e o da desgaseificação, e possuem o mesmo fundamento. No método do sulfito a concentração de O_2 dissolvido é levada a zero pela adição de sulfito de sódio, que reage em contato com

o oxigênio e sofre oxidação a sulfato de sódio. A quantidade de sulfito adicionada e o tempo de reação permitem o cálculo da taxa de transferência para a fase líquida. Já o método da desgaseificação faz uso de nitrogênio para a remoção de todo o oxigênio dissolvido do meio. Quando a concentração de OD chega a zero, é iniciada a aeração, e a curva de OD X tempo é utilizada para ajustar o modelo proposto anteriormente e determinar o K_La (ASCE, 1984; Pereira Jr., 2014; Cerri, 2009).

2.6.2. Estimativa de K_La para o metano ($K_La_{(CH4)}$)

Para alguns gases, como o metano, não existem sensores para medir suas concentrações na fase líquida, o que obriga o uso de correlações para estimar seus coeficientes de transferência. Um exemplo do que pode ser feito foi dado por Yu *et al.* (2006), que relacionaram o K_La do metano com o do oxigênio através de aproximações. De acordo com estes autores, o K_La para gases com baixa solubilidade depende basicamente da resistência na transferência de massa através do filme líquido, e pode ser descrito em função de uma série de variáveis físicas. Levando em consideração duas diferentes configurações de biorreator, do tipo coluna de bolhas e agitado mecanicamente, pode-se estimar o coeficiente pelas equações 2.4 e 2.5, respectivamente.

$$K_La = 0{,}42(D_{gás})^{1/2} \,.\, (\frac{\rho_w}{\mu_w})^{1/6} \,.\, g^{1/3} \quad \text{(reator tipo coluna de bolhas)} \quad (2.4)$$

$$K_La = \frac{0{,}13(\frac{P}{V})^{1/4}.(\rho_w)^{1/6}.(D_{gás})^{2/3}}{(\mu_w)^{5/12}} \quad \text{(reator agitado mecanicamente)} \quad (2.5)$$

Sendo D a difusividade do gás na fase líquida, g a força da gravidade, μ a viscosidade dinâmica e ρ a densidade do meio, percebe-se que a variação do K_La para os diferentes gases vai depender apenas da difusividade (Eq. 2.6 e 2.7). Os valores de viscosidade dinâmica e densidade do meio e o da aceleração da gravidade são independentes do tipo de gás utilizado no processo.

$$K_La \propto (D_{gás})^{1/2} \quad \text{(reator tipo coluna de bolhas)} \quad (2.6)$$

$$K_L a \propto (D_{gás})^{2/3} \qquad \text{(reator agitado mecanicamente)} \quad (2.7)$$

Conforme observado, o valor de $K_L a$ é proporcional a D, que apresenta a seguinte forma de acordo com Yu *et al. (2006)*:

$$D_{gás} = 7{,}4 \times 10^{-8} \frac{T(x_a M)^{1/2}}{\mu_w V_m^{0,6}} \qquad (2.8)$$

Sabendo que a densidade (ρ), a viscosidade (μ), a temperatura (T), o parâmetro x_a (relacionado a sistemas aquosos) e a massa molar do solvente serão invariáveis para um mesmo sistema, e mantendo a mesma linha de raciocínio das etapas anteriores, é possível concluir que o $K_L a$ é proprocional ao volume molar dos gases.

$$K_L a \propto (1/V_m)^{0,3} \qquad \text{(reator tipo coluna de bolhas)} \quad (2.9)$$

$$K_L a \propto (1/V_m)^{0,4} \qquad \text{(reator agitado mecanicamente)} \quad (2.10)$$

A correlação final entre os coeficientes volumétricos de transferência de massa do oxigênio e do metano pode ser então obtida:

$$K_L a_{O2} = 1{,}125\, K_L a_{CH4} \qquad \text{(reator tipo coluna de bolhas)} \quad (2.11)$$

$$K_L a_{O2} = 1{,}169\, K_L a_{CH4} \qquad \text{(reator agitado mecanicamente)} \quad (2.12)$$

2.7. Considerações gerais

Ao realizar o levantamento das informações expostas durante a revisão bibliográfica foi possível observar a escassez de documentos que reportem com detalhes o processo de produção de PTU a partir de gás natural. O conhecimento das questões relacionadas à microbiologia e à bioquímica dos organismos metanotróficos foi se desenvolvendo com o passar dos anos, tendo sido publicados diversos trabalhos sobre as diferentes espécies e suas características, o

mapeamento genético dos metanotróficos, as vias metabólicas de assimilação do metano, a composição nutricional e as condições de cultivo desses microrganismos. No entanto, no que tange à tecnologia do processo propriamente dita, todo o estudo que foi realizado encontra-se protegido sob a forma de patentes ou não foi divulgado com detalhes suficientes para reprodução e nem mesmo comparação.

Dentre as dificuldades encontradas na utilização de gás natural podem ser destacadas a baixa taxa de transferência de massa dos gases para a fase líquida (metano e oxigênio possuem baixa solubilidade em água), as diversas possibilidades de configuração de biorreator, de modo a se explorar de forma eficiente a necessidade do fornecimento de elevados volumes de gás ao biorreator, e, principalmente, a necessidade de vencer a barreira criada pelo próprio metabolismo da célula no que diz respeito a altas taxas específicas de crescimento, tendo em vista o consumo de substrato de carbono único e a necessidade da célula em criar todas as ligações entre as moléculas de carbono (metabolismo biossintético), o que gera um alto gasto energético.

Apesar de alguns outros pesquisadores abordarem esses aspectos do bioprocesso de forma separada, não é feita uma análise completa, o que nos leva à necessidade de desenvolver ensaios desde os métodos de cultivo em escala de bancada até diferentes formas de solubilização dos gases no meio para os processos em biorreator. Sendo assim, o tema se mostra como um grande desafio, que exige o desenvolvimento de novas tecnologias que superem aquelas até hoje protegidas pelos poucos grupos que as detêm, para uma criar uma real aplicação industrial, que atenda ao cenário da produção em excesso de gás natural no território nacional e garanta uma exploração mais sustentável para esse produto.

Capítulo 3

Objetivos

3.1. Objetivos Gerais

A proposta de tese tem como objetivo geral a otimização do processo de produção de biomassa bacteriana a partir de gás natural, explorando os aspectos relacionados ao cultivo do microrganismo e à engenharia do bioprocesso.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar os coeficientes de transferência de massa de oxigênio e metano em diferentes configurações de biorreator, analisando parâmetros como temperatura, taxa de aeração, composição do meio e presença de recheios;
- Avaliar o meio de cultivo e as condições operacionais, inicialmente em frascos, visando reduzir o tempo de geração do cultivo;
- Iniciar a operação no biorreator de bancada selecionado para a produção de biomassa com as condições obtidas nos frascos;
- Preparar a passagem do processo para a escala piloto, otimizando a produção de PTU em escala de bancada e caracterizando sua operação;
- Caracterizar a composição do preparado microbiano obtido.

Capítulo 4

Materiais e Métodos

4.1. Preparo dos Meios de Cultivo

As bactérias metanotróficas provenientes do banco de células da ATCC (*American Type Culture Collection*) que constam no banco de células do laboratório (*Methylomonas methanica ATCC® 51626™*, *Methylococcus capsulatus ATCC® 19069™* e *Methylocystis hirsuta ATCC® BAA-1344™)* foram ativadas no meio mineral NMS1306, indicado pela ATCC, cuja composição está ilustrada na Tabela 4.1.

Para o preparo do meio NMS1306, foi necessária a separação dos componentes, considerando tanto as concentrações quanto as características químicas. Além disso, para solubilizar a mistura EDTA e sulfato ferroso, foi necessário aquecimento, tendo em vista a proximidade da concentração de saturação destes componentes em água. Fazendo uma análise dos componentes do meio de cultivo foi possível observar a ausência do cobre, citado na literatura como essencial para a atividade e expressão das duas formas da enzima metano monooxigenase: a particulada (pMMO) e a solúvel (sMMO). A pMMO está presente em quase todas as metanotróficas e contém íons de cobre em sua estrutura, o que sinaliza como a incorporção desta substância é importante para estas espécies. Sendo assim, empregou-se nas formulações iniciais a concentração de 1,4 mg/L de $CuSO_4.5H_2O$ (Methanotroph Commons, 2016; Semrau *et al,* 2010).

Tabela 4.1: Composição do meio mineral 1306 (ATCC).

Soluções	Sais	Quantidades
NMS (1000 mL*)	Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$)	1,0 g
	Cloreto de cálcio hexahidratado ($CaCl_2.6H_2O$)	0,20 g
	Nitrato de potássio (KNO_3)	1,0 g
	Solução de quelante férrico	2,0 mL
	Solução de componentes traço	0,5 mL
Tampão de fosfato (1000 mL*)	Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	0,272 g
	Fosfato de sódio dibásico dodecahidratado ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	0,717 g
Quelante férrico (100 mL*)	Citrato de amônio férrico	0,1 g
	EDTA (sais de sódio)	0,2 g
	Ácido clorídrico concentrado (HCl)	0,3 mL
Solução traços (1000 mL*)	EDTA	500,0 mg
	Sulfato de ferro II heptahidratado ($FeSO_4.7H_2O$)	200,0 mg
	Sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4.7H_2O$)	10,0 mg
	Cloreto de manganês tetrahidratado ($MnCl_2.4H_2O$)	3,0 mg
	Ácido bórico (H_3BO_3)	30,0 mg
	Cloreto de cobalto hexahidratado ($CoCl_2.6H_2O$)	20,0 mg
	Cloreto de cálcio dihidratado ($CaCl_2.2H_2O$)	1,0 mg
	Cloreto de níquel hexahidratado ($NiCl_2.6H_2O$)	2,0 mg
	Molibdato de sódio ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	3,0 mg

*Quantidade de água deionizada.

Esses valores de concentração ou ao menos a presença, não só do cobre mas também de outros componentes do meio sugerido pela ATCC, foram investigados e serão abordados novamente no decorrer do texto.

Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a pressão manométrica de 1 atm e temperatura de 121°C.

4.2. Ativação da bactéria metanotrófica *Methylocystis hirsuta*

A escolha da bactéria de estudo foi realizada com base nos resultados obtidos em buscas de artigos e patentes relacionados aos microrganismos

metanotróficos, bem como na ativação realizada no próprio laboratório. As bactérias da espécie *Methylococcus capsulatus* são amplamente utilizadas em todo o mundo no que diz respeito às metanotróficas, sendo por isso rejeitada para utilização neste trabalho. *Methylomonas methanica* apresentou tempo de ativação muito elevado e crescimento muito lento nas primeiras tentativas realizadas no laboratório, mesmo para bactérias metanotróficas, o que nos levou à utilização de *Methylocystis hirsuta*.

Foi realizada a ativação da linhagem de *Methylocystis hirsuta* proveniente do banco de células da ATCC no meio mineral NMS1306 nas formas sólida e líquida. Para a ativação os meios de cultivo foram distribuídos em placas de Petri e tubos de ensaio com rolha de borracha, que foram preparados, esterilizados e deixados em estufa a 30 ºC durante uma semana, com objetivo de verificar a pureza do meio de cultivo em relação à presença de microrganismos oportunistas. Foram utilizadas rolhas de borracha de forma a manter a atmosfera de metano, necessária ao crescimento da bactéria, controlada.

Uma vez verificada a esterilidade dos meios, foi realizado o procedimento detalhado a seguir, desenvolvido para a ativação e conduzido em câmara de fluxo laminar (BioProtector 12-plus, VECO). Todo o procedimento foi executado em fluxo laminar e os materiais utilizados foram mantidos em luz ultravioleta por 20 minutos, de forma a diminuir os riscos de contaminação.

1. Com o uso de um *erlenmeyer* (125 mL) contendo 50 mL de meio mineral autoclavado e de pipetas Pasteur esterilizadas (3 mL), foram transferidos 5 mL do meio NMS1306 para um tubo de ensaio estéril tampado com rolha de borracha;
2. O frasco com a bactéria liofilizada foi aberto e foi inserido no mesmo, com outra pipeta Pasteur estéril, de 0,5 a 1,0 mL de meio para a reidratação;
3. Após a reidratação, uma nova pipeta Pasteur foi utilizada para transferir todo o conteúdo do frasco para o tubo de ensaio, que foi homogeneizado para assegurar a reidratação das células;
4. A partir do tubo de ensaio contendo a suspensão celular, foram distribuidas gotas em placas de petri, tubos de ensaio com ágar inclinado, tubos de ensaio com meio líquido e no *erlenmeyer* inicial. Foram preparados e utilizados ainda placas de Petri, tubos de ensaio e outro *erlenmeyer* (125 mL) com 2,0 g/L de metanol;

5. Para fornecer metano para as bactérias, uma mangueira de silicone nova, grande o suficiente para ser mantida dentro do fluxo laminar e conectada à saída do gás, foi autoclavada. Uma das pontas da mangueira, contendo um filtro de membrana 0,22 µm, foi acoplada a fonte de metano, enquanto a outra foi bloqueada com uma pinça, com intuito de minimizar a presença de metano no interior do fluxo laminar e pressurizar a mangueira para a alimentação;

6. Um conjunto agulha/seringa (10 mL) foi inserido na mangueira preenchida com metano, cuja pressão interna foi suficiente para empurrar o êmbolo da seringa, e o gás foi injetado nos tubos de ensaio e nos *erlenmeyers* com uma outra agulha, contendo um filtro de 0,22 µm entre a seringa e a saída. O processo foi efetuado rapidamente e os frascos foram novamente vedados, para que a perda de metano pela abertura da rolha fosse a menor possível;

7. A atmosfera de metano e ar foi reposta a cada 24 horas, empregando o procedimento descrito nos itens 5 e 6.

O tempo estimado para o crescimento da bactéria *Methylocystis hirsuta* era de 18 dias em placas de Petri com meio sólido, incubadas em um dessecador selado com 20% v/v de metano a 30°C. O tempo observado para aparecimento das primeiras colônias nos tubos de ensaio com ágar inclinado foi de aproximadamente 25 dias. Esta bactéria tem capacidade de expressar a enzima metano monooxigenase solúvel (sMMO) sob baixas concentrações de íons de cobre, enzima esta responsável por oxidar o metano fornecido (LINDNER *et al*., 2007).

Após o crescimento da bactéria, incialmente nos tubos de ensaio, foi feito um repique em erlenmeyer para criação de um estoque do microrganismo, que vem sendo utilizado no decorrer do projeto de tese. O estoque foi armazenado em criotubos com 5% de DMSO em ultrafreezer com temperatura de -80ºC. Foi escolhido o uso de *erlenmeyer* de modo a se obter um volume maior de cultivo para que o estoque ficasse mais concentrado em células, porém o crescimento neste tipo de frasco já se mostrou pouco eficaz até mesmo nesse primeiro momento.

4.3. Determinação do Peso Seco

Durante os experimentos, foi utilizado um espectrofotômetro Shimatzu UV-1800 para leitura de densidade óptica das amostras. As leituras foram realizadas em um comprimento de onda de 600 nm e com cubeta de quartzo de 1 mL. Para fazer a relação entre a leitura da absorvância (Abs) dada pelo espectrofotômetro e a concentração celular [X], em g/L, foi necessário determinar o peso seco e construir uma curva padrão (Abs x [X]). O procedimento empregado está descrito abaixo:

1. Dez *eppendorfs* foram colocados na estufa para secagem. Após 24 horas, foram colocados no dessecador por 1 hora para resfriar, sem absorver umidade, e, posteriormente, foram pesados para conhecer a massa dos *eppendorfs* secos e vazios. A manipulação dos *eppendorfs* foi feita com luva e pinça, evitando a variação da massa. A pesagem foi repetida diversas vezes até apresentar constância dos valores. Os *eppendorfs* foram então mantidos na estufa até o momento de sua utilização;
2. Assim que constatada a entrada do cultivo na fase estacionária, o meio de cultivo foi vertido em dois tubos *falcons* estéreis de 50 mL e centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos;
3. 40 mL do sobrenadante foram cuidadosamente removidos com pipeta e as células ressuspendidas em 40 mL de água deionizada e autoclavada. O sobrenadante foi descartado. O procedimento foi repetido para uma melhor lavagem do meio e a solução obtida foi chamada de solução-mãe;
4. Foram tomadas três alíquotas de 1 mL para realizar a leitura da densidade óptica (DO), que deve estar entre 0,6 e 0,7 (caso necessário, é feita uma diluição da solução mãe para que a leitura da DO esteja dentro desta faixa);
5. A partir da solução-mãe diluída, foram retiradas três alíquotas para cada diluição realizada, tendo sido estas 1,0; 1,25; 1,67; 2,5; 5 e 10. A densidade óptica foi lida no espectrofotômetro e guardada, para uso na construção da curva de calibração;
6. Com os dez *eppendorfs* de 2 mL secos e as respectivas massas conhecidas, foram pipetados 2 mL a partir do outro tubo *falcon*, contendo a solução-mãe não diluída. Os *eppendorfs* foram centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos e colocados para secar após o descarte do sobrenadante.Cada amostra foi pesada

em intervalos de 6 em 6 horas até que a massa não se alterasse mais. Assim, determinou-se o peso seco, uma vez que o volume era conhecido (2 mL).

Com os valores de peso seco e a curva obtida pela leitura das alíquotas de solução mãe nas respectivas diluições foi possível obter a curva (Abs x [X]) para esta linhagem de *M. hirsuta*. A Figura 4.1 traz a curva padrão para *M. hirsuta*.

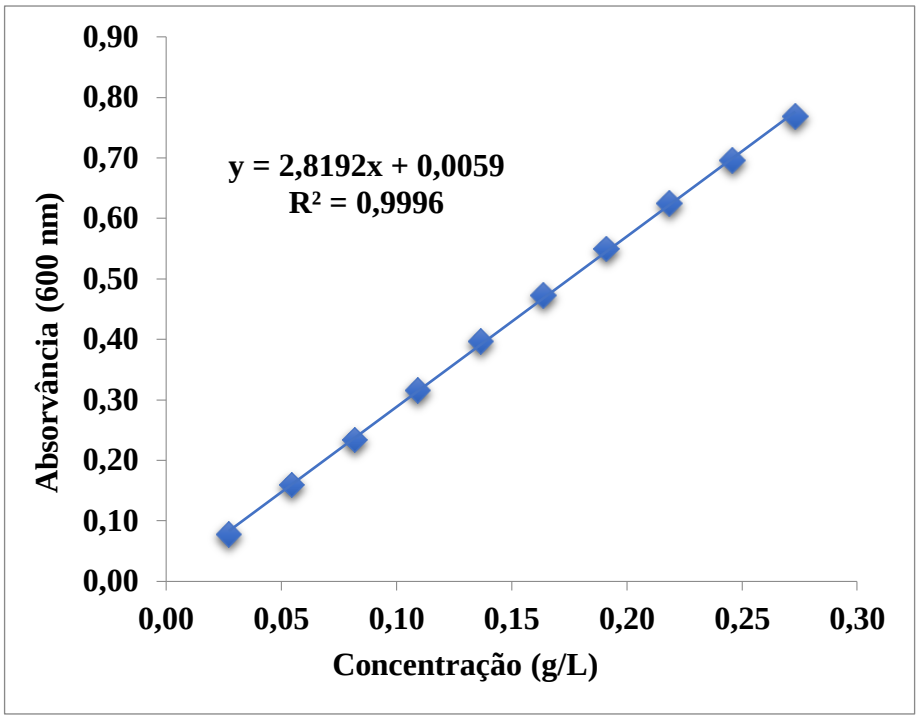

Figura 4.1: Curva padrão de *Methylocystis hirsuta* para correlação entra absorvância e concentração celular.

4.4. Cultivo e experimentos em frascos com atmosfera controlada

A utilização de metano como fonte de carbono gera dificuldade no que tange a alimentação da quantidade adequada de substrato e de oxigênio no meio de cultivo. O uso de recipientes normais, como *erlenmeyers*, mostrou-se em um primeiro momento ineficaz, devido a dificuldade de evitar perdas gasosas no momento da alimentação. Uma solução encontrada, utilizada no cultivo de microrganismos anaeróbios, foi a implementação do cultivo em frascos vedados, comumente chamados de frascos de penicilina. Estes frascos, por serem vedados e feitos para trabalhar sob atmosfera controlada, mostraram-se ideais para o cultivo em pequena escala das bactérias metanotróficas.

Os frascos possuem volume total de 100 mL e os cultivos foram feitos com volume de 50 mL de meio, de forma a se manter uma capacidade de agitação suficiente para a transferência do metano para a fase líquida. Os frascos com 50 mL de espaço livre foram alimentados seguindo um protocolo simples, explicado a seguir:

1. Uma mangueira de silicone estéril (autoclavada e vedada) foi conectada à saída de ar e levada ao fluxo laminar;
2. Um filtro de diâmetro de poro de 0,22 µm foi conectado em uma das saídas da mangueira e na extremidade oposta do filtro foi presa uma seringa de 5 mL. Uma agulha foi encaixada na seringa presa ao filtro de forma que ela se tornasse a via de saída do gás;
3. Após iniciado o fornecimento de ar comprimido, a agulha de saída da mangueira foi inserida na tampa de borracha do frasco de penicilina, enquanto uma outra agulha, para escape do gás injetado, foi inserida em outra região da mesma tampa;
4. Foi passado ar pelo frasco durante 30 segundos, de forma a promover total troca da atmosfera. Após a troca da atmosfera, o ar comprimido foi desligado e foi iniciada passagem de metano pela mangueira;
5. O metano era injetado em um frasco auxiliar, no qual era conectada uma seringa com agulha e uma agulha para escape. Com esta seringa era feita a alimentação, injetando o volume de metano apropriado, calculado de acordo com a proporção desejada, nos frascos que haviam acabado de ter sua atmosfera trocada.

Os frascos foram mantidos em um *shaker innova 44* da NewBrunswick para garantir condições de agitação e temperatura constantes, de 200 rpm e 30ºC. Os ensaios foram realizados com duplicatas para todas as condições e todas as alimentações foram realizadas com 24 horas de intervalo entre elas.

4.4.1. Otimização das concentrações dos componentes do meio

Foram realizados experimentos com diferentes concentrações dos componentes do meio, de forma a avaliar a necessidade do uso de alguns componentes, como a solução quelante de ferro, e a melhor concentração de outros para o crescimento, caso dos fosfatos, do nitrato, entre outros. A concentração do componente utilizada no ensaio para o novo meio de cultivo foi proporcional à

utilizada no meio NMS1306 original. A tabela 4.2 apresenta o planejamento do ensaio inicial realizado com o microrganismo para se obter os melhores valores de concentração o meio de cultivo.

Tabela 4.2: Planejamento experimental para modificação do meio NMS1306 visando a obtenção de densidades celulares mais elevadas.

Nitrato de potássio (g/L)	Ureia (g/L)	Tampão de Fosfato*	Sulfato de cobre*	Quelante de Ferro*
1	-	1	1	-
1,5	-	1	1	-
2	-	1	1	-
1	1	1	1	-
1,5	1,5	1	1	-
2	2	1	1	-
-	1	1	1	-
-	1,5	1	1	-
-	2	1	1	-
1	-	1,5	1	-
1	-	2	1	-
1	-	1	-	-
1	-	1	1	1

* Os valores da tabela para o tampão de fosfato, a soluções de sulfato de cobre e a solução quelante de ferro indicam a proporção do componente em relação ao valor original sugerido pela ATCC e apresentado na Tabela 4.1.

A solução quelante de ferro foi removida do meio NMS1306 para um cultivo preliminar e a bactéria cresceu normalmente, o que justificou o uso do meio sem esta solução no experimento, ainda sendo necessária a confirmação desse resultado. O uso do cobre, reportado por diversos autores e tido como essencial na literatura, também foi testado a fim de evitar desperdício de material durante o projeto. A alimentação foi realizada com a proporção de 50% de ar e 50% de metano.

4.4.2. Ensaios preliminares com suplementação do meio e outras fontes de nitrogênio

Utilizando uma fonte de carbono único, o metano, e com um meio mineral extremamente básico, a bactéria pode exigir uma suplementação do meio para que ocorra um crescimento mais acelerado e com densidades celulares mais elevadas. Para tal, foram testados fatores que poderiam promover um rendimento maior em células.

O meio utilizado a partir deste experimento foi um meio de cultivo modificado (NMS1306 modificado), obtido a partir dos resultados do ensaio do tópico 4.4.1. De acordo com os resultados obtidos, que serão apresentados no decorrer do próximo capítulo, foi removida a solução quelante de ferro e mantido o sulfato de cobre.

Foram utilizados extrato de levedura e peptona, com o objetivo de aumentar a disponibilidade de vitaminas, cofatores, entre outros, e ampliar a quantidade de nitrogênio oferecida aos microrganismos; ureia, como fonte de nitrogênio mais facilmente assimilada pelos microrganismos e potencial substituta para o nitrato; metanol, que está presente na via metabólica das metanotróficas, com potencial para dar um *"burst"* na célula e acelerar o consumo do metano presente no meio; e um surfactante, o *Tween 80*, com o objetivo de aumentar a disponibilidade de oxigênio e de metano na fase líquida. Os valores de concentração para este ensaio foram apresentados na Tabela 4.3. Novamente, a alimentação dos frascos foi realizada com a proporção de 50% de ar e 50% de metano.

Tabela 4.3: Meio de cultivo NMS1306 modificado e com adição de suplementos utilizado no experimento.

Ureia (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Peptona (g/L)	Metanol (g/L)	Tween 80 (g/L)
-	-	-	-	-
0,5	-	-	-	-
-	0,5	-	-	-
-	-	0,5	-	-
-	-	-	0,5	-
-	-	-	-	0,11
-	0,5	-	-	0,11
-	-	-	0,5	0,11

4.4.3. Ensaio com diferentes proporções de alimentação de metano e ar

A injeção de gás nos frascos, realizada com o uso de seringas e agulhas, respeita uma proporção pré-determinada de metano e ar, de forma a manter fixa a concentração dos gases dentro do frasco após cada alimentação. Foram testadas três condições de alimentação nos frascos: 60% de ar, 35% de metano e 5% de CO_2; 70% ar e 30% de metano; e 50% de ar e 50% de metano. Foi utilizada uma porcentagem de CO_2 no experimento pois Sheehan e Johnson (1971) abordaram a hipótese da participação do CO_2 no metabolismo de metanotróficas, auxiliando na formação das bases nitrogenadas, mesmo que em pequenas quantidades. A variação dessa concentração dos gases na mistura é de fundamental importância, pois vai ditar o gasto de substrato e também a perda gerada pela perda do que não for consumido pelos microorganismos.

4.4.4. Uso de fontes alternativas de carbono

Apesar de diversos autores explicitarem a característica de metanotrófica obrigatória de *M. hirsuta*, o uso de outras fontes de carbono precisou ser testado, de forma a comprovar a incapacidade deste microrganismo de quebrar ligações carbono-carbono. O uso de fontes mais complexas pode facilitar a produção de biomassa, tendo em vista o ganho energético com a quebra dessas moléculas.

Para testar a obrigatoriedade da cepa estudada em relação ao consumo de substrato foram realizados ensaios com oito diferentes fontes de carbono: glicose, xilose, glicerol, xilitol, metanol, acetato de sódio, hexano e éter de petróleo. A concentração utilizada foi de 1 g/L de substrato para cada ensaio.

Os experimentos com fontes alternativas, excepcionalmente, foram realizados em erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio, devido ao fato de que a atmosfera não precisava ser controlada, pois não havia alimentação com metano. Os frascos foram fechados com rolha de algodão, de modo que a atmosfera pudesse se renovar com a entrada de ar e a saída dos gases produzidos pelo metabolismo (caso a célula conseguisse utilizar as fontes de substrato disponibilizadas em cada frasco). A agitação foi mantida em 200 rpm, temperatura em 30°C e o pH inicial dos cultivos foi 7,0.

4.4.5. Combinação de suplementos no meio de cultivo

Verificada a importância da suplementação do meio de cultivo, viu-se necessário investigar quais os suplementos mais eficientes para o aumento das taxas de crescimento celular e quais combinações poderiam surtir mais efeito no aumento dessas taxas e das concentrações finais. Para esses ensaios foram utilizados extrato de levedura, peptona e casaminoácidos sendo as concentrações descritas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Concentrações de cada suplemento para os diferentes ensaios.

Extrato de levedura (g/L)	Peptona (g/L)	Casaminoácidos (g/L)
-	-	-
0,5	-	-
1	-	-
2	-	-
-	0,5	-
-	1	-
-	2	-
-	-	0,5
-	-	1
-	-	2
0,25	0,25	-
0,5	0,5	-
1	1	-
2	2	-
0,25	-	0,25
0,5	-	0,5
1	-	1
2	-	2

* Os ensaios com a mistura de casaminoácidos e extrato de levedura foram realizados em uma etapa posterior do projeto, então o controle foi diferente dos demais ensaios.

Os casaminoácidos tem a função de suplementar o meio com vitaminas, cofatores e precursores, de forma a agilizar algumas etapas do metabolismo ao disponibilizar para a célula o composto pronto, sem a necessidade de gastar energia e carbono para sintetizar essas substâncias. Foi utilizada a proporção de alimentação de 30% de metano e 70% de ar.

4.4.6. Uso de perfluorocarbono e óleo vegetal

O experimento consistiu em analisar a influência da adição de um óleo vegetal e de um perfluorocarbono (PFC) no meio de cultivo, visando aumentar a transferência de massa do metano da fase gasosa para a fase líquida. O princípio de atuação dessas duas substâncias é bastante semelhante, com os dois atuando como tensoativos, reduzindo a tensão superficial da água e facilitando a transferência de massa da fase gasosa para a fase líquida. A molécula de tensoativo, ou surfactante, tem uma região polar e outra apolar, o que permite uma melhor solubilização de substâncias apolares, como o metano, e pode auxiliar na disponibilização destas dissolvidas na fase líquida (Holmberg *et al.*, 2002).

O óleo escolhido foi o de soja e o PFC foi o perfluoroctano. Três concentrações de óleo e PFC foram utilizadas: 0,5; 1 e 2% (v/v). Foram testados novamente o extrato de levedura e o casaminoácidos, desta vez em uma mistura combinada com 1% (v/v) dos tensoativos (Óleo+EC e PFC+EC), valores apresentados já Tabela 4.5, de modo a verificar a influência dos mesmos em uma situaçao com maior disponibilidade de metano para o microrganismo. As condições foram as mesmas utilizadas nos outros ensaios em frascos, 200 rpm e 30°C, com proporção de 30% de metano e 70% de ar.

Tabela 4.5: Concentrações dos aditivos no meio NMS1306 modificado para os ensaios com PFC e óleo vegetal.

PFC (% v/v)	Óleo de Soja (% v/v)	Extrato de levedura (g/L)	Casaminoácidos (g/L)
0,5	-	-	-
1	-	-	-
2	-	-	-
-	0,5	-	-
-	1	-	-
-	2	-	-
1	-	1	1
-	1	1	1

4.4.7. Planejamento Experimental com variação da concentração de suplementos e óleo vegetal

Tendo em vista os resultados obtidos durante os experimentos descritos anteriormente, foi realizado um planejamento do tipo Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) com o intuito de otimizar o uso dos suplementos no meio NMS 1306. Os ensaios em frascos de penicilina de 100 mL com 50 mL de meio NMS 1306 modificado foram conduzidos em *shaker* agitado a 200 rpm, temperatura de 30°C e pH inicial 7,0. Os aditivos utilizados foram extrato de levedura, casaminoácidos e óleo de soja em diferentes concentrações. A Tabela 4.6 apresenta as concentrações de cada um destes componentes em cada frasco.

Tabela 4.6: Planejamento experimental DCCR utilizando extrato de levedura (EL), casaminoácidos (CAS) e óleo de soja.

EL (g/L)	CAS (g/L)	ÓLEO (% v/v)
1	1	1
1	1	2
1	2	1
1	2	2
2	1	1
2	1	2
2	2	1
2	2	2
0,66	1,5	1,5
2,34	1,5	1,5
1,5	0,66	1,5
1,5	2,34	1,5
1,5	1,5	0,66
1,5	1,5	2,34
15	1,5	1,5
1,5	1,5	1,5
1,5	1,5	1,5

4.5. Determinação do K_La

Após os ensaios em frascos foi necessária a passagem dos experimentos para sistemas maiores, os biorreatores. Esta mudança de escala, inicialmente para

escala de bancada, deve ser feita em sistemas que permitam uma eficiente solubilização dos gases na fase líquida, permitindo que o microrganismo tenha acesso ao substrato e outros componentes essenciais para seu metabolismo. A obtenção dos valores de K_La de cada sistema utilizado, bem como a otimização desta variável é de fundamental importância para que altas densidades celulares sejam obtidas e o processo possa ser avaliado de forma eficiente.

O método utilizado na determinação do K_La foi o da desgaseificação. Ele consiste em remover o O_2 do meio pela passagem de N_2, e, quando o sensor de oxigênio dissolvido indicar que todo o O_2 foi removido, interromper a passagem de N_2 e iniciar a injeção de ar. A curva da variação da concentração de O_2 dissolvido (OD) que será formada vai permitir o cálculo do K_La.

A Figura 4.2 representa a variação da concentração de OD com o tempo durante a execução do método.

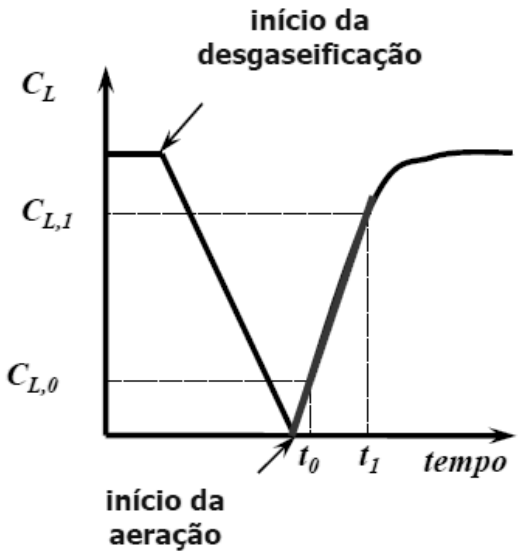

Figura 4.2: Ilustração do comportamento da concentração de OD durante o método da desgaseificação.

Segue a metodologia utilizada descrita em detalhes:

1. Remoção completa do oxigênio do meio com o borbulhamento de nitrogênio até que a concentração de oxigênio dissolvido seja zero;

2. Após a remoção de todo o O_2, o borbulhamento de N_2 foi interrompido e foi iniciada a passagem de ar sintético na vazão pré-determinada;

3. O valor de OD apresentado na tela de controle do reator foi anotado a cada 30 segundos durante 20 minutos ou até que a saturação fosse alcançada;

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e o procedimento foi repetido para todas as vazões estabelecidas no planejamento. O K_La do oxigênio para cada uma das condições pode ser calculado a partir da integração da Eq. (2.3), conforme segue:

$$Ln\frac{(C_S-C_{L,1})}{(C_S-C_{L,0})} = -K_La(t_1 - t_0) \quad (4.1)$$

Onde C_S é a concentração de saturação do O_2, $C_{L,1}$ e t_1 são os valores de OD e tempo no ponto 1 e $C_{L,0}$ e t_0 os valores de OD e tempo no ponto 0. Vale ressaltar que apenas a região linear do gráfico C_L *x* t deve ser considerada nos cálculos, sendo os pontos 0 e 1 o início e o fim dessa região, respectivamente.

4.5.1. Ensaios de K_La em reatores do tipo *airlift* e agitado mecanicamente

Os experimentos realizados tinham por objetivo determinar o coeficiente de transferência de massa do oxigênio para a fase líquida (K_La) (água destilada) para diversas configurações de biorreator em diferentes condições. Foi utilizado inicialmente um reator *airlift* com circulação interna por placa da Electrolab (Figura 4.3) de 9 litros de volume útil, com relação entre altura de coluna e diâmetro interno (H/T) igual a 6:1, equipado com um borbulhador, um sensor de temperatura e eletrodos de pH e OD.

Foram testadas diversas condições no reator, com variação de tipo de borbulhador, temperatura, vazão de ar e a presença de recheios randômicos. Cada uma delas está explicitada na Tabela 4.7.

Figura 4.3: Reator *airlift* utilizado nos ensaios de K_La.

Os recheios usados nos ensaios (Figura 4.4) foram anéis de Pall de 1” e selas Intalox de 1”, ambos feitos de aço inoxidável. O uso de recheios randômicos é muito comum na indústria do petróleo, em colunas de destilação, absorção e esgotamento, com o intuito de aumentar a superfície de contato do material e o tempo de residência deste na coluna, devido ao aumento da tortuosidade do meio.

(A) **(B)**

Figura 4.4: Recheios randômicos utilizados no reator airlift. (A) Selas Intalox 1”; (B) Anéis de Pall 1”.

Foram realizados ensaios com as três diferentes vazões para cada um dos parâmetros indicados na Tabela 4.7. Os borbulhadores utilizados nos ensaios estão ilustrados na Figura 4.5.

Tabela 4.7: Parâmetros avaliados nos experimentos para medição do K_La com água deionizada.

Vazão (L/min)	Temperatura (ºC)	Tipo de borbulhador	Recheios randômicos
4	24	6 furos de 1 mm	Sem recheio
6	30	48 furos de 0,386 mm	Anel Pall1”
8	37	Sinterizado	Sela1”

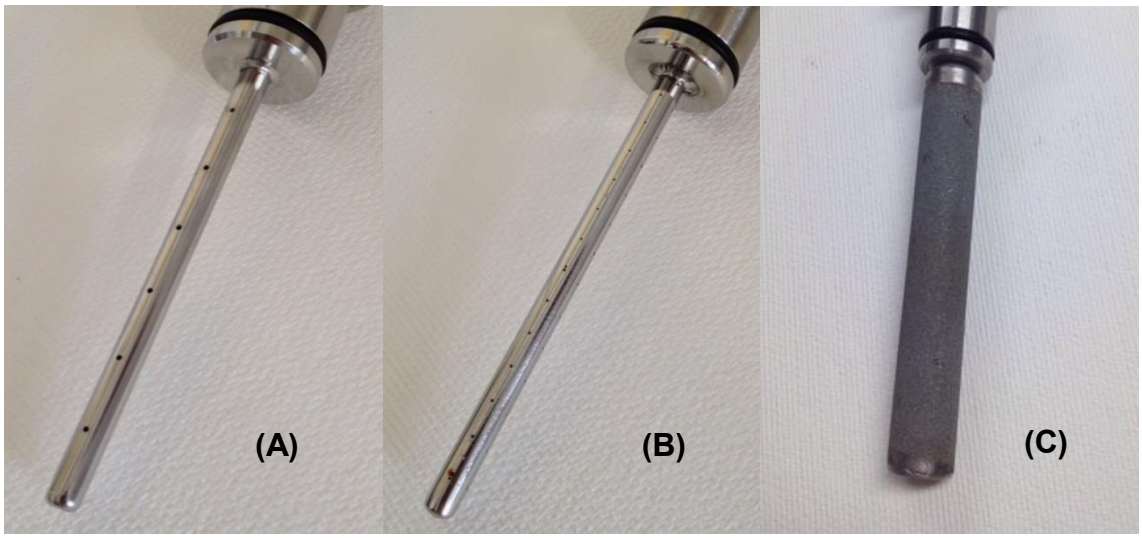

Figura 4.5: Borbulhadores utilizados nos ensaios de K_La no reator airlift. (A) 6 furos de 1 mm; (B) 48 furos de 0,386 mm; (C) sinterizado.

Em um momento posterior, foram realizados ensaios com o meio mineral NMS 1306, utilizado durante o processo para crescimento dos microrganismos. Essa fase líquida foi investigada devido ao fato de existir uma interferência significativa na solubilização dos gases a depender da concentração de determinados íons e da força iônica do meio. Estes ensaios também foram realizados em triplicata.

Para uma comparação mais efetiva e visando a utilização de reatores agitados mecanicamente (conhecidos em inglês como STR, sigla para “Stirred Tank Reactor”) nas fermentações, foram realizados ensaios comparativos neste tipo de biorreator. O modelo utilizado foi o BioFlo & Celligen 310, da New Brunswick, que funciona com impelidores com 6 pás, mostrado na Figura 4.6. Os ensaios foram

realizados com as vazões equivalentes em vvm (volume de ar por volume de meio) às utilizadas no airlift. Valores obtidos para meio mineral NMS 1306 e água deionizada puderam ser comparados e os resultados avaliados para futura utilização de cada sistema.

Figura 4.6: Impelidor de seis pás utilizado na agitação do meio no biorreator BioFlo & Celigen 310.

4.5.2. Ensaios de K_La em reator tipo coluna de bolhas (RCB)

O reator utilizado nos ensaios de K_La deste tópico foi do tipo coluna de bolhas, que compõe o sistema desenvolvido no próprio laboratório, formado por três colunas de vidro interconectadas e recheadas com anéis Pall de aço inoxidável de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro e altura. Assim como nos ensaios em reator airlift, o preenchimento do interior da coluna com esse tipo de recheio teve o objetivo de aumentar a transferência de massa da corrente gasosa para a fase líquida, promovendo maior turbulência no meio reacional e quebrando as bolhas gasosas que porventura pudessem coalescer e, com isso, reduzir a superfície de troca entre as fases. A eficiência dos recheios em aumentar o valor de K_La do sistema pôde ser observada ao se realizar ensaios para comparação entre as taxas de transferência das colunas com e sem o uso dos anéis Pall. Estes ensaios foram realizados em diferentes vazões, de forma a se observar a influência dos recheios em sistemas com diferentes níveis de turbulência.

A Figura 4.7 ilustra o reator tipo coluna de bolhas (RCB) e a Figura 4.8 os anéis Pall utilizados para seu preenchimento nos ensaios. Os ensaios para medição

de K_La foram realizados nas vazões de 2, 4, 6 e 8 L/min, com o intuito de verificar a influência da vazão e da turbulência do sistema na transferência de massa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os ensaios foram realizados utilizando a torre de controle e o eletrodo de OD do reator Airlift, da Electrolab, mostrado no tópico 4.5.1.

Figura 4.7: Foto do sistema montado para determinação do K_La nas colunas em série, com e sem o preenchimento com recheio.

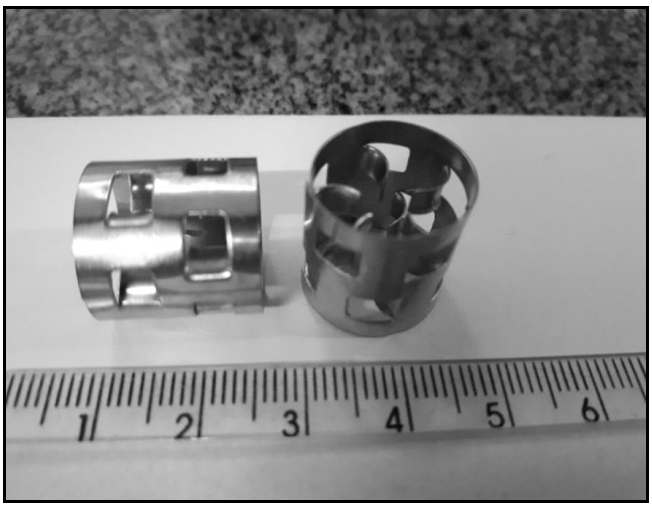

Figura 4.8: Anéis de Pall utilizados nos ensaios com o reator tipo coluna de bolhas em série. Diferente das utilizadas nos ensaios em reator airlift, cada peça possui aproximadamente 1,5 cm de diâmetro e altura.

4.5.3. Correlação dos valores do coeficiente de transferência de massa para oxigênio (K_La) e metano ($K_La_{(CH4)}$)

Os valores de $K_La_{(CH4)}$ foram estimados de acordo com as correlações propostas por Yu *et al* (2006), seguindo a estratégia descrita no item 2.6.2 e observando o uso de cada correlação segundo o tipo do biorreator. Essa análise se mostra interessante ao ponto que a solubilidade do metano é extremamente baixa e sensores para medida de sua concentração na fase líquida não são facilmente encontrados ou utilizados, com tempos de resposta excessivamente longos.

4.6. Ensaios em biorreatores

Após os experimentos em frascos agitados, foram realizados cultivos em biorreatores, com condições de processo controladas. O aumento da escala permitiu um acompanhamento mais detalhado e expressivo do comportamento do microorganismo em um cultivo com fornecimento contínuo ou intermitente da mistura de metano e ar comprimido. Os ensaios em biorreatores foram realizados após cada grupo de ensaios em frascos, o que gerou resultados em biorreator e em frasco para cada uma das etapas do projeto, com a mudança do meio e das condições do processo variando conforme os ensaios sugeriam.

4.6.1. Ensaios em biorreatores agitados mecanicamente (STR)

O biorreator BioFlo & Celligen 310, da New Brunswick, foi utilizado nos experimentos com agitação mecânica. Este equipamento possui controle automático de todas as condições do processo, como temperatura, pH, velocidade de agitação e vazão de alimentação de ar. Esses ensaios foram realizados visando avaliar uma possível melhora na transferência do substrato gasoso para a fase líquida e consequente aumento na velocidade de crescimento das células.

Foi utilizado um volume de inóculo correspondente a 10% (v/v) do volume final de meio de cultivo, tendo sido este cultivado em frascos de penicilina com meio NMS1306 modificado em *shaker* agitado, a temperatura de 30°C e agitação de 200 rpm. O inóculo foi concentrado em centrífuga para que a concentração inicial de

células fosse a suficiente para o cultivo em biorreator. O microrganismo utilizado nos ensaios foi *Methylocystis hirsuta.*

Para o primeiro ensaio foi utilizado um volume final de 800 mL, temperatura de 30°C, pH 7,0 e agitação de 400 rpm. Foram utilizadas soluções de NaOH (2M) e HCl (2M) para a manutenção do pH do meio. O meio utilizado foi o NMS1306 modificado com suplementação de 0,5 g/L de extrato de levedura e peptona. Para o segundo ensaio foram utilizadas as mesmas condições, variando o volume inicial de meio (1000 mL) e os suplementos adicionados, neste caso 2 g/L de extrato de levedura e 2 g/L de casaminoácidos. Os experimentos foram realizados com uma vazão da mistura gasosa de 4 L/min, e com proporção de 50% de metano e ar para o primeiro ensaio e de 30% de metano e 70% de ar para o segundo. A proporção da ar e metano sofreu alteração decorrente de resultados obtidos durante os ensaios. Para o ensaio com 1000 mL de meio um condensador mantido em 10°C, com o auxílio de um banho termostático modelo Haake, marca TriPoli Solutions, foi utilizado para evitar a perda de meio devido ao borbulhamento intenso, o que havia sido verificado durante o ensaio anterior.

No segundo ensaio foram realizadas alimentações no sistema de forma a repor as concentrações dos suplementos e avaliar o comportamento do microrganismo. As alimentações foram de 100 mL de meio com a concentração de suplementos necessária para que a concentração destes retornasse ao valor inicial, admitindo que eles tenham sido completamente consumidos pelas bactérias. Após a última alimentação interrompeu-se a alimentação com metano, de modo a testar o consumo das fontes provenientes do suplemento. A Figura 4.9 mostra o biorreator utilizado nestes ensaios.

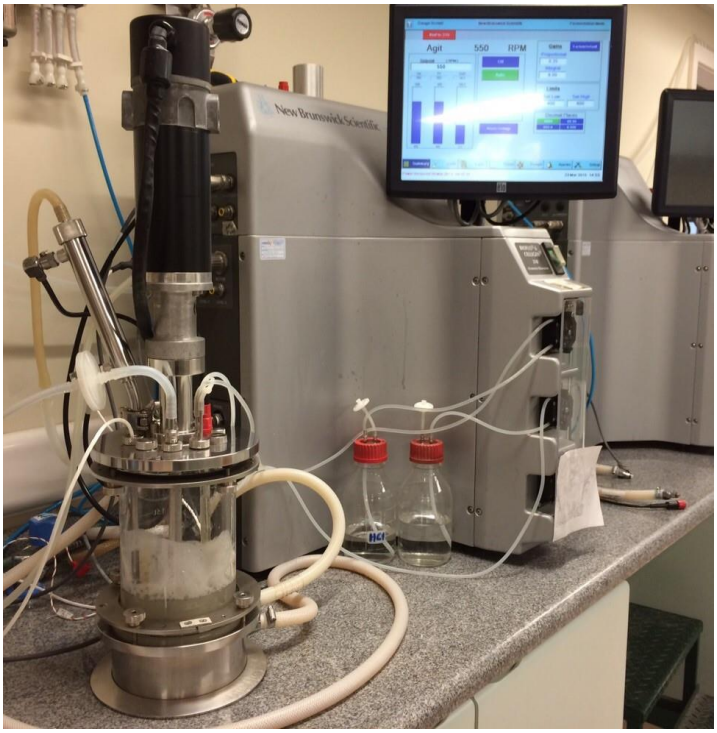

Figura 4.9: Biorreator BioFlo® da NewBrunswick utilizado nos experimentos com agitação mecânica.

4.6.2. Ensaios em biorreatores agitados mecanicamente (STR) com alimentação intermitente

O uso de substrato gasoso normalmente exige que a alimentação seja constante, o que faz com que boa parte do gás disponibilizado ao sistema seja perdida, tendo em vista a baixa solubilidade de metano e oxigênio na fase líquida. Sabendo que o custo do processo aumenta com o desperdício de matéria-prima, seria interessante, do ponto de vista econômico, realizar a fermentação com uma alimentação por pulsos, provocando uma pressurização do sistema e uma solubilização do gás presente no reator concomitantemente com a utilização do mesmo pelo microrganismo.

Os ensaios foram realizados em reator agitado mecanicamente, o mesmo utilizado nos experimentos anteriores, com alimentação por pulsos da corrente gasosa. A alimentação foi realizada por 5 minutos com a corrente de metano e oxigênio a uma vazão de 4 L/min e uma proporção de 30% de metano para 70% de ar comprimido. Após os 5 minutos, o reator foi fechado e a alimentação interrompida após 5 segundos, visando a pressurização parcial do vaso de reação. Não foi possível exercer uma pressão maior no sistema, pois o vaso reacional tinha paredes

de vidro, podendo se romper com uma pressão excessiva. A renovação da mistura gasosa no interior do reator foi realizada sempre após a retirada de amostra para acompanhamento da concentração celular.

Foram realizados ensaios com diferentes vazões e intervalos de alimentação, com intuito de encontrar uma condição ótima para utilização deste procedimento nas fermentações posteriores utilizando as bactérias metanotróficas. Os valores de temperatura, pH e agitação do meio foram mantidos em 30°C, 7,0 e 400 rpm, assim como nos ensaios anteriores em biorreator.

Após os ensaios iniciais, foi verificada a necessidade da circulação da atmosfera gasosa no reator, de modo a tentar aumentar a capacidade de transferência do sistema e melhorar os rendimentos em termos de crescimento celular. Para tal, foram realizados experimentos com uma bomba peristáltica fazendo essa circulação, sendo mantidas todas as outras características operacionais. Ainda, visando a maior solubilização dos gases na fase líquida, um ensaio foi realizado com Tween 80 misturado ao meio. A Figura 4.10 mostra um esquema desse ensaio.

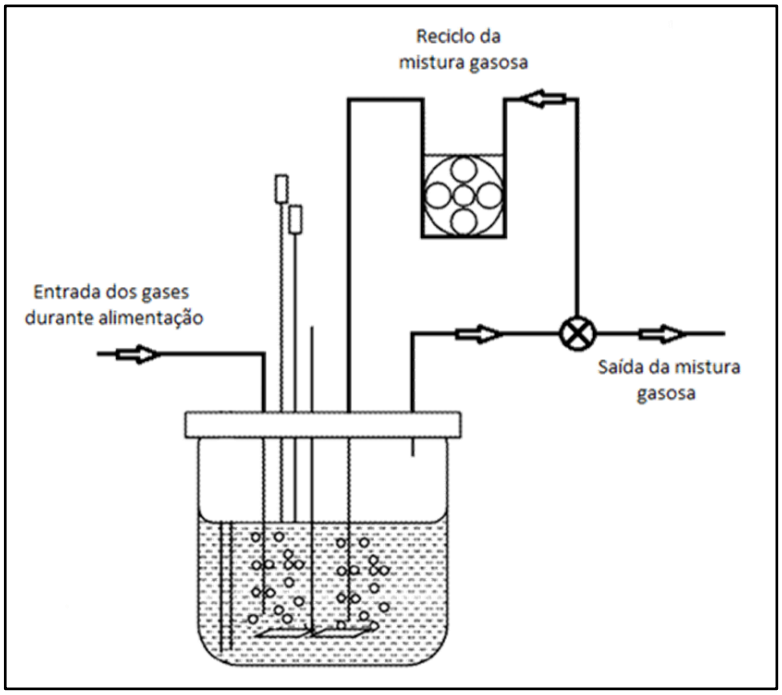

Figura 4.10: Esquematização do ensaio de crescimento celular em biorreator agitado mecanicamente com alimentação por pulsos e reciclo da corrente gasosa.

4.6.3. Ensaios em biorreatores tipo coluna de bolhas em série (RCB) preenchidas com recheios randômicos

Foram realizados experimentos com um sistema de reatores do tipo colunas de bolhas em série (RCB), desenvolvido no próprio LADEBIO, utilizando *M. hirsuta*. Este sistema foi idealizado de acordo com a necessidade de se ter uma alta capacidade de transferência de massa aliada ao melhor aproveitamento do volume de gás oferecido ao biorreator (por isso o sistema em série) e a uma economia de energia proporcionada pela agitação pneumática, e não mecânica, deste tipo de reator. O sistema foi preenchido internamente com recheios randômicos tipo anel Pall de 1,5 cm, visando aumentar tanto a superfície de contato entre os gases e a fase líquida quanto o tempo de residência das bolhas no meio, de forma a melhorar a eficiência da transferência de massa entre as fases. O sistema montado neste trabalho, permitindo uma eficiente troca de massa entre as fases e aumentando o tempo de residência do gás, reduz ainda a perda de substrato durante o processo.

No primeiro experimento com as colunas foi utilizado o meio NMS com suplementação de 0,5 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L de peptona. O inóculo foi de 10% (v/v) do volume final de meio, que foi de 3000 mL. A temperatura de 30°C foi mantida com o auxílio de um banho termostático, marca ethikTechnology, e a circulação do meio entre as colunas foi realizada por uma bomba peristáltica, modelo 323E, Watson Marlow. O pH inicial do meio foi 7,0, mas este parâmetro não foi acompanhado durante o processo. A injeção da mistura gasosa foi realizada a uma vazão de 4 L/min, com proporção de 30% de metano e 70% de ar, na região inferior da primeira coluna. Através das conexões, o gás passou pela primeira coluna, saiu pela região superior da mesma e entrou por baixo da segunda, o que ocorreu também da segunda para a terceira coluna. Nas colunas, líquido e gás ecoavam em contra-corrente, maximizando assim a transferência de massa entre as fases. Um esquema ilustrativo do sistema RCB está exposto na Figura 4.11 e uma foto das colunas durante um ensaio na Figura 4.12.

O segundo ensaio com colunas de bolhas repetiu as condições operacionais do primeiro, com alteração apenas na suplementação do meio de cultivo, que foi de 2 g/L de extrato de levedura e casaminoácidos. Assim como nos reatores agitados

mecanicamente, no segundo experimento foi utilizado um condensador mantido a 10°C para evitar perda de meio devido ao borbulhamento.

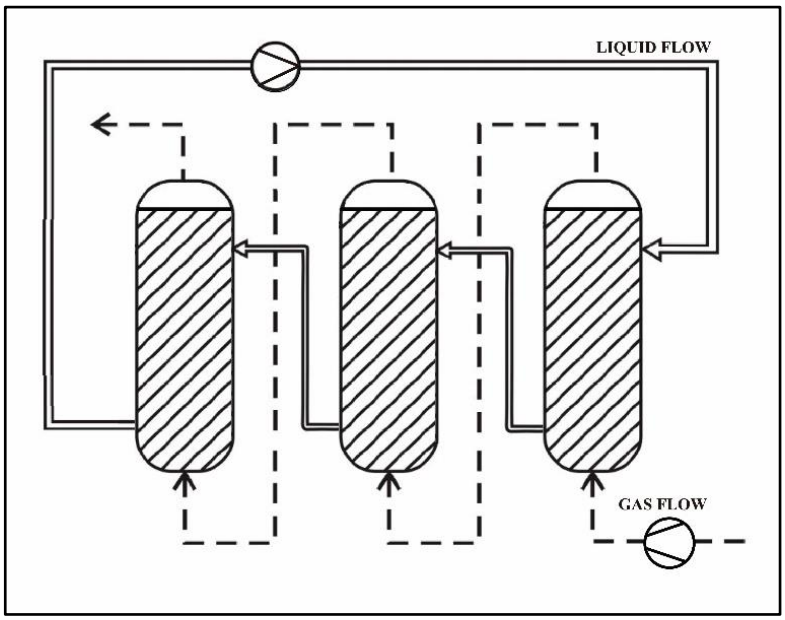

Figura 4.11: Esquema ilustrativo do funcionamento dos reatores tipo coluna de bolhas em série (RCB) com escoamento em contra-corrente. As linhas contínuas e pontilhadas representam, respectivamente, as correntes das fases líquida e gasosa.

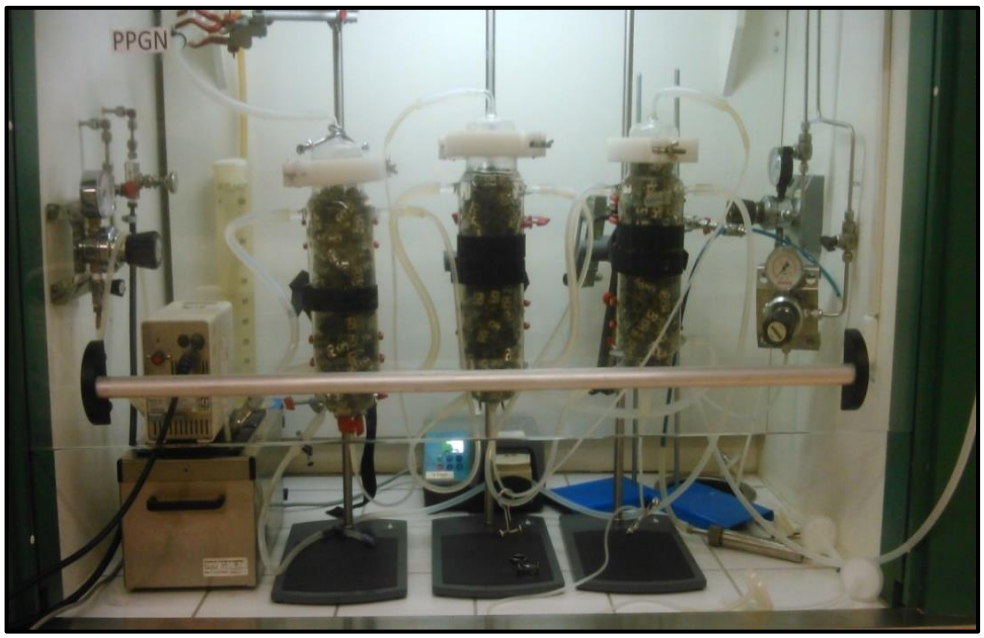

Figura 4.12: Foto do sistema de três colunas em série utilizado nos experimentos.

Em ambos os experimentos foram realizadas alimentações de meio ao sistema, tanto para manter o volume inicial do cultivo quanto para repor as

concentrações dos suplementos e avaliar o comportamento do microrganismo. Em um momento posterior, após a realização de novos ensaios em frascos agitados, cujos resultados serão analisados no próximo capítulo, foi observada a influência do uso de tensoativos durante a fermentação, com objetivo de melhorar a solubilização da fase gasosa no meio de cultivo. Dessa forma, foram realizados ensaios no sistema RCB utilizando óleo de soja 1% (v/v) e os suplementos extrato de levedura (2 g/L) e casaminoácidos (1,5 g/L). Estes ensaios foram realizados nas mesmas condições operacionais dos anteriores, com pH 7,0, temperatura de 30 ºC e vazão da mistura gasosa de 4 L/min com proporção de 30% metano e 70% de ar comprimido.

Para efeito de comparação da capacidade fermentativa do sistema RCB com e sem recheio e também com o meio NMS sem suplementação, foram realizados ainda um ensaio sem a presença dos anéis de Pall e outro sem suplementos, mantendo as condições operacionais já mencionadas anteriormente.

4.7. Ensaios para caracterização da biomassa bacteriana

A análise do conteúdo nutricional (proteínas, carboidratos, lipídios e cinzas) é uma primeira forma de mostrar a capacidade do preparado microbiano produzido neste trabalho em ser utilizado, ou não, como fonte de proteínas. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese (LEAF), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.7.1. Análise de proteínas totais

Para análise do conteúdo proteico da biomassa seca foi utilizado o método de Lowry *et al* (1951), modificado por Mota (2018). O método original visava mensurar a quantidade de proteínas solúveis contidas na amostra, enquanto que a modificação proposta por Mota permite a obtenção dos valores de proteínas totais. De acordo com Zaia *et al.* (1998), o princípio do método se baseia no reagente de Folin-Ciocalteau, uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, que sofre

redução ao reagir com proteínas na presença de um catalisador de cobre (II) e produz um composto com absorção máxima em 750 nm.

Autores que estudaram este método (Chou & Goldstein, 1960; Legler *et al.*, 1985) propuseram que essa redução ocorre diretamente nas cadeias laterais dos aminoácidos tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina, facilitada pelo catalisador de cobre (II). A principal vantagem do método de Lowry é a sua alta sensibilidade e, por isto, tem sido utilizado para a determinação da concentração de proteínas em diversos meios, mas apesar disso, ele possui certas desvantagens, como estar sujeito a interferentes, apresentar longo tempo de análise, possuir absortividade específica variável para diferentes proteínas, e seguir a Lei de Lambert-Beer em uma faixa pequena de concentração de proteínas (Zaia *et al.,* 1998).

O procedimento experimental consistiu da adição de 0,5 mL de água e 0,5 mL de solução de SDS (Dodecil sulfato de sódio) (1 g de SDS + 1,5 g de glicerol + 10 mL de água destilada) em 30 mg de biomassa seca em tubo tipo falcon de 15 mL. Foi adicionado ao tubo o volume de pérolas de vidro correspondente ao volume de biomassa, com o objetivo de, utilizando um vórtex, romper as membranas celulares e facilitar a “extração” das proteínas contidas no interior das células. Foi realizada a homogeneização do conteúdo do tubo por agitação em vórtex por 5 minutos e em seguida ele foi colocado em banho-maria (100°C / 5 minutos). Este procedimento foi realizado duas vezes em sequência para aumentar a sua eficiência e após alcançarem a temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas a 5500 rpm por 8 minutos. O sobrenadante proveniente desta etapa foi separado e foram retiradas alíquotas de 100 µL de cada amostra, para consequente diluição. A diluição realizada nesta etapa foi repetida até que as leituras estivessem dentro da faixa coberta pela curva do método.

Para a segunda etapa do procedimento, três soluções foram preparadas e elas estão descritas a seguir:

- Solução A: 2% $NaCO_3$ em solução 0,1N NaOH
- Solução B: Mistura das soluções B_1 e B_2 (1:1) no momento da análise
    - Solução B_1: 0,5% $CuSO_4 . 5 H_2O$
    - Solução B_2: 1% $C_4H_4KNaO_6 . 4 H_2O$
- Solução C: 50 volumes de A + 1 volume de B

Foram adicionados 5 mL da solução C a uma alíquota de 1 mL da amostra após diluição. Dez minutos depois da adição de C, as amostras reagidas foram novamente centrifugadas nas mesmas condições e transferidas para tubos de ensaio. A cada tubo foi adicionado 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteau diluído na hora em água na proporção de 1:2 (v/v). A reação ocorreu durante 35 minutos e em seguida foi feita a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 750 nm, com o teor de proteínas sendo determinado pela correlação com a curva de albumina de soro bovino como padrão.

4.7.2. Análise de carboidratos

O teor de carboidratos (CHO) foi analisado utilizando o método de Dubois *et al.* (1956), que consiste na reação de ácido fenol-sulfúrico e é usado para determinar quantidades de açúcares e substâncias relacionadas. Açúcares simples, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados adquirem uma coloração alaranjada quando tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado, o que permite que eles sejam quantificados por métodos colorimétricos, como a espectrofotometria. Para o presente trabalho foram realizadas pequenas modificações na etapa inicial do método, visando a liberação de todo o conteúdo de carboidratos presentes na amostra. Foram executadas as etapas a seguir:

1. Em um tubo falcon foram pesadas 4 mg de amostra e adicionados 2 mL de H_2SO_4 1M. Os tubos foram colocados em banho-maria (100°C) por 6 horas;
2. Após este período as amostras foram diluídas com 6 mL de água deionizada e centrifugadas a 5500 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi separado e mantido em geladeira até a próxima etapa;
3. Após atingir temperatura ambiente, 1 mL do sobrenadante foi colocado em um tubo de ensaio e diluído conforme necessidade, a depender da amostra;
4. Com auxílio de uma pipeta automática, 0,5 mL de fenol 3% foi adicionado ao tubo de ensaio, sendo despejado diretamente em cima da amostra, e agitado por 1 minuto em vórtex;

5. Acrescentou-se então 2,5 mL de H_2SO_4 concentrado diretamente sobre a amostra, mais uma vez com auxílio de uma pipeta automática, agitando por 2 minutos em vórtex;

6. Após 30 minutos para que se completasse a reação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 485 nm contra os brancos dos reagentes utilizando as mesmas manipulações a partir do passo 3, substituindo a amostra por água deionizada.

O cálculo da concentração de CHO foi realizado pela correlação com uma curva padrão de glicose.

4.7.3. Análise de lipídios

A extração da fração lipídica das amostras e a quantificação desta fração foi realizada utilizando o método de Folch *et al.* (1957), um método de extração com solventes orgânicos e determinação gravimétrica. A ampla faixa de polaridades dos lipídios e os diferentes tipos de ligações presentes nestas moléculas fazem com que a escolha do método e, consequentemente, do solvente a ser utilizado, seja uma tarefa difícil. Os solventes mais utilizados são o éter etílico, éter de petróleo e a solução clorofórmio-metanol, todos com capacidade de extrair triacilgliceróis. Porém, solventes mais polares, como a mistura de clorofórmio e metanol, também extraem lipídios polares como fosfolipídios, esteróis, terpenos, ceras, hidrocarbonetos e outros componentes não lipídicos (Aued-Pimentel & Zenebon, 2009). Os métodos que empregam essa mistura, como o de Bligh e Dyer (1959) e o de Folch *et al. (1957)* são reconhecidos como os mais adequados para a extração de todos os componentes lipídicos da amostra. Nestes métodos, as proporções entre os solventes de extração, massa da amostra e dos solventes, o modo de preparação da amostra, o tempo de agitação, o teor de gordura, água e o tipo de produtos, são fatores críticos, influenciando diretamente na eficiência de extração (AOAC, 2005; Antoniassi, 2000). Apesar de existirem métodos analíticos de extração de lipídios recomendados para certas classes de alimentos, estes estão em constante avaliação devido a grande variedade de produtos lançados no mercado, elaborados com novas tecnologias e contendo variados aditivos, o que certamente interfere na extração dos lipídios.

O procedimento experimental, baseado no trabalho de Folch *et al*. (1957), utilizado para as análises está descrito a seguir:

1. O ensaio foi iniciado com a adição de 5 mL de metanol a 100 mg de amostra seca, macerada em gral e pistilo, em tubo de ensaio grande. Após agitação em vórtex por 2 minutos, foram adicionados 10 mL de clorofórmio com mais 5 minutos de agitação em vórtex;
2. As amostras foram filtradas em papel de filtro e o resíduo foi lavado com solução de 5 mL de metanol e 10 mL de clorofórmio;
3. O filtrado foi recolhido em proveta graduada de 50 mL com tampa e o equivalente a ¼ do volume medido na proveta foi adicionado de KCl 0,88% (em água) e o sistema foi agitado manualmente para mistura completa. Após a separação das fases, foi desprezada por aspiração a fase superior;
4. Em seguida, o volume foi novamente medido e ¼ do que foi observado foi adicionado de solução de metanol:água (2:1). Mais uma vez, a fase superior foi removida por aspersão;
5. A fase inferior foi então filtrada, com papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro, e transferida para balão, onde foi evaporado todo o clorofórmio em evaporador rotativo a 40°C;
6. A fração lipídica foi ressuspendida em 1,5 mL de clorofórmio e depositada em suporte metálico previamente pesado. O clorofórmio foi evaporado em estufa e o teor de lipídios foi então calculado pela diferença das massas do suporte com e sem a amostra.

4.7.4. Análise de cinzas

A análise do teor de cinzas foi realizada seguindo metodologia utilizada no LEAF e também no LADEBIO, para caracterização de cinzas em biomassas lignocelulósicas, baseada em protocolos do NREL (National Renewable Energy Laboratory) (Sluiter *et al., 2008)*.

Suportes de alumínio foram aquecidos em estufa a 105°C por 1 hora e deixados resfriar em dessecador a vácuo, para posterior pesagem. As massas dos suportes secos e vazios foram guardadas para o cálculo da massa de cinzas ao final do procedimento. Em cada suporte foram pesados 30 mg da biomassa seca e

macerada. As amostras foram incineradas em mufla a 450°C por 4 horas, sendo em seguida resfriadas em dessecador a vácuo e pesadas. A massa foi anotada e as amostras foram recolocadas por 1 hora na mufla a 450°C, resfriadas e pesadas. O procedimento foi repetido até que se obtivesse pesos constantes. A massa de cinzas será a diferença entre a massa pesada ao final do método e a massa do suporte seco e vazio.

Capítulo 5

Resultados e Discussão

5.1. Ensaios em frascos agitados

5.1.1. Otimização das concentrações dos componentes do meio

O meio de cultivo é um fator muito importante para avaliar a viabilidade industrial de um processo. Por esse motivo, busca-se pela otimização de sua composição a fim de se atingirem as concentrações ideais de seus componentes, de forma que o meio de cultivo seja capaz de sustentar o crescimento do microrganismo, com o menor custo possível. Os ensaios realizados com modificações na composição inicial do meio NMS1306 têm os seus resultados apresentados na Tabela 5.1.

É possível observar que a variação nas concentrações dos componentes iniciais do meio não resultaram em um crescimento mais acelerado de *M. hirsuta.* A solução quelante de ferro não mostrou nenhum tipo de melhoria no crescimento bacteriano, o que corrobora as análises realizadas em experimentos preliminares de que esta solução não é necessária para o propósito do projeto, podendo ser removida. Vale ressaltar que a solução não estava presente nos meios encontrados na literatura e sua composição era complexa, onerando o meio de cultivo, com sua utilização devida exclusivamente à indicação da ATCC para o NMS1306. A presença de cobre também não mostrou vantagem no crescimento de *M. hirsuta* nessas condições, porém ela foi mantida devido à sua baixa concentração e a sinalização

da literatura à dependência de uma enzima-chave para o metabolismo de metanotróficas, a metano-monooxigenase, por este importante cátion. A concentração dos outros componentes do meio foi mantida de acordo com o proposto pela ATCC, caso do tampão de fosfato e do nitrato de potássio.

Tabela 5.1: Valores de crescimento de *M. hirsuta* com **variações na composição do meio de cultivo**. Proporção de metano e ar de 50%.

Componentes modificados ou adicionados*	**Concentração celular (g/L)**
Controle	0,51 ± 0,02
Nitrato de Potássio 1,5x	0,45 ± 0,02
Nitrato de Potássio 2x	0,45 ± 0,05
Ureia + Nitrato 1x	0,30 ± 0,01
Ureia + Nitrato 1,5x	0,20 ± 0,01
Ureia + Nitrato 2x	0,28 ± 0,01
Ureia 1x	0,32 ± 0,01
Ureia 1,5x	0,24 ± 0,03
Ureia 2x	0,25 ± 0,03
Tampão de Fosfato 1,5x	0,48 ± 0,02
Tampão de Fosfato 2x	0,51 ± 0,08
Solução de Cobre**	0,51 ± 0,03
Solução Quelante de Ferro**	0,53 ± 0,03

* As concentrações dos componentes são relativas às concentrações iniciais previstas para o meio NMS 1306 e expostas na Tabela 4.1.

**Ensaios com a adiçao destas soluções.

Outro aspecto analisado neste ensaio foi o uso de ureia na formulação do meio de cultivo. Utilizado em diversos meios por sua assimilação mais fácil e por seu consumo gerar uma fonte prontamente assimilável, a ureia se mostrou, ao contrário do que se esperava, prejudicial ao crescimento da bactéria. Observando as curvas de crescimento é possível verificar que todos os meios contendo ureia tiveram uma inibição do crescimento a partir de 100 horas de cultivo, apesar de, no início do experimento, apresentarem um crescimento mais acelerado quando comparados aos meios sem ureia. A interrupção do crescimento mesmo nos frascos contendo nitrato além de ureia pode indicar que a causa não foi indisponibilidade de nitrogênio, mas sim a presença de algum composto inibitório à célula, seja a própria ureia ou algum outro produzido durante o cultivo. De acordo com Stein & Klotz (2011) e Hu & Lu (2015), existem espécies de metanotróficas (especialmente as do

Tipo II, como *M. hirsuta*) que não possuem as enzimas necessárias à assimilação de ureia e outras fontes amoniacais. Essas fontes inicialmente causam uma inibição competitiva pela enzima metano monooxigenase, prejudicando assim a oxidação do metano a metanol, e aumentam a toxicidade do meio de cultivo pela formação de hidroxilamina, que se acumula devido à ausência das enzimas necessárias para sua oxidação (hidroxilamina oxidoredutase).

5.1.2. Ensaios preliminares com suplementação do meio e outras fontes de nitrogênio

Foi novamente investigado o efeito da ureia, que se mostrou prejudicial, com os resultados da curva de crescimento inferiores àqueles do controle, como pode ser visto na Figura 5.1. Pela primeira vez, foram avaliados suplementos para o meio de cultivo. O uso de extrato de levedura e peptona (fontes de nitrogênio, vitaminas, cofatores, entre outros) apresentou um efeito positivo no crescimento, sendo alcançada uma concentração final de células aproximadamente três vezes maior que a do controle. Foram utilizadas concentrações baixas desses compostos apenas para se avaliar a capacidade da célula, que é metanotrófica obrigatória, de utilizar essas fontes de nutrientes para acelerar o seu crescimento. O fato de o meio mineral ser pobre em nutrientes é um aspecto importante do cultivo e que deve ser levado em consideração, na medida em que o produto do desenvolvimento desta tese é a biomassa bacteriana; por esse motivo, a suplementação do meio foi melhor explorada, como será descrito no decorrer da discussão dos resultados.

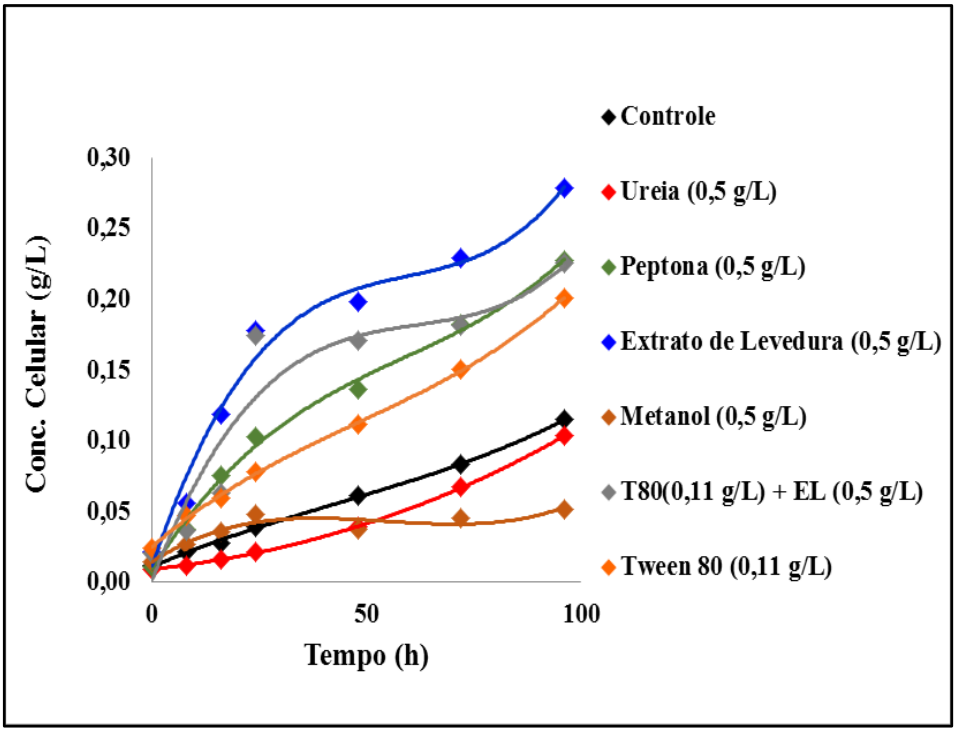

Figura 5.1: Cinética de crescimento de *M. hirsuta.* **Ensaios iniciais com diferentes fontes de nitrogênio, suplementos e surfactante Tween 80 (T80)**. Proporção de metano e ar de 50%.

A adição de metanol no meio de cultivo correspondeu a uma tentativa de acelerar o crescimento fornecendo uma molécula que participa da rota metabólica da bactéria em uma etapa posterior à assimilação do metano, conforme ilustrado na Figura 2.3. A oxidação do metano a metanol se dá pela ação da enzima metano monooxigenase (MMO), como já mencionado, e o metanol produzido segue na via até ser convertido a formaldeído pela metanol desidrogenase. Estudos anteriores, como o de Kalyuzhnaya *et al* (2015) sugerem que em algumas espécies de metanotróficas a enzima responsável pela oxidação do metanol, a metanol desidrogenase, interage diretamente com a MMO, de modo que ela somente atue caso a MMO também esteja ativa, impedindo o consumo direto do metanol como fonte de carbono. Esta hipótese talvez justifique a taxa de crescimento inferior do meio com metanol em relação ao controle, pois, uma vez que não houve consumo do metanol, e o mesmo foi disponibilizado para a célula, pode ter se tornado tóxico e prejudicado o crescimento celular. Bactérias metilotróficas são capazes de consumir metanol como fonte de carbono, utilizando concentrações de substrato superiores a 5 g/L (Simões, 2015), o que foi utilizado como base para a não utilização de valores muito elevados deste substrato.

Por último, o Tween 80 (T80), um surfactante, foi empregado com o intuito de elevar as taxas de transferência do substrato gasoso e do oxigênio para a fase líquida. Este primeiro resultado com o surfactante mostrou um efeito positivo, apresentando resultados da curva de crescimento superiores aos do controle, o que sinaliza uma possível eficiência do T80 nesta tarefa, sendo capaz de disponibilizar mais metano dissolvido no meio para o consumo do microrganismo. No frasco contendo o surfactante e extrato de levedura, o crescimento foi inferior ao observado no meio com extrato sem T80, indicando haver certa interferência entre os efeitos dos dois componentes. Como eles apresentam modos de ação distintos, um deles tem a função de aumentar a disponibilidade de metano e o outro tem a função de fornecer nutrientes e tornar o meio de mais rápida assimilação para o microrganismo, torna-se uma difícil tarefa interpretar estes efeitos sem experimentos adicionais. Um dos fatores que talvez tenha provocado o crescimento reduzido na presença de T80 diz respeito ao maior consumo do metano em detrimento do consumo de alguma outra fonte de carbono presente no extrato de levedura. Por ser o metano uma fonte de carbono única a ser convertida em biomassa, espera-se, naturalmente, um crescimento mais lento, em virtude de um saldo energético muito inferior aquele gerado pelo consumo de glicose, por exemplo. Ensaios com as outras fontes de carbono foram realizados para se entender melhor os efeitos dos suplementos e estipular as concentrações ideais destes no meio.

O uso destes suplementos, bem como do surfactante, teve um impacto visível na densidade celular ao final do tempo de cultivo. Apesar de não ser possível analisar estatisticamente esse experimento por ele ser bastante preliminar e contar apenas com uma concentração de cada componente, ele foi o primeiro a mostrar que a suplementação do meio de cultivo seria uma forma de contornar as baixas taxas de crescimento dos microrganismos metanotróficos, ainda mais com um meio de cultivo estritamente mineral. É importante deixar claro que a suplementação não atua necessariamente como fonte de carbono, podendo estar provendo o meio com outros nutrientes (fontes de nitrogênio, vitaminas, etc.) que facilitem o desenvolvimento do microrganismo, sem fazer com que a bactéria metanotrófica, normalmente incapaz de consumir substratos com ligação carbono-carbono, modifique seu metabolismo.

5.1.3. Ensaio com diferentes proporções de alimentação de metano e ar

Os experimentos com diferentes proporções de metano e ar e emprego de CO_2 (Sheehan e Johnson, 1971) apresentaram resultados pouco expressivos. Dos valores de concentração celular para o crescimento com a mistura de 30% de metano e 70% de ar, 50% de cada gás e com a presença de CO_2 é possível concluir que a variação da concentração do substrato na mistura gasosa não influenciou o crescimento bacteriano. O uso de uma proporção maior de metano, visando uma maior disponibilidade do mesmo para o consumo do microrganismo, não foi uma estratégia eficiente, indicando que é possível utilizar razões menores e, reduzir assim o gasto com o substrato, mantendo a taxa de crescimento.

Em algumas situações, o metano, por ser um hidrocarboneto, pode apresentar caráter tóxico até mesmo para as bactérias capazes de consumi-lo. Isso faz com que altas taxas de fornecimento de substrato possam se tornar prejudiciais à célula, requerendo uma alimentação bem controlada e com proporções bem definidas, de forma a evitar uma inibição do crescimento. Portanto, a proporção de 50% pode ter causado danos às células ou feito com que a concentração de metano atingisse seu valor limite para as condições de processo, o que também justificaria as curvas obtidas.

Tabela 5.2: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* para **diferentes proporções de metano e ar**.

Proporção da mistura gasosa	Concentração celular (g/L)
50% CH_4 + 50% ar	0,25 ± 0,05
30% CH_4 + 70% ar	0,26 ± 0,03
35% CH_4 + 65% ar + 5% CO_2	0,27 ± 0,04

O aumento do uso de CO_2 também não trouxe nenhum efeito positivo no crescimento. A função de fonte de carbono no metabolismo das bases nitrogenadas proposta por Sheehan & Johnson (1971), testada nas mesmas condições de proporção de alimentação que as descritas por ele, não foi evidenciada, conforme visualizado na Tabela 5.2.

Esses resultados indicam que deve ser empregada a proporção de 30% de metano, tendo em vista o custo deste gás quando comparado ao do ar comprimido. Para os ensaios em frasco agitado os custos não sofrem muita alteração, mas se

forem realizados cálculos rápidos para o uso de biorreatores agitados, mesmo que com volume de 1 litro, o custo se reduz de forma significativa. A uma vazão de 4 L/min, uma fermentação com duração de 72 horas teria economia de 72 litros de metano, o que transferido para largas escalas, em biorreatores industriais, pode ser a diferença entre a viabilidade econômica ou não do processo.

5.1.4. Uso de fontes alternativas de carbono

Apesar de ser classificada como metanotrófica obrigatória (Methanotroph Commons, 2016), *M. hirsuta* apresentou taxas de crescimento elevadas quando o meio mineral foi suplementado com extrato de levedura e peptona, o que levantou a hipótese de assimilação de outra fonte de carbono presente nos suplementos. Como o extrato de levedura é composto por leveduras autolisadas e secas, a presença de carbono em outras formas, apesar de reduzida, não pode ser ignorada. Vale ressaltar que não houve alimentação do meio com metano, de forma que a única fonte de carbono presente em cada erlenmeyer consistia naquela que estava sendo investigada.

Foi constatado que não houve crescimento em nenhuma fonte de carbono testada, como exibido na Figura 5.2. A capacidade de romper ligações carbono-carbono, tida como inexistente nas metanotróficas obrigatórias e essencial para o uso destas fontes mais complexas, não foi comprovada. Foram ensaiados diversos tipos de moléculas, desde os substratos mais comuns para fermentações, os carboidratos, até hidrocarbonetos de cadeia mais longa, sem nenhuma reação do microrganismo. Durante todos os ensaios não pode ser observado crescimento algum de *M. hirsuta* e o experimento foi repetido 2 vezes para comprovar a incapacidade do microrganismo de reagir à presença de substratos de cadeia mais longa e ligações entre átomos de carbono.

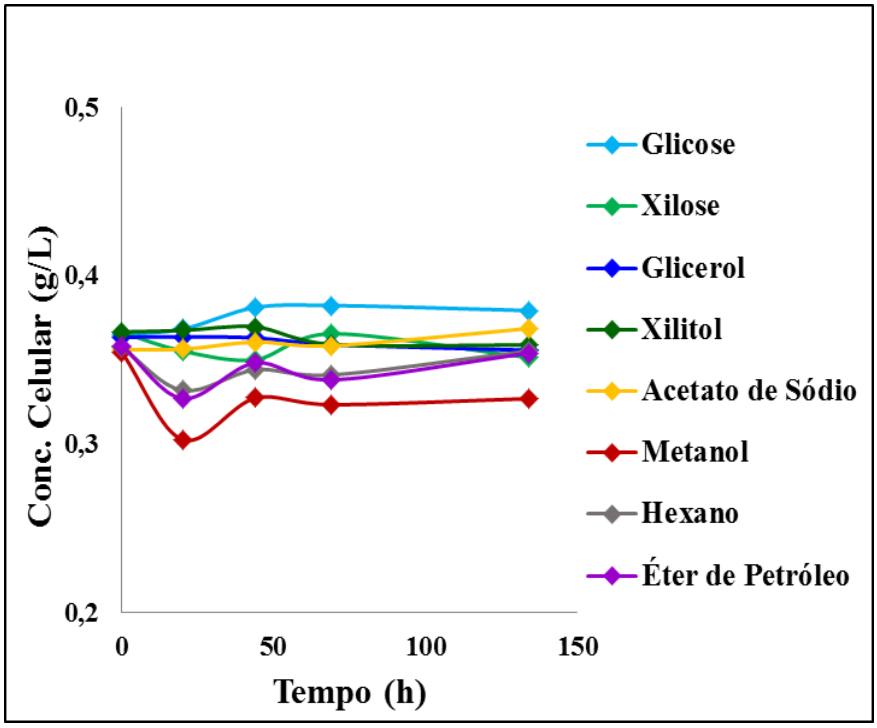

Figura 5.2: Avaliação de **diferentes fontes de carbono** sobre o crescimento de *M. hirsuta*. Experimento sem alimentação com metano.

5.1.5. Combinação de suplementos no meio de cultivo

Conforme verificado nos ensaios da seção 5.1.2, o uso de suplementos no meio de cultivo aumentou tanto a velocidade de crescimento quanto a concentração celular final de *M. hirsuta.* Neste grupo de ensaios, foram investigadas diferentes concentrações e tipos de suplementos para o meio NMS1306, e os resultados estão expostos nas Figuras 5.3 a 5.5.

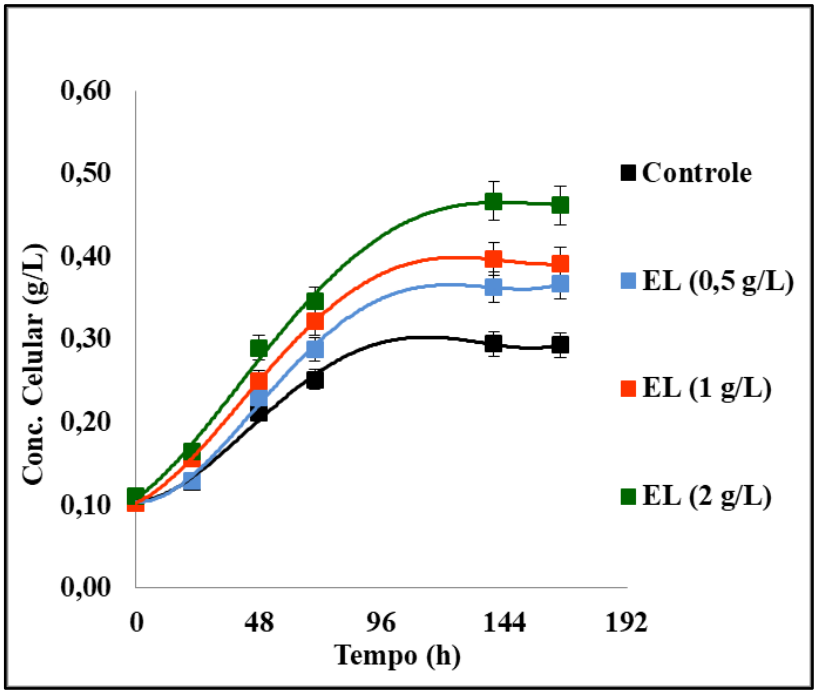

Figura 5.3: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* com **variações na concenração de extrato de levedura (EL)** no meio NSM1306. Proporção de 30% metano e 70% de ar.

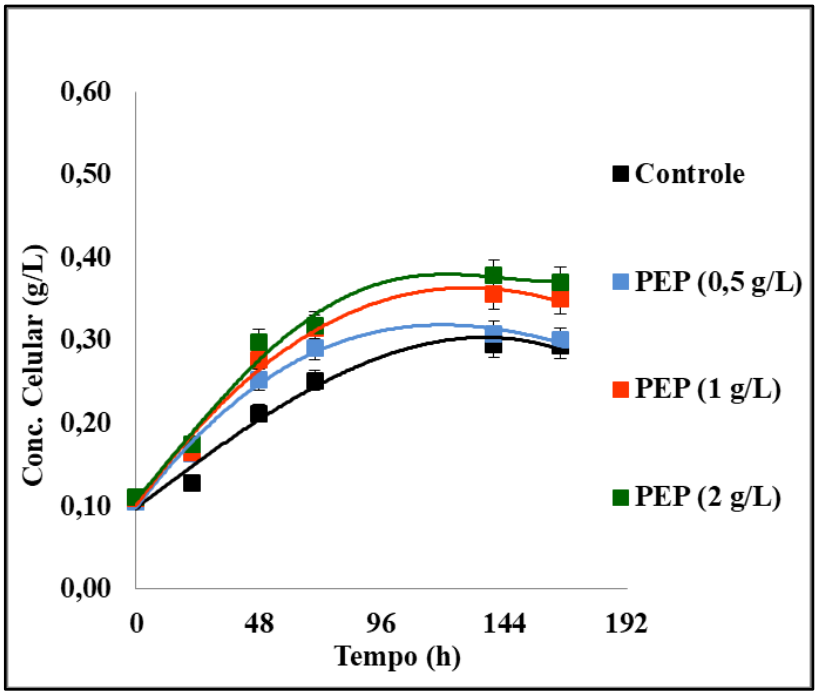

Figura 5.4: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* com **variações na concentração de peptona (PEP)** no meio NMS1306. Proporção de 30% metano e 70% de ar.

Nos experimentos anteriores o extrato de levedura e a peptona se mostraram promissores como fontes auxiliares de nitrogênio, vitaminas e outras moléculas, e tal como antes, o extrato exerceu um efeito maior sobre o cultivo do que a peptona. O

casaminoácidos, utilizado pela primeira vez, causou o mesmo efeito, apresentando vantagens em relação à peptona e valores semelhantes aos obtidos com o uso do extrato de levedura, conforme visto na Figura 5.5.

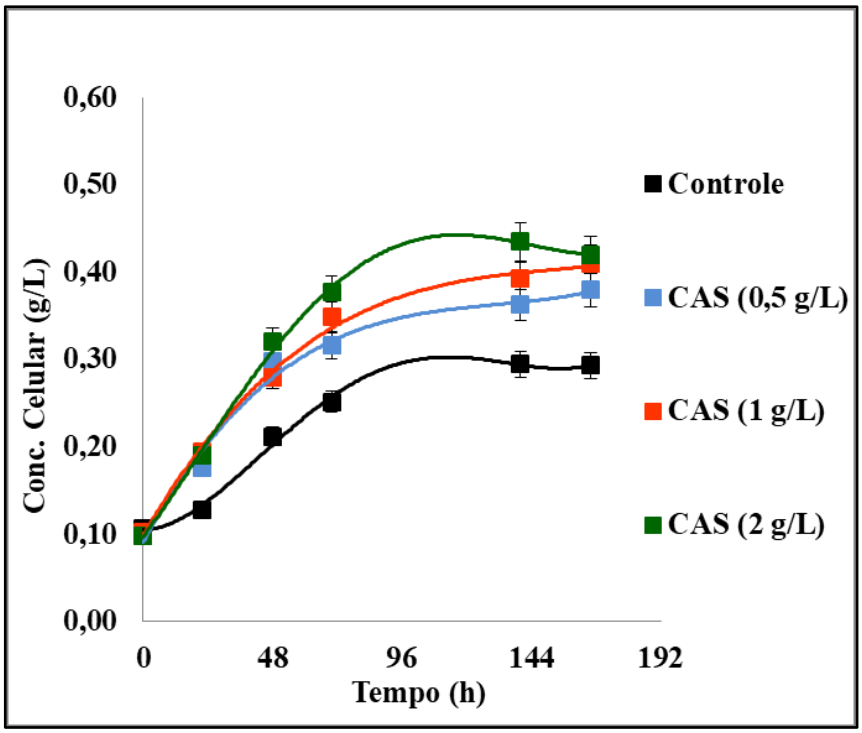

Figura 5.5: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* com **variações na concentração de casaminácidos (CAS)** no meio NMS1306. Proporção de 30% metano e 70% de ar.

A peptona serve basicamente como fonte de nitrogênio para o microrganismo, ao passo que o extrato de levedura e o casaminoácidos fornecem uma suplementação mais completa. Os casaminoácidos possuem uma variedade de moléculas essenciais, com exceção de alguns aminoácidos e vitaminas, que podem ser digeridos durante a hidrólise com ácido clorídrico pela qual passa a caseína durante sua produção (BD, 2016; USBIO, 2016). Já o extrato de levedura, por se tratar de células autolisadas, carrega consigo todas as moléculas presentes nas organelas e no citossol destas leveduras, conforme descrito pela fabricante do produto (BD, 2016), fornecendo uma vasta gama de componentes importantes para o metabolismo.

Para todos os suplementos foi observado que o aumento da carga inicial promoveu um maior crescimento celular. Os valores máximos obtidos em massa seca foram para 2 g/L dos compostos, o que sugere o uso dessa concentração em experimentos futuros, bem como um possível incremento deste valor a depender de

novos ensaios. Deve ser investigado se um conteúdo elevado de suplementos causa algum dano irreversível ao microrganismo, como uma possível adaptação ao novo "substrato", gerando uma incapacidade de utilizar o metano após o consumo de todo o suplemento. É importante observar ainda os níveis de suplementação levando em consideração a economicidade do processo, já que o produto de interesse não possui alto valor agregado e a adição dos suplementos pode onerar em excesso os gastos com o cultivo.

Antevendo o efeito positivo dos suplementos e com intuito de investigar as interações entre eles, foram realizados ensaios também com a mistura de extrato de levedura com peptona e com casaminoácidos, cujos resultados são apresentados nas figuras 5.6 e 5.7.

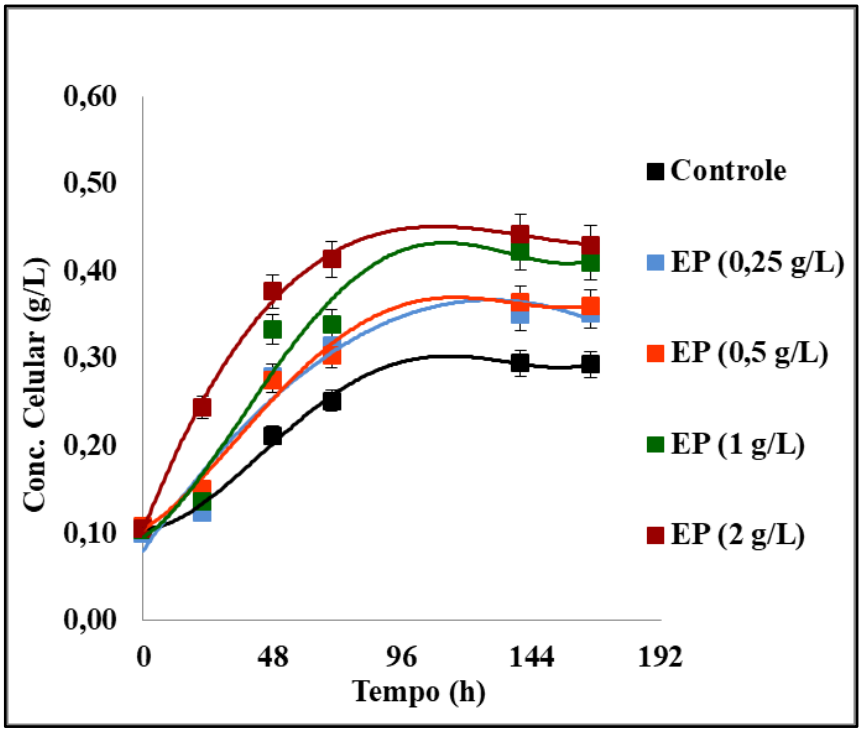

Figura 5.6: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* com **variações na concentração da mistura extrato de levedura + peptona (EP)** no meio NMS1306. Proporção de 30% metano e 70% de ar.

A maior concentração celular obtida, de 0,46 g/L com extrato de levedura (2 g/L), não foi melhorada com a mistura de extrato e peptona (2 g/L cada), que alcançou apenas 0,42 g/L como melhor resultado, variação essa que não é significativa se levados em consideração os desvios padrão associados aos experimentos. O uso das duas fontes, apesar de onerar o processo, forneceria uma

diversidade maior de biomoléculas ao meio mineral, o que é interessante principalmente para cultivos mais densos, tais como aqueles realizados em biorreatores, nos quais os componentes do meio apresentam uma tendência maior a se esgotar.

Já o emprego da mistura de extrato de levedura com casaminoácidos exerceu efeito extremamente positivo sobre o crescimento celular, apresentando aumento da concentração de células na medida em que a concentração da mistura era elevada. O valor final de concentração para 2 g/L de cada componente da mistura foi de 0,75 g/L de massa seca, o maior obtido até então para os experimentos em frasco. Os valores obtidos para cada concentração de mistura podem ser observados na Figura 5.7.

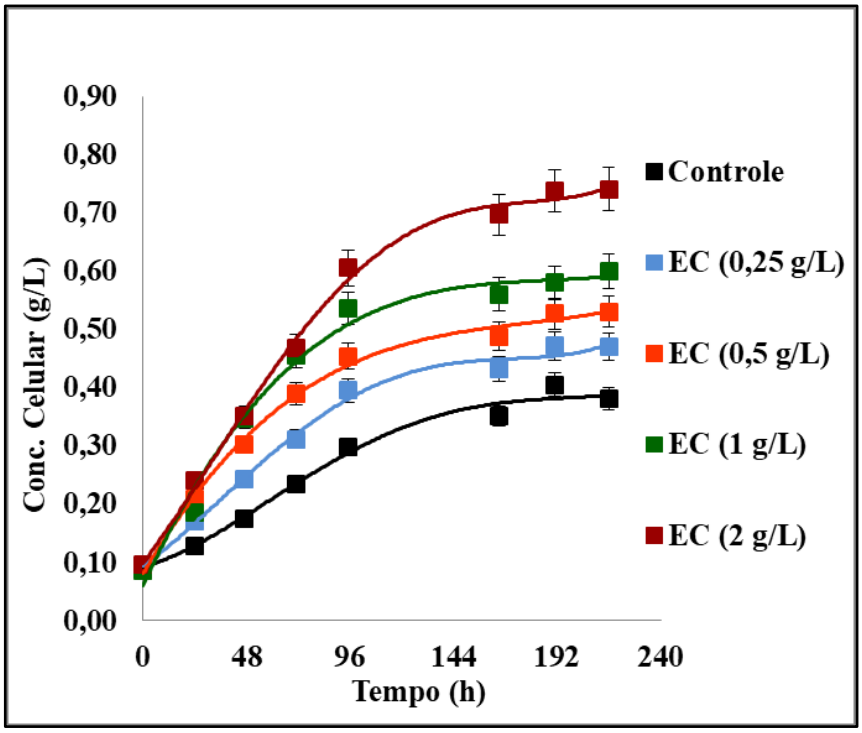

Figura 5.7: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* em meio com **diferentes concentrações de extrato de levedura + casaminoácidos (EC)**. Proporção de 30% de metano e 70% de ar.

Como suposto inicialmente, utilizando como base os valores de concentração celular obtidos com os suplementos de forma isolada, o uso da mistura extrato de levedura + casaminoácidos apresentou os melhores resultados de concentração obtidos em frascos agitados até o presente momento. Como visto anteriormente, o uso da mistura extrato + peptona gerou uma concentração final de células

semelhante a do uso do extrato de levedura puro em uma mesma concentração, e os experimentos com a peptona pura não apresentaram valores tão altos quanto os dos outros suplementos.

5.1.6. Uso de perfluorocarbono e óleo vegetal

Os ensaios desta seção tiveram o objetivo de verificar a capacidade de um perfluorocarbono (PFC) e de um óleo vegetal de aumentar as taxas de transferência de massa do metano e do oxigênio para a fase líquida. Trabalhos anteriores com essas substâncias, como o de Amaral (2007), indicaram relativa eficiência nessa função, apesar de uma proporção alta de PFC no meio reacional (até 20%). O PFC escolhido, perfluoroctano, é uma molécula com oito átomos de carbono e átomos de flúor substituindo todos os átomos de hidrogênio, e possui ainda altas viscosidade e massa molar. Já o óleo utilizado foi o de soja, um óleo vegetal de baixo custo e alto volume de produção no Brasil, cuja incorporação ao meio seria ao mesmo tempo de baixo impacto econômico e com praticamente nenhum efeito nocivo no que diz respeito à utilização do mesmo como fonte de proteínas tanto para animais quanto para humanos. A Figura 5.8 apresenta os resultados para os ensaios com perfluoroctano (PFC) em diferentes concentrações e com adição de mistura de suplementos.

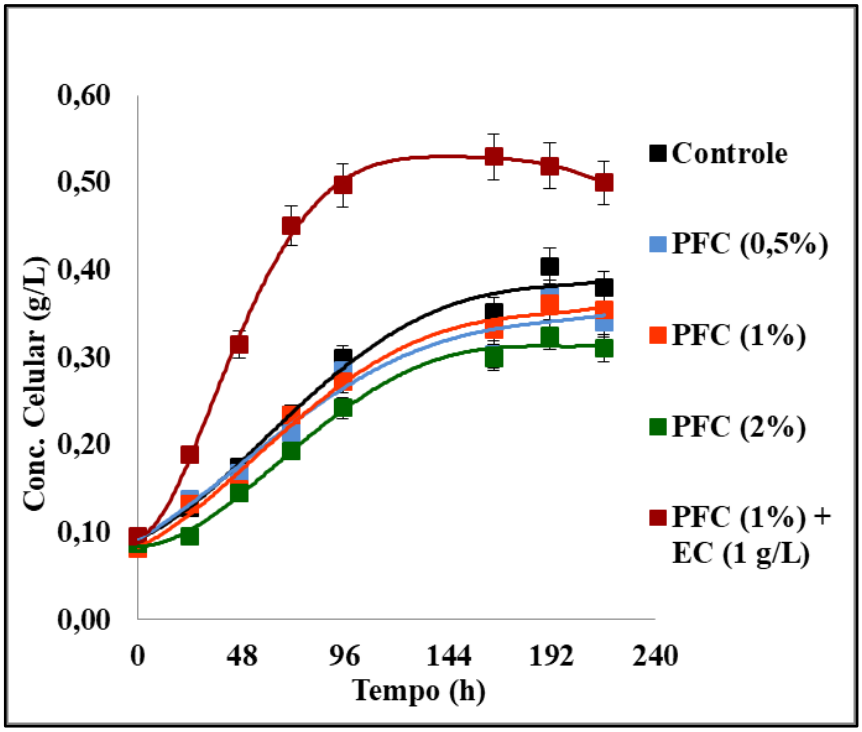

Figura 5.8: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* com **adição de PFC e extrato de levedura + casamino (EC)** ao meio de cultivo. Proporção de 30% de metano e 70% de ar.

O acréscimo de PFC isoladamente ao meio de cultivo se mostrou prejudicial ao crescimento. No frasco de controle, as células cresceram mais do que nos frascos com o surfactante. As concentrações de PFC utilizadas foram baixas, e o menor crescimento ocorreu quando empregados 2% da substância no meio (v/v), confirmando o efeito negativo do aditivo e desestimulando um aumento dessa concentração. A capacidade de promover uma troca mais eficiente entre a fase gasosa e o meio não aumentou a assimilação do substrato, o que de certa forma não interferiu no crescimento do microrganismo quando na presença dos suplementos no meio, pois a curva de PFC com extrato de levedura e casaminoácidos (PFC + EC) apresentou as maiores concentrações celulares dos ensaios nesta série de experimentos, chegando a 0,53 g/L. O enriquecimento do cultivo com os suplementos pode ter diluído o efeito tóxico do PFC, diminuindo assim o impacto negativo no crescimento celular. Para a mesma concentração da mistura em um cultivo sem PFC foi observado o valor de 0,6 g/L de células, evidenciando uma interferência negativa, mesmo que mascarada pelo valor superior ao controle neste ensaio.

A Figura 5.9 ilustra o crescimento da bactéria quando adicionado óleo vegetal ao meio NMS1306. Diferente do PFC, todas as concentrações testadas tiveram efeito positivo. O óleo, que tem característica apolar, é capaz de facilitar a transferência do metano para a fase líquida, e em contato com o meio de cultivo facilita a absorção do gás pelas bactérias. Foram alcançadas concentrações celulares de 0,66 g/L, valores superiores aos obtidos para as mesmas condições com o uso apenas de extrato de levedura e casaminoácidos após 96 horas de processo.

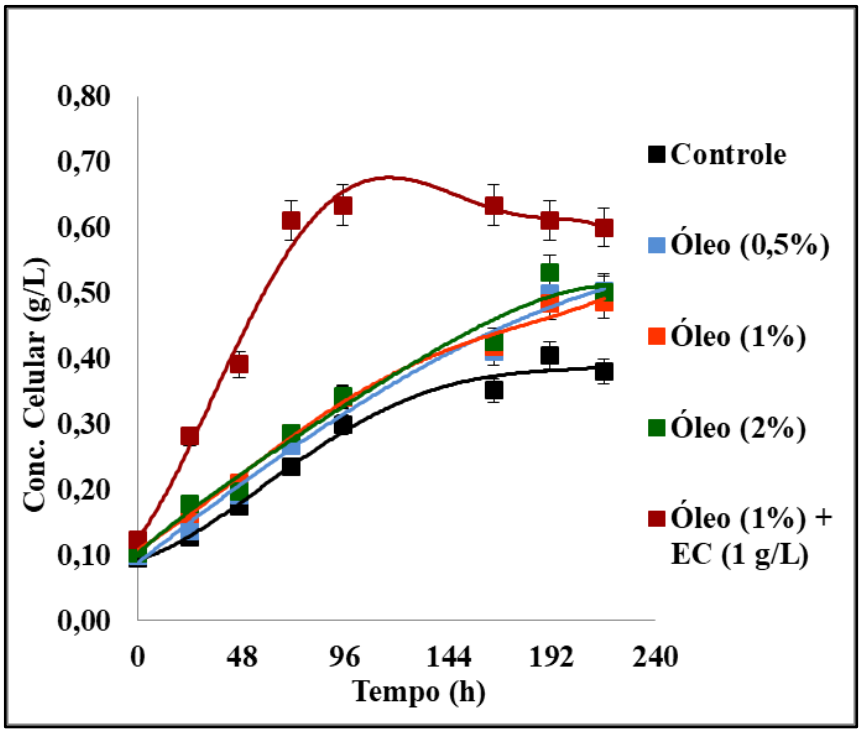

Figura 5.9: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* com **acréscimo de óleo vegetal e extrato de levedura + casaminoácidos (EC)** ao meio de cultivo. Proporção de 30% de metano e 70% de ar.

O uso do óleo com outras concentrações de suplementos, bem como a operação em reatores, nos quais seu efeito deve ser ainda mais significativo devido à maior capacidade de agitação e consequente melhor homogeneização do mesmo no meio de cultivo, será avaliado na continuação da tese.

O efeito da mistura no crescimento foi notavelmente positivo mais uma vez, enquanto que o uso do PFC gerou um efeito negativo, como observado na queda dos valores de concentração celular. Um aspecto interessante sobre o uso do óleo, que será abordado novamente no tópico seguinte, é a possível interação entre o

óleo e as células, com o tensoativo adquirindo uma coloração diferente durante o decorrer do processo, como se as células ficassem retidas nele, o que não foi observado com o PFC e nem com o Tween 80 utilizado anteriormente.

O uso do Tween 80 não foi continuado porque, quando observada a interação positiva do óleo de soja com o crescimento do microrganismo, se optou por utilizar este composto, que apresenta custos muito inferiores e tem sua produção em larga escala já consolidada, estando associado à indústria de alimentos em todo o mundo.

5.1.7. Planejamento Experimental com variação das proporções de suplementos e óleo vegetal

A Tabela 5.3 apresenta os valores finais de concentração celular para cada ensaio do planejamento experimental.

Tabela 5.3: Concentração celular final obtida no planejamento experimental DCCR com *M. hirsuta* em NMS 1306 modificado variando as concentrações de extrato de levedura (EL), casaminoácidos (CAS) e óleo de soja (Óleo).

EL (g/L)	CAS (g/L)	Óleo (% v/v)	Conc. Celular (g/L)
1,00	1,00	1,00	**0,87**
1,00	1,00	2,00	**0,83**
1,00	2,00	1,00	**0,87**
1,00	2,00	2,00	**0,86**
2,00	1,00	1,00	**0,88**
2,00	1,00	2,00	**0,77**
2,00	2,00	1,00	**0,92**
2,00	2,00	2,00	**0,80**
0,66	1,50	1,50	**0,79**
2,34	1,50	1,50	**1,03**
1,50	0,66	1,50	**0,90**
1,50	2,34	1,50	**0,87**
1,50	1,50	0,66	**0,86**
1,50	1,50	2,34	**0,70**
1,50	1,50	1,50	**0,81**
1,50	1,50	1,50	**0,79**
1,50	1,50	1,50	**0,79**

A utilização de frascos agitados, com volume reduzido e sistema de vedação, foi muito eficiente para ativação e crescimento de *M. hirsuta,* sendo possível avaliar o efeito de suplementos, tensotativos e outras moléculas adicionadas ao meio nos valores finais de concentração celular. Porém, no momento de realizar um planejamento experimental de modo a se obter um meio otimizado e com as concentrações ideais de cada suplemento e de óleo vegetal, os frascos se mostraram um sistema incapaz de prover as condições necessárias para um crescimento livre e dependente apenas do meio de cultivo. O planejamento DCCR utilizado neste tópico foi realizado diversas vezes, com os resultados se repetindo e não permitindo uma eficaz análise estatística dos dados. Apesar disso, é possível utilizá-los para estimar valores dessas concentrações e transferir os resultados para os biorreatores, sistemas onde a influência de volume, de capacidade total de transferência de massa e até mesmo de concentração limitante de células não serão determinantes para uma estagnação da densidade celular. As Figuras 5.10 a 5.12 mostram a análise estatística feita a partir desses dados. Foi utilizado o software Statistica 8 da Statsoft.

O valor máximo de concentração celular obtido foi de 1,03 g/L, com 2,34 g/L, 1,5 g/L e 1,5 % de extrato de levedura, casaminoácidos e óleo de soja, respectivamente. Todas as concentrações situaram-se entre 0,7 e 1,0 g/L, uma variação muito baixa ao se analisar estatisticamente os resultados. Como visto anteriormente, uma possível causa para os valores tão próximos é a incapacidade do sistema de permitir que o microrganismo crescesse além de 1,0 g/L, seja por problemas de transferência de massa, capacidade de aeração do frasco, etc. Além disso, foi possível observar uma mudança na característica física do óleo de soja durante o cultivo. O óleo se tornou menos límpido, adotando uma coloração esbranquiçada, o que leva a acreditar que células tenham aderido ao mesmo e, consequentemente, influenciado a leitura no espectrofotômetro, que pode ter sido subestimada. Foram realizadas tentativas de homogeneizar o cultivo, tanto com agitação manual quanto com vórtex, porém estas não apresentaram resultado satisfatório. Esse fator pode ser muito importante quando realizada a análise estatística, pois como visto nas Figuras 5.10 e 5.11, o óleo foi considerado uma influência negativa (com fator negativo de 2,4 no gráfico de Pareto) para o crescimento celular.

Factor	ANOVA; Var.:Conc. Celular (g/L); R-sqr=,72006; Adj:,36014 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=,003478 DV: Conc. Celular (g/L)				
	SS	df	MS	F	p
(1)EL (g/L)(L)	0,008874	1	0,008874	2,551308	0,154235
EL (g/L)(Q)	0,016892	1	0,016892	4,856876	0,063372
(2)CAS (g/L)(L)	0,000134	1	0,000134	0,038519	0,849980
CAS (g/L)(Q)	0,009279	1	0,009279	2,667802	0,146415
(3)Óleo (% v/v)(L)	0,020548	1	0,020548	5,908038	0,045378
Óleo (% v/v)(Q)	0,000940	1	0,000940	0,270196	0,619228
1L by 2L	0,000121	1	0,000121	0,034675	0,857559
1L by 3L	0,004427	1	0,004427	1,272911	0,296401
2L by 3L	0,000151	1	0,000151	0,043314	0,841061
Error	0,024346	7	0,003478		
Total SS	0,086971	16			

Figura 5.10: Tabela ANOVA do planejamento experimental DCCR com *M. hirsuta* em meio NMS 1306 e adição de suplementos e óleo de soja.

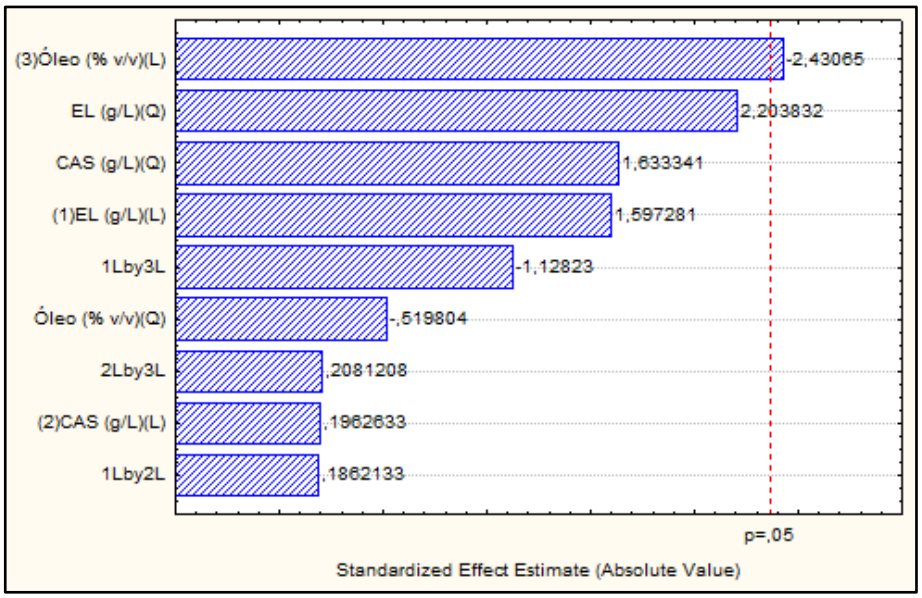

Figura 5.11: Diagrama de Pareto com análise da significância estatística do planejamento experimental DCCR com *M. hirsuta* em meio NMS 1306 e adição de suplementos e óleo de soja.

A tabela ANOVA mostra que para um intervalo de confiança de 95%, recomendado para uma análise estatística voltada para otimização, óleo de soja e extrato de levedura se mostraram estatisticamente significativos (EL com significância marginal, com valor de *p* inferior a 0,1) para o crescimento celular. Porém, o óleo de soja apresentou um fator negativo, como visto no gráfico de Pareto, o que representa um prejuízo no crescimento com sua utilização e pode estar relacionado com o acúmulo de células na fração oleosa e consequente

redução nos valores medidos. É possível observar ainda que os fatores de interação entre as moléculas não apresentaram significância estatística, o que pode ter sido causado exclusivamente pela baixa capacidade do sistema no que tange a geração de altas densidades celulares e, consequentemente, os resultados não expressaram a real interação, no caso de uma influência positiva, entre os compostos.

As superfícies de resposta da Figura 5.12 mostram um comportamento irregular da densidade celular com a variação dos suplementos e do óleo, diferente do que se poderia esperar do ensaio de otimização.

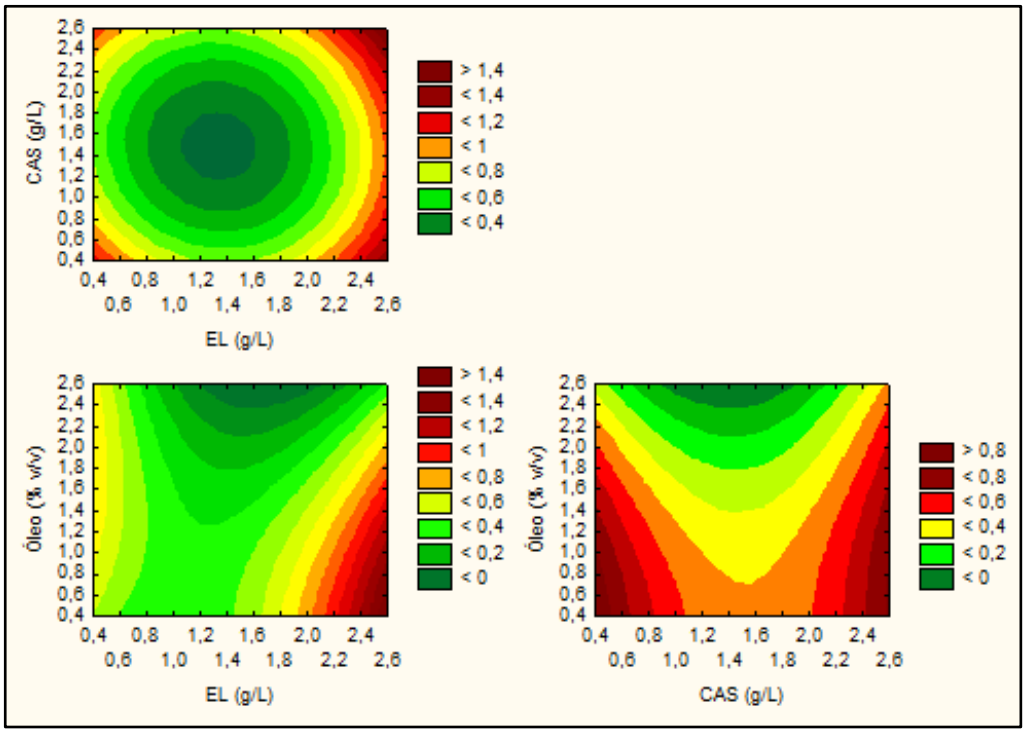

Figura 5.12: Superfícies de resposta do planejamento experimental DCCR com *M. hirsuta* em meio NMS 1306 e adição de suplementos e óleo de soja.

A variação estreita da faixa de concentrações na resposta acaba fazendo com que os compostos não apresentem significância estatística e com isso não se mostrem importantes no momento da otimização do meio de cultivo. A função *desirability*, que foi programada para exibir os valores de concentração das variáveis de modo a se alcançar concentração celular máxima, não apresentou resultados conclusivos, o que normalmente está associado à necessidade de mudança das faixas de concentração das variáveis independentes. O uso de outras faixas de suplementação, com aumento das concentrações, não foi levado em consideração

neste momento, pois como comentado anteriormente, o cultivo de metanotróficas com foco em proteínas de unicelular envolve um tipo de produto de interesse com baixo valor agregado, o que não permite que se eleve em demasia os custos de produção, o que inclui o meio de cultivo para o processo biológico.

No caso deste ensaio em frascos, pode-se considerar que o uso de um sistema maior, como um biorreator, poderia prover as condições necessárias para uma melhor avaliação do efeito dos suplementos e do óleo, porém a realização de todos os ensaios do planejamento em biorreatores se torna inviável, levando-se em consideração os gastos com substrato resultantes do uso destes sistemas com alimentação contínua da mistura gasosa (ar comprimido + metano). Foram realizados ensaios em biorreator com a combinação dos suplementos que apresentou a melhor em frascos, para avaliar se essa resposta se repetiria.

5.1.8. Conclusões parciais relativas aos ensaios em frascos agitados

A realização destes ensaios preliminares em frascos agitados foi fundamental para a primeira mudança de escala a ser realizada no projeto. Estes ensaios mostraram a essencialidade da suplementação do meio, bem como a incapacidade do microorganismo em consumir outras fontes de carbono. Para os ensaios posteriores o meio utilizado foi o NMS 1306 modificado na seção 5.1.1 com suplementação de extrato de levedura e casaminoácidos (com as concentrações definidas nas seções posteriores).

Os ensaios em biorreatores foram realizados de acordo com os blocos de experimentos em frascos, logo as condições escolhidas para os ensaios também foram evoluindo e mudando conforme o avanço do trabalho. Os valores finais de concentração de suplementos, que apresentaram melhores resultados de concentração celular, foram 2 g/L de extrato de levedura, 1,5 g/L de casaminoácidos e 1,5 % (v/v) de óleo de soja.

5.2. Determinação do K_La

Apresentados e discutidos os resultados para os ensaios preliminares em frascos agitados, os valores obtidos para os ensaios em relação ao K_La dos sistemas propostos para fermentação em reatores de bancada serão apresentados a seguir. Muito utilizado como parâmetro de mudança de escala em processos biotecnológicos, os valores de K_La obtidos nesta seção foram de fundamental importância para o desenvolvimento da tese e a obtenção das concentrações celulares desejadas em ensaios em biorreatores. Estes resultados permitiram ainda uma avaliação mais conclusiva sobre a eficiência do sistema RCB (Reatores do tipo coluna de bolhas) desenvolvido nesta tese para a produção de um extrato bruto concentrado em células, confirmando a sua competitividade face aos biorreatores convencionais.

5.2.1. Ensaios de K_La em biorreator *airlift* e agitado mecanicamente

A determinação do coeficiente volumétrico de absorção de oxigênio, K_La, em biorreator *airlift* foi realizada com diferentes tipos de borbulhadores. Conforme é possível observar na Tabela 5.4, o borbulhador que propiciou os melhores valores de K_La foi o de material sinterizado, correspondendo às expectativas. As bolhas dispersas por este borbulhador apresentavam um diâmetro reduzido em relação as dos outros dois, aumentando a superfície de transferência e o tempo de residência do gás no meio e, consequentemente, permitindo uma troca mais eficiente.

O borbulhador de 6 furos dispersava bolhas muito grandes, fazendo com que a área superficial disponível para a troca fosse reduzida e a subida das bolhas pela coluna do reator ocorresse com uma velocidade elevada, diminuindo, assim, a transferência de massa entre as fases. O mesmo se deu com o borbulhador de 48 furos, para o qual o resultado foi intermediário devido novamente a estes fatores.

Tabela 5.4: Coeficiente de absorção de oxigênio (K_La) para **diferentes borbulhadores** e T=30°C em reator *airlift* com água deionizada.

Vazão (L/min)	K_La (h^{-1})		
	Tipo de Borbulhador		
	6 furos de 1 mm	**48 furos de 0,386 mm**	**Sinterizado**
4	9,3 ± 0,7	21,1 ± 0,8	36,1 ± 2,4
6	12,6 ± 0,7	31,3 ± 1,3	44,8 ± 2,6
8	17 ± 2,1	37,7 ± 2,2	54,4 ± 4,9

Os resultados indicam que o dispersor a ser utilizado para os experimentos seguintes deve ser o de material sinterizado. Um fator a ser observado durante as fermentações é o entupimento desse tipo de borbulhador. Devido à sua superfície rugosa e ao diâmetro muito reduzido de seus poros, a adesão de células à superfície poderia interromper a passagem de gases pelo borbulhador e, consequentemente, o fornecimento de substrato e oxigênio ao sistema, problema que poderá ser contornado por uma regular limpeza do dispositivo a cada término de uma operação de fermentação.

Uma vez definido o tipo de borbulhador, os ensaios seguintes foram relacionados à temperatura do processo. Algumas bactérias metanotróficas apresentam crescimento ótimo em temperaturas mais elevadas, como 37 e 45°C, enquanto outras são capazes de crescer em temperaturas inferiores a 10°C. Logo, foram conduzidos ensaios de modo a observar regiões próximas à ideal para *M. hirsuta* (30°C), nas quais a transferência de massa entre as fases líquida e gasosa fosse a máxima. As temperaturas investigadas foram de 37°C, por se tratar da temperatura ótima de uma linhagem de bactéria metanotrófica que consta do estoque do LADEBIO (*Methylococcus capsulatus*) e 24°C, temperatura “ambiente” em determinadas épocas do ano e variável dependendo da região, vantajosa por não haver necessidade de aquecimento, gerando economia de utilidades para o processo industrial. Os resultados estão expostos na Tabela 5.5.

Tabela 5.5: Coeficiente volumétrico de absorção de oxigênio (K_La) para **diferentes temperaturas** e borbulhador sinterizado em reator *airlift* com água deionizada.

Vazão (L/min)	**K_La (h^{-1})**		
	Temperatura		
	24°C	**30°C**	**37°C**
4	37,3 ± 0,6	36,1 ± 2,4	50,1 ± 3,7
6	45,9 ± 3,4	44,8 ± 2,6	64,8 ± 0,6
8	69,8 ± 4,0	54,4 ± 4,9	81,9 ± 3,4

É possível observar que a 30°C, temperatura ideal a ser utilizada para o microrganismo, foram obtidos os mais baixos valores de taxa de transferência de massa, mesmo que com uma diferença não tão grande em relação às outras. A solubilidade dos gases em água é um parâmetro inversamente proporcional à temperatura, ou seja, quanto mais baixa a temperatura, maior a solubilidade dos gases. A solubilidade do oxigênio a 24°C é de aproximadamente 0,040 gO_2/KgH_2O, enquanto que a 30°C é de 0,036 gO_2/KgH_2O e a 37°C de 0,032 gO_2/KgH_2O. Esses valores podem justificar o melhor resultado obtido para 24°C em relação a 30°C, mas ainda deixa em aberto o bom resultados para 37°C (Engineering Toolbox, 2016).

Em contrapartida ao fator solubilidade, e como justificativa para os valores encontrados de K_La, a viscosidade do meio tem uma relação inversamente proporcional à temperatura, porém a redução da viscosidade tem efeito positivo na transferência de massa (Engineering Toolbox, 2016). Levando em consideração os resultados, é possível observar que para as temperaturas de 24°C e 30°C e as menores vazões (4 e 6 L/min) o valor de K_La é praticamente o mesmo, enquanto que para 37°C o valor já é bem superior, indicando uma facilidade na transferência, possivelmente em decorrência da redução da viscosidade e das forças de resistência à transferência do gás para a fase líquida. Para a vazão mais elevada (8 L/min) já existe uma diferença mais acentuada entre os valores de K_La, tal comportamento talvez se deva ao fato de que com uma maior disponibilidade de O_2 devido às vazões maiores, o equilíbrio entre esses parâmetros seja quebrado e um passe a prevalecer sobre o outro. Mais estudos são necessários para uma conclusão mais aprofundada a respeito das variações do coeficiente em relação à

temperatura, com ensaios de viscosidade e solubilidade de diferentes substâncias em água e a forma que esses parâmetros afetam a transferência, o que foge ao escopo da tese.

Empregando o borbulhador sinterizado a 30°C foram realizados ensaios com recheios randômicos. Tanto os anéis de Pall quanto as selas apresentaram valores inferiores de K_La em relação ao ensaio sem recheio, como visto na Tabela 5.6. A configuração do reator *airlift* impõe que o gás faça um retorno na região limite da placa, onde as seções ascendentes e descendentes se conectam, de forma que a descida do gás crie as condições para a circulação do meio. O uso dos recheios no *airlift* pode de certa forma atrapalhar essa circulação por mudar a trajetória do gás durante o percurso de subida no reator, fazendo com que ele saia direto da coluna de líquido ao invés de retornar pelo *downcomer*. Foi possível observar durante os experimentos que um volume muito reduzido de gás fazia este retorno, o que justificaria a queda dos coeficientes de transferência quando utilizados os recheios.

Uma vez que as colunas de bolhas não possuem retorno da fase gasosa, o uso de recheios deve ser capaz de promover um aumento da transferência de massa e do K_La, com a preferência de utilização dos recheios tipo Anel Pall, já que este teve um resultado melhor no reator airlift em relação ao do tipo sela.

Tabela 5.6: Coeficiente volumétrico de absorção de oxigênio (K_La) para os **diferentes tipos de recheio randômico** em reator *airlift* com água deionizada.

Vazão (L/min)	**K_La (h^{-1})**		
	Recheios		
	Sem recheios	**Anel Pall1"**	**Sela 1"**
4	36,1 ± 2,4	26,6 ± 1,5	26,9 ± 0,6
6	44,8 ± 2,6	33,8 ± 0,7	30,0 ± 3,3
8	54,4 ± 4,9	35,6 ± 1,9	34,3 ± 1,1

Por fim, a partir dos gráficos comparativos das Figuras 5.15 a 5.17, fica nítida a variação na transferência de massa causada pelo aumento da vazão de ar. Os aumentos da turbulência e da quantidade de gás disponível no meio proporcionaram um coeficiente de transferência maior, conforme esperado. A relação entre o K_La das

vazões de 4, 6 e 8 L/min se mostrou linear em todos os experimentos, realizados em triplicata.

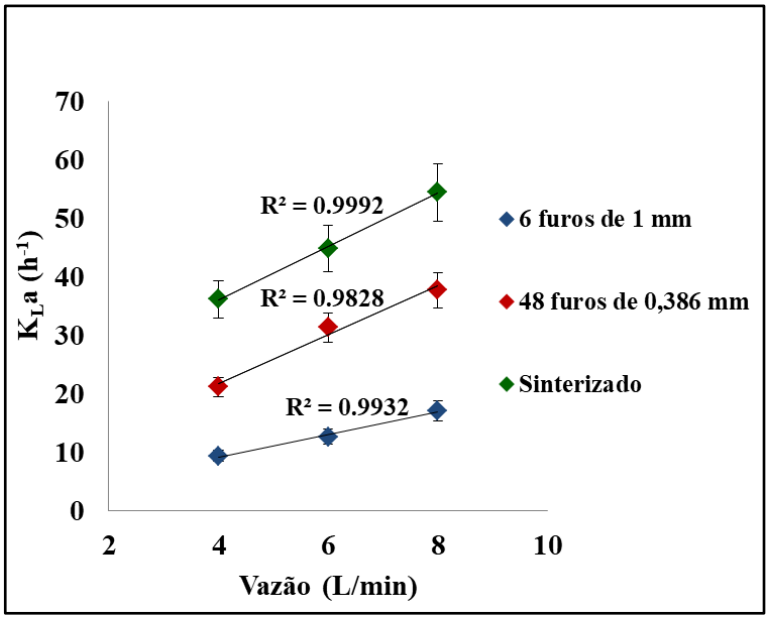

Figura 5.13: Comparação dos valores de K_La obtidos para diferentes vazões em biorreator *airlift* com água deionizada com **diferentes tipos de borbulhador**, a 30°C e sem recheios randômicos.

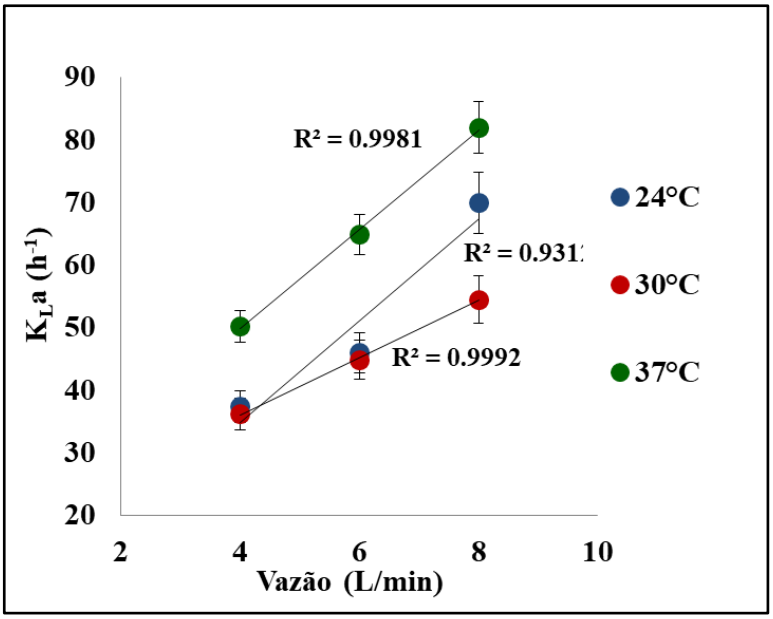

Figura 5.14: Comparação dos valores de K_La obtidos para diferentes vazões em biorreator *airlift* com água deionizada em **diferentes temperaturas**, borbulhador sinterizado e sem recheios randômicos.

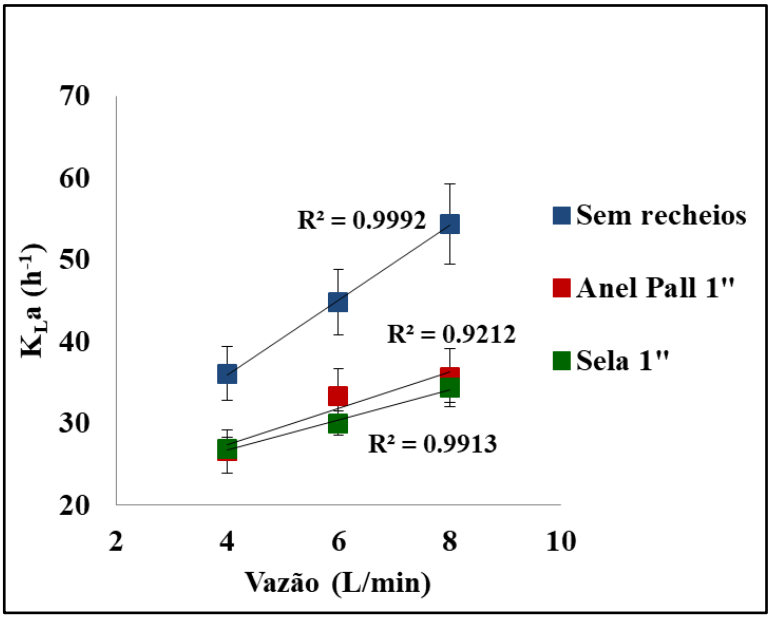

Figura 5.15: Comparação dos valores de K_La obtidos para diferentes vazões em biorreator *airlift* com água deionizada com **diferentes tipos de recheio randômico**, a 30°C e borbulhador sinterizado.

Após estes resultados preliminares em reator airlift, foi verificada a taxa de transferência em sistema agitado mecanicamente por impelidores (STR). Foram realizados ensaios a fim de se avaliarem os valores de K_La nesse sistema e a capacidade de transferência no meio NMS1306, composto basicamente por sais minerais.

Como observado na Tabela 5.7, os valores de K_La para o reator STR foram inferiores aos do *airlift*, ao contrário do que era esperado inicialmente.

Tabela 5.7: Coeficiente volumétrico de absorção de oxigênio (K_La) para diferentes configurações de reator e fases líquidas.

Taxa específica de aeração (vvm)	**K_La (h^{-1})**			
	Airlift		**STR (400 RPM)**	
	Água deionizada	**NMS 1306**	**Água deionizada**	**NMS 1306**
0,44	36,1	55,7	23,5	30,5
0,67	44,8	73,8	31,6	37,0
0,89	54,4	90,3	37,6	45,3

O STR, por ter agitação mecânica, com isso mais vigorosa e com maior gasto de energia, normalmente apresenta taxas de transferência superiores aos reatores

agitados pneumaticamente, como o *airlift* e os reatores colunas de bolhas. Nos experimentos realizados em laboratório, foi possível observar que isto não ocorreu, com a eficiência do airlift se mostrando superior. Alguns fatores podem estar relacionados a essa maior capacidade de aeração do *airlift*, dentre eles a variação do tempo de resposta dos eletrodos utilizados em cada reator. De acordo com Amaral (2007), valores de K_La para um reator tipo STR estavam em torno de 40 h^{-1} para água destilada e vazões de ar de 0,5 a 2,5 L/min com agitação de 250 rpm. É possível que a utilização das vazões de ar em vvm tenha ocasionado o uso de vazões muito reduzidas de oxigênio no reator de menor escala e, consequentemente, as baixas taxas de oxigenação do meio. Como citado anteriormente, outra possível causa para os baixos valores de K_La no STR pode estar relacionada aos diferentes eletrodos de OD utilizados nos ensaios. Por se tratarem de dois reatores de fabricantes diferentes, com tipos de conexões distintos, não foi possível realizar os experimentos com o mesmo eletrodo, o que pode ter interferido na velocidade de resposta de cada um, mudando a precisão dos dados obtidos, provocando lentidão nas leituras e um cálculo subestimado dos coeficientes de transferência. Outro fenômeno que pode ter ocorrido e causado essa baixa eficiência de aeração do STR foi a cavitação. A cavitação ocorre quando se formam zonas de baixa pressão, fazendo com que o oxigênio que estava dissolvido no meio se desprenda da fase líquida e volte a ser bolha. Para evitar esse problema seria necessário reduzir a velocidade de agitação do sistema, diminuindo essas zonas de baixa pressão no “lastro” dos impelidores e melhorando a solubilização geral do sistema.

Já os ensaios com o meio NMS 1306, como esperado, apresentaram valores de K_La superiores aos da água deionizada, tanto para o reator airlift quanto para o STR, tendo em vista a presença de íons em solução no meio de cultivo, o que faz variar a força iônica da fase líquida. Conforme indicado por Hassan e Robinson (1980), o aumento da força iônica da fase líquida vai proporcionar um aumento do valor do coeficiente de transferência, sem depender de variações nas condições operacionais do sistema. Existem interações entre os íons do meio mineral e o solvente, aumentando a força iônica da solução e reduzindo os coeficientes de atividade na fase líquida, o que proporciona um aumento da capacidade de

solubilização do gás (Willey, 2004). A Figura 5.18 apresenta os valores obtidos nos ensaios deste bloco.

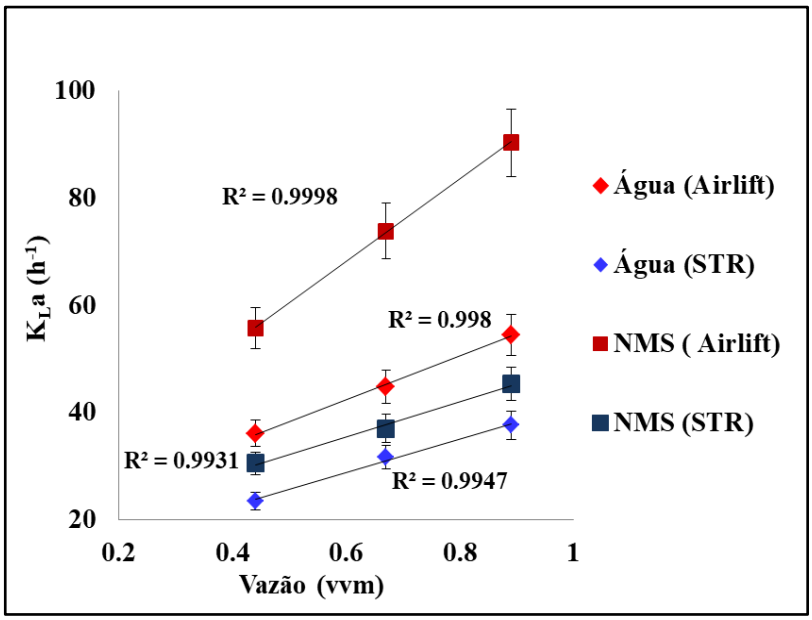

Figura 5.16: Comparação dos valores de K_La obtidos para diferentes vazões em **biorreator *airlift* e STR com diferentes fases líquidas** a 30°C.

5.2.2. Ensaios de K_La em reator tipo coluna de bolhas (RCB)

Como esperado, para as duas configurações, os maiores valores do coeficiente de transferência foram aqueles referentes às maiores vazões de ar, o que seguramente está relacionado aos maiores níveis de turbulência/mistura nas colunas e a disponibilização de um volume maior de oxigênio para a fase líquida. Os valores calculados de K_La foram 166,1, 138,7, 111,2 e 79,9 h^{-1} para as colunas preenchidas com o recheio e 96,9, 71,1, 51,9 e 29,6 para as colunas sem os anéis de Pall, para as vazões de 8, 6, 4 e 2 L/min de ar comprimido, respectivamente. As vazões utilizadas nos ensaios no reator tipo coluna de bolhas tiveram de respeitar um valor mínimo de 2 L/min, necessário para que fosse possível vencer a pressão da coluna de água. Os valores de K_La obtidos nas colunas de vidro são mostrados na Figura 5.17. Foram testadas vazões inferiores e observou-se que o gás não conseguia percorrer todo o caminho e chegar até a última das três colunas quando utilizado o sistema completo proposto para as fermentações.

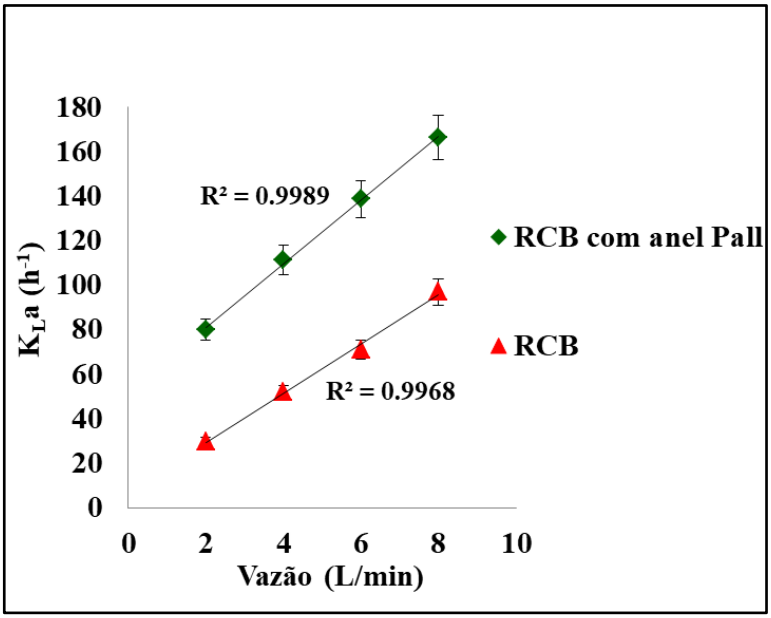

Figura 5.17: Comparação dos valores de K_La obtidos para **diferentes vazões no sistema RCB com e sem uso de recheios tipo anel Pall** a 30°C.

O ganho utilizando os recheios foi de 71, 95, 114 e 170% para as vazões de 8, 6, 4 e 2 L/min, respectivamente, o que mostra a positiva influência do preenchimento da coluna com os recheios na eficiência de aeração do sistema, especialmente em situações de baixa turbulência e reduzido fornecimento de ar. A presença dos anéis Pall está associada a uma maior tortuosidade do percurso das bolhas de gás e, consequentemente, ao aumento do tempo de residência da fase gasosa no seio do líquido. A coalescência das bolhas, conhecida por ser um fator prejudicial à eficiência de transferência, também é minimizada com a quebra promovida pelos recheios.

Reatores do tipo coluna de bolhas tradicionais são conhecidos por ter desvantagens quando comparados aos agitados mecanicamente ou aos diferentes tipos de *airlift*, que permitem uma circulação mais eficiente e homogeneização do meio de cultivo. Apesar disso, no presente trabalho, o uso de colunas de bolhas preenchidas com recheios randômicos aumentou a eficiência da transferência de metano e oxigênio para a fase líquida, como visto na Figura 5.18, de modo diretamente proporcional ao aumento da vazão da mistura gasosa.

Mesmo sem o uso dos recheios, os valores de K_La para a coluna de bolhas foram superiores aos do *airlift*. O uso de colunas com diâmetro reduzido influencia diretamente nesta questão, tendo em vista que o ar borbulhado por baixo da coluna

consegue preencher de forma mais eficiente todo o seu volume. Já no *airlift*, mesmo com bolhas muito pequenas quando utilizado o borbulhador sinterizado, o gás não consegue percorrer lateralmente todo o espaço do reator, concentrando sua subida na região central do setor onde é borbulhado e não indo até o fundo do reator na região de retorno das bolhas. Isso gera regiões sem transferência efetiva e reduzindo assim a taxa global de transferência de massa do sistema.

Vale ressaltar ainda que o uso de colunas em série, apesar de não possuir influência direta no valor do K_La, permitiu a "reutilização" da mistura gasosa, reduzindo perdas e aumentando o rendimento do processo como um todo.

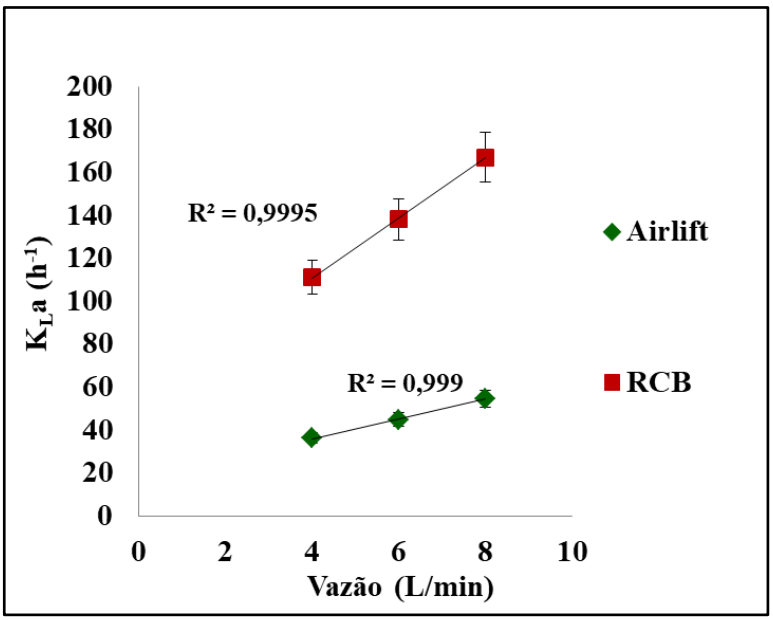

Figura 5.18: Comparação dos valores de K_La obtidos para diferentes vazões em **dois tipos de biorreator de agitação pneumática: *airlift* e RCB** (T= 30°C).

O ganho associado ao uso dos recheios resultou em um sistema fermentativo de fácil configuração e montagem, baixo custo operacional se comparado aos reatores agitados e alta eficiência na transferência de massa para a fase líquida. Além de inovador, esse sistema é uma boa alternativa a se explorar para os mais diversos tipos de cultivo.

5.2.3. Correlação dos valores do coeficiente de transferência de massa para oxigênio (K_La) e metano ($(K_La)_{CH4}$)

A partir do momento em que o cálculo do $(K_La)_{CH4}$ é feito com uma correlação simples e direta, basta termos os valores para o oxigênio para aplicar a equação disponibilizada por Yu *et al*. Na Tabela 5.8 são apresentados os valores calculados para as três configurações de biorreator utilizadas neste projeto.

Tabela 5.8: Coeficiente volumétrico de absorção de metano ($(K_La)_{CH4}$) para as três diferentes configurações de reator.

Taxa específica de aeração (vvm)	K_La (h^{-1})		
	Tipo de Biorreator		
	Airlift	**STR**	**RCB***
0,44	32,1	20,1	98,9
0,67	39,8	27,0	138,7
0,89	48,4	32,2	166,1

* As vazões para o RCB foram de 4, 6 e 8 L/min, o que equivale à vazão em L/min dos ensaios em biorreator *Airlift*.

Os melhores resultados obtidos foram para o sistema RCB. Estes valores indicam uma alta eficiência do sistema desenvolvido no projeto em fornecer o oxigênio e o metano requeridos pela célula para o seu metabolismo, tornando esse reator promissor para o cultivo de microrganismos em geral, especialmente os que necessitam de altas concentrações de oxigênio dissolvido ou algum outro substrato gasoso.

5.3. Ensaios em biorreatores

A seguir serão apresentados os resultados para os ensaios realizados em biorreator agitado mecanicamente (STR), nas duas formas distintas de operação, e no sistema de coluna de bolhas em série (RCB) desenvolvido no próprio LADEBIO. O biorreator *Airlift* utilizado nos ensaios de K_La serviu como base para a avaliação e

comparação da eficiência de transferência de massa entre as fases para os sistemas STR e RCB. Porém, sua utilização como meio reacional para *M. hirsuta* não foi avaliada no decorrer deste trabalho, por se tratar de um sistema com volume e gastos operacionais elevados que, no presente momento, inviabilizariam um desenvolvimento mais aprofundado dos ensaios nos sistemas menores. Essa segunda fase da mudança de escala do processo deve ser abordada em trabalhos futuros e aparece como sugestão de continuação da pesquisa no respectivo capítulo.

5.3.1. Ensaios em biorreatores agitados mecanicamente (STR)

Nos ensaios com o biorreator BioFlo da NewBrunswick todos os parâmetros do processo foram controlados. Como descrito no capítulo anterior, foram mantidas as condições iniciais de pH 7,0, temperatura 30°C e agitação do meio de cultivo através de impelidor em 400 rpm.

A Figura 5.19 ilustra o crescimento no primeiro ensaio realizado. A concentração inicial de células foi de aproximadamente 0,5 g/L de *M. hirsuta,* enquanto a vazão de mistura utilizada foi de 4 L/min com 50% de metano e 50% de ar comprimido. O cultivo foi mantido por 135 horas, alcançando uma densidade celular de 4,6 g/L.

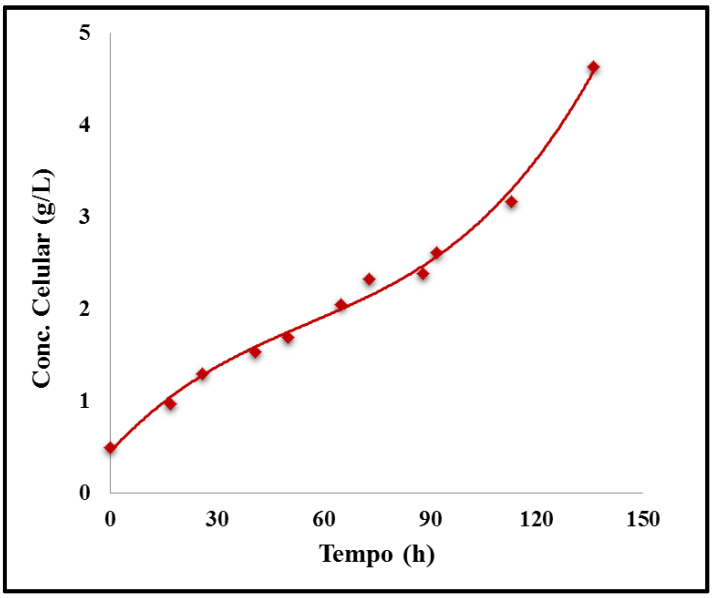

Figura 5.19: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* em **biorreator agitado mecanicamente** em meio NMS1306 com adição de 0,5 g/L de EL e peptona (cada). Proporção de metano e ar de 50%.

A pureza da cultura foi verificada por microscopia. As lâminas foram observadas em um microscópio DM2000 Leica, com aumento de 1000x durante todo o processo. Foi possível observar a presença de bacilos gram positivos no decorrer do ensaio, como observado na Figura 5.20.

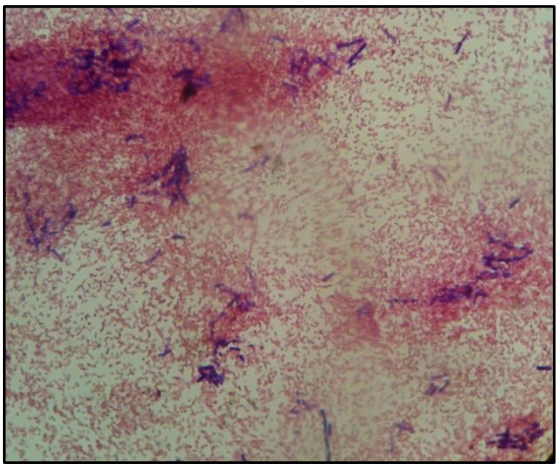

Figura 5.20: Micrografia observada durante o cultivo de *M. hirsuta* em STR, no momento do crescimento mais acelerado, mostrando a contaminação por bacilos gram positivos.

A presença de extrato de levedura permitiu o crescimento de contaminantes no meio NMS modificado alimentado com metano, mesmo sem adição de outra fonte de carbono. A adição deste composto é utilizada em alguns casos para separação dos contaminantes, tendo em vista que eles crescem rapidamente com o extrato, enquanto a bactéria metanotrófica tem um crescimento mais lento. Isso permitiu assim uma separação das colônias em placa, seguida de diluição do cultivo. Esse procedimento foi repetido diversas vezes, até que só restasse a bactéria de interesse no cultivo. Porém no caso do biorreator não seria possível essa separação das células, o que fez com que o cultivo fosse então interrompido e fossem utilizadas condições de esterilização do meio reacional mais severas em autoclave, com 1 atm e 121°C por 30 minutos.

Após outros ensaios preliminares em biorreator, alcançando concentrações celulares inferiores a 1 g/L quando verificada e mantida a pureza da cultura, foram realizados diversos experimentos em frascos agitados, conforme mostrado anteriormente. Com estes, foram obtidos melhores resultados para uma concentração de 2 g/L de suplementos, com o emprego de casaminoácidos no lugar

da peptona e havendo mudança na proporção de metano e ar para apenas 30% de metano. Nos ensaios em biorreator, um “segundo” experimento em reator agitado mecanicamente foi realizado com o intuito de se testarem essas novas condições em um cultivo com todos os parâmetros controlados, além de fornecimento contínuo de substrato. Devido ao intenso borbulhamento da mistura gasosa no meio de cultivo, foi utilizado para este ensaio um condensador na saída de gases do biorreator com a temperatura controlada e mantida em 10°C com auxílio de um banho termostático de água.

A Figura 5.21 traz a curva de crescimento de *M. hirsuta* para estas condições. A concentração celular inicial foi de 0,35 g/L, alcançando o valor de 2,60 g/L em 55 horas de cultivo. Micrografias em diferentes etapas do processo não revelaram nenhum tipo de contaminação da cultura (Figura 5.22).

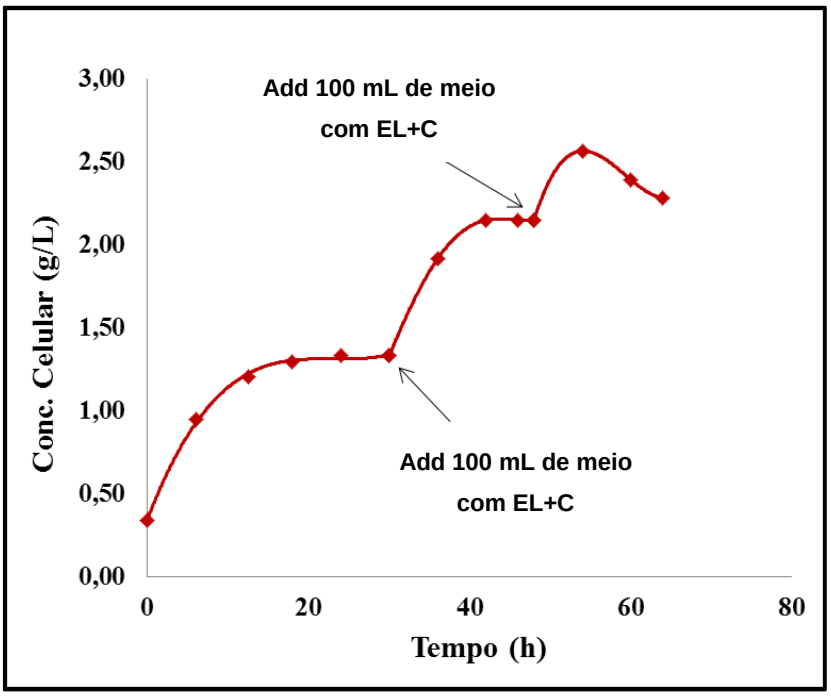

Figura 5.21: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* em **biorreator agitado mecanicamente** em meio NMS1306 com adições de meio para concentração final de 2 g/L de EL + C (cada). Proporção de 30% de metano e 70% de ar.

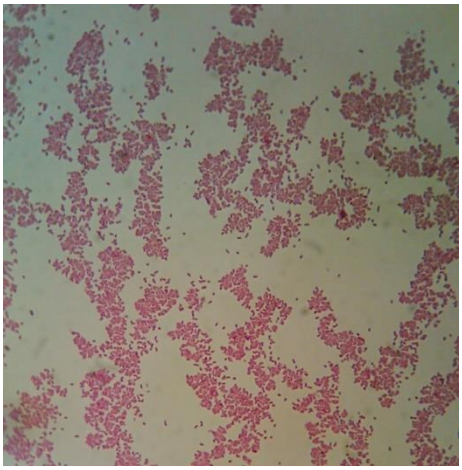

Figura 5.22: Micrografia do cultivo de *M. hirsuta* em STR contendo apenas bactérias gram negativas de mesmo formato, evidenciando a pureza do cultivo.

O crescimento do microrganismo foi acentuado durante as primeiras horas do cultivo, porém verificou-se uma estagnação da densidade celular após 20 horas, tendo sido atingida nesta primeira etapa a concentração celular de 1,3 g/L. A fim de verificar se este comportamento estaria relacionado ao esgotamento dos suplementos, o biorreator foi alimentado com uma solução contendo 100 mL de meio NMS1306 com adição de extrato de levedura e casamino. A massa de cada um destes componentes na solução foi de 2,2 g, tendo em vista o novo volume de meio (1100 mL). Após esta alimentação, verificou-se uma nova etapa de crescimento, que durou cerca de 12 horas, seguida de outra interrupção. Com a concentração celular atingindo valores de 2,2 g/L em 42 horas, foi realizada uma nova alimentação de 100 mL de meio com os suplementos (EL+C). Para o novo volume final de meio equivalente a 1200 mL, foram utilizados 2,4 g de extrato de levedura e casamino na solução de 100 mL. Foi observado crescimento até uma concentração de 2,6 g/L, seguido de uma queda da densidade celular e o consequente fim do ensaio. Essa queda observada na concentração das células pode ter ocorrido devido à morte celular seguida da degradação das células, causada pela concentração de enzimas e outras substâncias nocivas ao microrganismo durante todo o seu cultivo. Esse comportamento foi observado também em outros cultivos, que serão apresentados no decorrer da discussão.

A utilização do STR propiciou um ambiente mais favorável ao crescimento da bactéria, o que está provavelmente relacionado a uma solubilização mais eficiente de substrato e do próprio oxigênio para o meio, com a alimentação contínua e a

agitação mecânica. Porém, essa maior disponibilização está acompanhada de desperdício de matéria-prima, tendo em vista que boa parte do metano oferecido não foi consumido pelo microrganismo e foi liberado na atmosfera, o que levou a buscar alternativas para um cultivo com fornecimento controlado do gás.

5.3.2. Ensaios em biorreatores agitados mecanicamente (STR) com alimentação intermitente

Os valores de concentração celular obtidos com a alimentação intermitente foram inferiores aos obtidos com alimentação contínua de substrato. Estes resultados são apresentados na Figura 5.23.

É possível observar que a bactéria teve seu crescimento reduzido, alcançando valores de no máximo 1,0 g/L, o que representa cerca de 40% do máximo obtido com a forma contínua de alimentação do metano. A baixa capacidade de geração de biomassa desse sistema pode estar relacionada não só a uma baixa disponibilidade do substrato para a célula, mas também à falta de oxigênio dissolvido (OD) no meio, outro componente essencial para o metabolismo celular (como visto no capítulo 2, o oxigênio é utilizado na via metabólica de *M. hirsuta* na etapa de transformação do metano em metanol, para posterior transformação em formaldeído e entrada na via da serina).

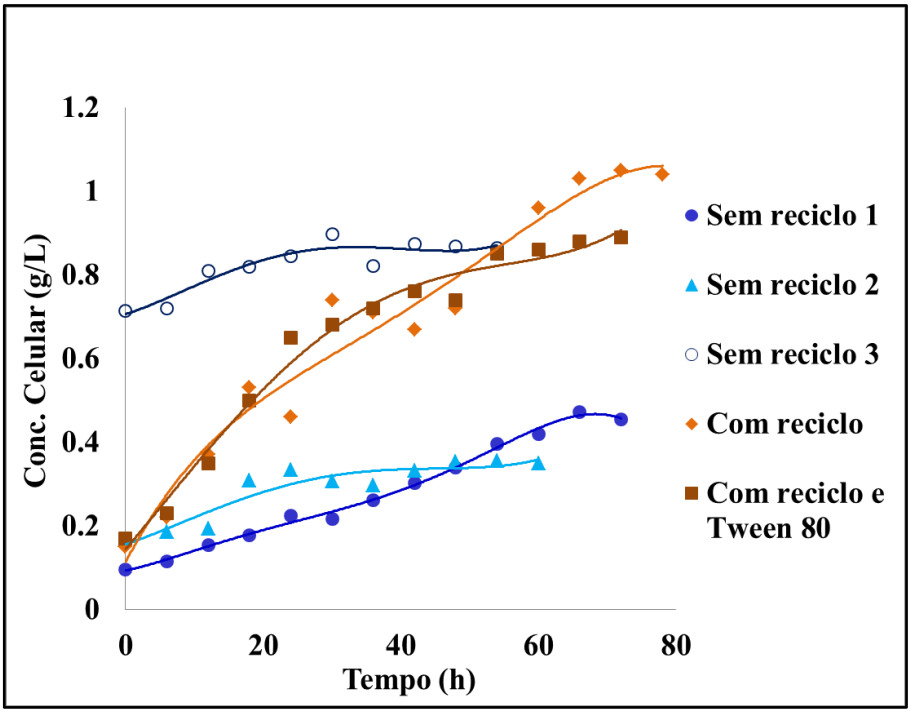

Figura 5.23: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* em **biorreator tipo STR com alimentação intermitente** em meio NMS1306 suplementado. Proporção de 30% de metano e 70% de ar.

O ensaio "Sem reciclo 2" foi realizado com metade do intervalo entre as alimentações, porém nenhum ganho foi observado com esta troca mais rápida da atmosfera do sistema. Os valores de OD foram monitorados no decorrer de todos os ensaios e foi visto que ele permanecia em concentrações baixas, o que pode ter ocasionado esta redução do crescimento. A velocidade de agitação de 400 rpm não foi suficiente para aumentar o valor de OD, influenciado também pela proporção de ar e metano na atmosfera do reator.

O ensaio Sem reciclo 3 foi uma tentativa de se aumentar a concentração de células e contornar problemas relativos à possível toxicidade do metano, porém o crescimento foi praticamente nulo, sendo, por isso, mantido por pouco mais de 40 horas. A alta concentração de células junto com a baixa disponibilidade dos gases na fase líquida, ao contrário da expectativa inicial, pode ter criado um ambiente extremamente pobre para o metabolismo celular, impedindo assim qualquer crescimento, com os gases disponíveis sendo utilizados apenas para manutenção dos microrganismos já presentes no inóculo.

A utilização do reciclo nos ensaios foi uma tentativa de aumentar a disponibilidade de metano e oxigênio na fase líquida. A passagem da corrente gasosa repetidas vezes pelo meio de cultivo aumentou o contato entre as fases, e

conforme observado na Figura 5.23, melhorou os rendimentos em termos de densidade celular. Em contrapartida, o uso de um tensoativo, o Tween 80, com o objetivo mais uma vez de melhorar a solubilização do metano não surtiu efeito, com o ensaio final não ultrapassando 1,0 g/L de células em massa seca.

Como planejado, o gasto de metano durante este ensaio foi reduzido em relação aos anteriores, porém as baixas concentrações celulares obtidas fizeram com que esta forma de condução não despontasse como uma alternativa para o melhor aproveitamento do metano e maior solubilização do mesmo na fase líquida. Pensando neste melhor aproveitamento, um processo com biorreatores em série e com borbulhamento sequencial do metano, reator por reator, foi desenvolvido e testado, visando à solubilização e consequente utilização de uma fração maior do metano fornecido ao sistema.

5.3.3. Ensaios em biorreatores tipo coluna de bolhas em série (RCB) preenchidas com recheios randômicos

Os ensaios com colunas de bolhas em série visaram, como visto no tópico anterior, um maior aproveitamento do substrato gasoso, tendo em vista a passagem da mesma corrente de mistura gasosa pelas três colunas. Cada uma das colunas possui volume útil de 1000 mL, totalizando 3000 mL de meio de cultivo. O pH do meio foi aferido antes da adição do inóculo (pH= 7,0) e não foi controlado durante o processo, enquanto a temperatura foi mantida em 30°C ao longo de todo o experimento com o uso de camisas de reator. A vazão foi mantida em 4 L/min, com uma proporção de 50% de metano, e a suplementação inicial utilizada foi a mistura de extrato de levedura e peptona com concentração de 0,5 g/L. A mistura entre os meios das três colunas foi realizada através de uma bomba peristáltica, mantendo o cultivo homogêneo em todos os biorreatores do sistema.

É muito importante ressaltar que os ensaios em frascos e biorreatores, bem como os ensaios de K_La, foram realizados de forma contínua durante toda a tese, o que significa que os resultados desta seção não necessariamente foram obtidos ao final dos estudos, com os ensaios apresentados anteriormente já definidos e analisados. Dessa forma, alguns valores utilizados nos ensaios em biorreator serão

relativos aos fatores que no momento da sua realização eram tidos como “ótimos” ou como objetivos de estudo.

A injeção dos gases foi feita através do contato direto da entrada inferior da coluna com a mangueira. As bolhas percorriam o caminho ascendente pelas colunas sempre em contato com o recheio que as preenchia, e este as quebrava e distribuía lateralmente pelo reator, evitando coalescência e aumentando o tempo de residência do gás no meio, com o consequente aumento da tortuosidade e do caminho percorrido pela mistura gasosa através da fase líquida.

A Figura 5.24 apresenta a curva de crescimento do primeiro ensaio com as colunas em série. A concentração inicial de células foi de 0,1 g/L e, em um primeiro momento, a final foi de 0,4 g/L com 20 horas de cultivo. Após esse tempo, *M. hirsuta* teve o crescimento interrompido, apresentando leve queda na densidade celular durante as horas seguintes. Foi possível observar que, mesmo mantendo a circulação do meio pelo uso de bombeamento, bem como o borbulhamento da mistura gasosa, houve depósito de biomassa nos recheios e no fundo das colunas, o que pode ter contribuído para a redução dos valores obtidos de concentração de células.

Durante todo o processo ocorreu carreamento de líquido devido ao intenso borbulhamento de gás. A partir de aproximadamente 60 horas de cultivo a perda de meio se tornou visível, com a redução do volume das colunas. Com cerca de 110 horas de processo, havia uma grande quantidade de biomassa bacteriana depositada no fundo das colunas, o volume de meio havia reduzido significativamente e o crescimento estava estagnado. Então foi realizada uma alimentação com 800 mL de meio suplementado. Assim como no biorreator agitado, foi feito o cálculo para que a concentração inicial de 0,5 g/L fosse retomada, tendo sido adicionados 1,5 g de cada componente na solução alimentada (volume total do sistema era de 3000 mL).

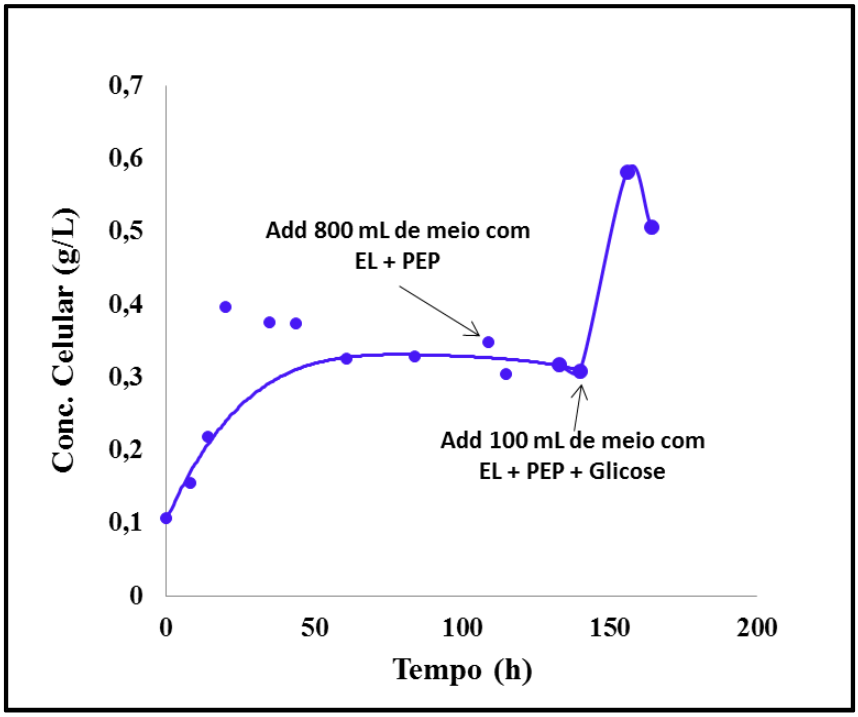

Figura 5.24: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* em **sistema de coluna de bolhas (RCB) preenchida com anéis de Pall** com meio NMS1306 com adição de 0,5 g/L de EL e peptona (cada) e glicose. Proporção de 30% de metano e 70% de ar.

Esta alimentação, conforme exibido na Figura 5.24, não surtiu efeito no que diz respeito ao crescimento, podendo ser visualizada uma queda na concentração celular relativa ao aumento do volume. Então, com 140 horas, foi realizada nova alimentação. Desta vez, foi utilizada uma solução com o meio NMS suplementado e com adição de glicose, na tentativa de retomar o crescimento do microrganismo. O resultado foi um crescimento acelerado, com aumento de 90% em relação à concentração celular. Após 16 horas de cultivo, este crescimento repentino não continuou, com a concentração de células diminuindo. Lâminas observadas ao microscópio, de amostras retiradas ao término do experimento, mostraram contaminação do cultivo por bacilos gram positivos, estimulada pela presença de glicose no meio, o que justifica o crescimento acentuado da densidade celular após a suplementação, mesmo com *M. hirsuta* não sendo capaz de consumir este substrato.

Para o segundo ensaio, o meio NMS foi suplementado com 2 g/L de extrato de levedura e casaminoácidos, e a proporção da mistura de alimentação foi de 30% de metano. Foi utilizado ainda um condensador resfriado a 10°C na saída da última coluna, evitando a perda intensa de líquido como ocorreu no primeiro ensaio. O

borbulhamento se deu diretamente pela entrada inferior da coluna, sem o uso do borbulhador sinterizado e com as bolhas sendo distribuídas apenas pelos recheios no interior da coluna, o que reduziu alguns problemas operacionais enfrentados anteriormente. O resultado deste experimento pode ser visto na Figura 5.25.

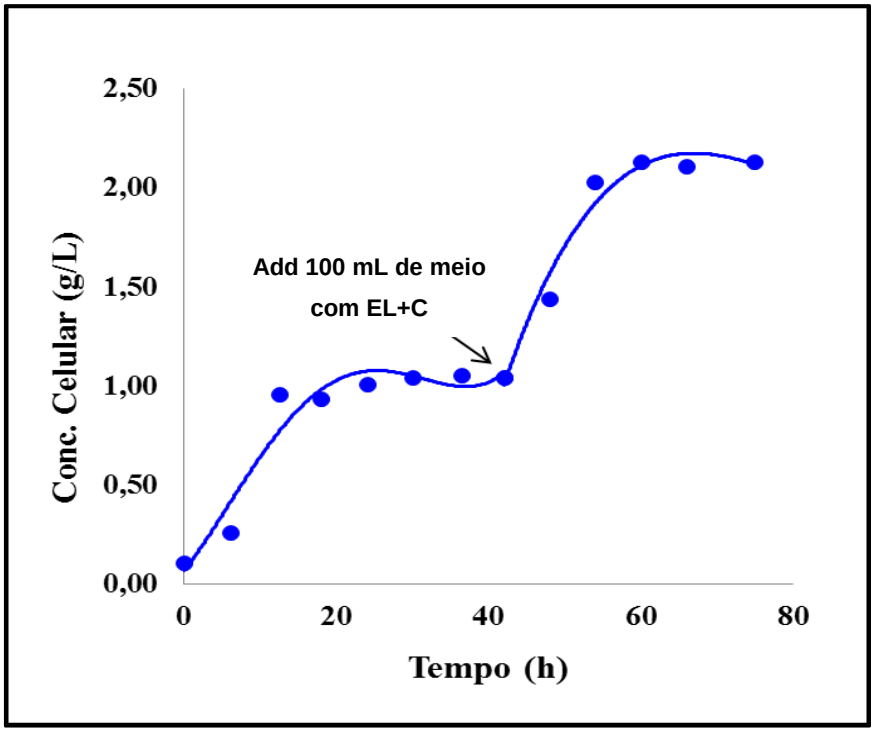

Figura 5.25: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* em **sistema RCB preenchido com recheio do tipo anel PALL** com meio NMS1306 modificado e adição de 2 g/L de EL e 2 g/L de casaminoácidos. Proporção de alimentação de 30% de metano e 70% de ar.

O ensaio foi iniciado com uma concentração de 0,1 g/L e alcançou uma concentração de aproximadamente 1,0 g/L em 12 horas. Da mesma forma que ocorreu com os outros ensaios em biorreatores, após o possível esgotamento dos suplementos o crescimento cessou, sendo os valores de concentração mantidos. Com 46 horas de cultivo foi adicionada uma solução de 100 mL de meio com extrato de levedura e casamino em concentrações suficientes para o meio retornar à concentração inicial de 2,0 g/L de cada. Após a alimentação, a densidade celular aumentou até o valor de 2,2 g/L e estagnou após o provável esgotamento dos suplementos. Não houve perda de meio pela saída dos gases e o ensaio não apresentou contaminação ao final do cultivo (Figura 5.26).

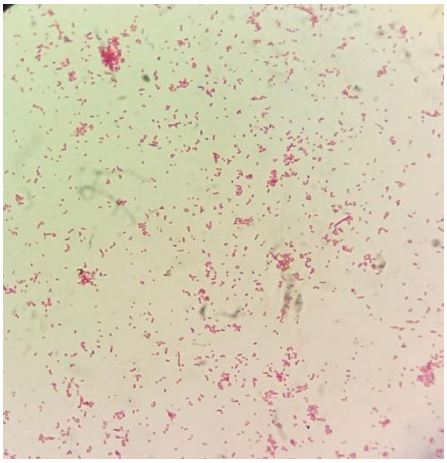

Figura 5.26: Micrografia obtida durante cultivo de *M. hirsuta* no sistema RCB.

Tal como observado no STR, no RCB também ocorreu interrupção do crescimento após o esgotamento dos suplementos, sugerindo que o microrganismo não volta a consumir o metano de forma efetiva quando esgotados os componentes presentes no meio, que auxiliam seu metabolismo. Como dito anteriormente, os suplementos não são utilizados como fonte de carbono, mas os componentes que suportam o crescimento do microrganismo parecem se tornar essenciais uma vez que são oferecidos à bactéria. A interrupção da alimentação com metano em experimentos anteriores provocou uma queda acentuada da concentração celular após o esgotamento dos suplementos. Entretanto, nos casos em que foi mantida a injeção da mistura gasosa, o microrganismo parou o crescimento, mas não apresentou queda na concentração, sugerindo que era capaz de ao menos manter o seu metabolismo ativo com o metano fornecido.

Após os ensaios já apresentados foi realizada uma pausa nos experimentos em colunas de vidro e foi dada sequência nos experimentos em frascos (apresentados nos tópicos anteriores), de modo a tentar otimizar as condições de crescimento para obtenção de concentrações ainda mais elevadas de biomassa. Levando em consideração os resultados obtidos, algumas modificações foram feitas na operação das colunas, tanto em relação à concentração dos suplementos quanto da utilização de tensoativos nos reatores. A Figura 5.27 apresenta um conjunto de resultados dos ensaios em sistema RCB com diferentes condições.

Analisando inicialmente a curva de crescimento do meio NMS 1306 suplementado sem alimentação de metano, é possível observar que não existe crescimento quando metano não é alimentado ao sistema, ou seja, quando não

existe fonte de carbono único no meio, o microrganismo não é capaz de manter seu metabolismo ativo e crescer. Ao comparar o crescimento do microrganismo no RCB com NMS puro com e sem recheio, o ganho promovido pela melhor distribuição da corrente gasosa pode ser verificado. Mesmo que em proporções inferiores ao que foi visto com os valores de K_La no início deste capítulo, as concentrações finais passaram de 0,8 g/L para 1,1 g/L, o que representa um ganho de 37,5%. Tomando como base o observado com o K_La, é possível que para vazões menores de corrente gasosa o uso de recheios acarrete em uma variação ainda maior e mais significativa na produção total de células.

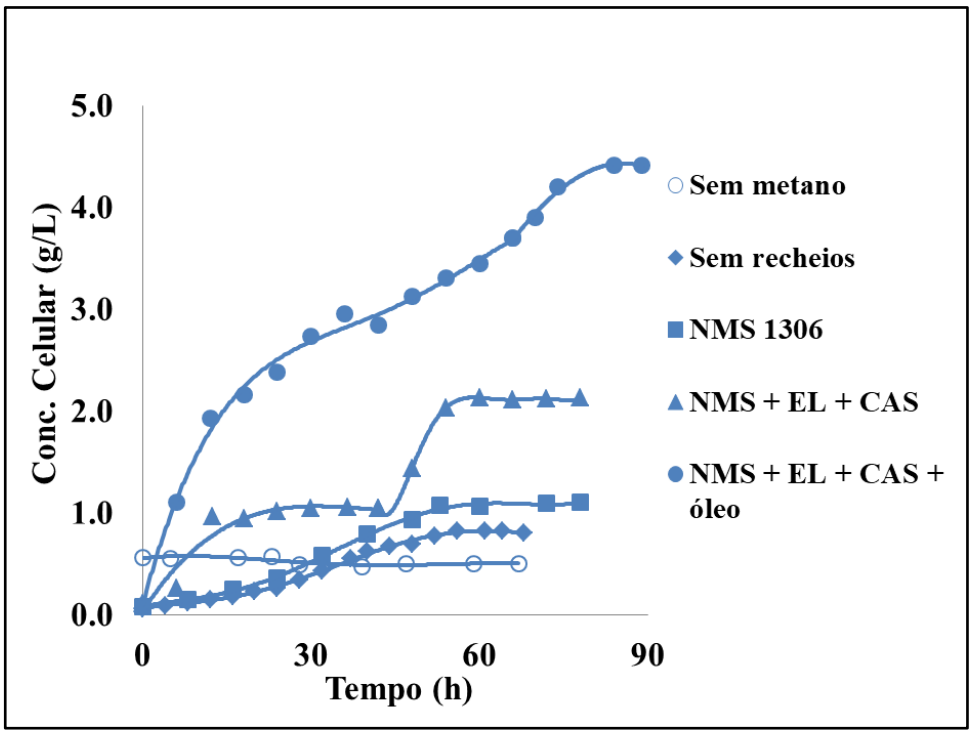

Figura 5.27: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* em **sistema RCB com diferentes condições de operação.** Meio NMS1306 modificado com e sem recheio, NMS 1306 suplementado com e sem metano e NMS 1306 suplementado com adição de óleo de soja (1% v/v). Proporção de alimentação de 30% de metano e 70% de ar.

Já os resultados obtidos para o meio NMS suplementado apresentaram melhoras tanto em relação ao tempo de processo quanto à concentração final de células. O tempo de fermentação para atingir 1,0 g/L foi reduzido de 60 (sem suplemento) para cerca de 20 horas com adição dos suplementos e 6 horas quando adicionado o óleo de soja. A densidade celular alcançada com meio mineral puro foi

de apenas 1,1 g/L, valor esse que aumentou para 2,1 g/L com suplementos e para 4,5 g/L quando da adição de óleo vegetal, um ganho, respectivamente, de 91% e 300% em relação ao meio mineral puro com recheios. Como previsto nos ensaios em frasco agitado, a mudança do sistema de cultivo era uma etapa importante para que altas densidades celulares fossem alcançadas. Utilizando os valores de concentração de suplementos e óleo vegetal em concentrações próximas ao que pôde ser interpretado como melhor resultado nos ensaios de “otimização”, o crescimento teve uma melhora significativa.

Metano, um gás hidrofóbico com baixa solubilidade em água, teve sua transferência para a fase líquida facilitada pela presença do tensoativo, reduzindo a tensão superficial e fazendo aumentar a interação entre o gás (bolhas) e o líquido, consequentemente melhorando sua taxa de solubilização. O uso do óleo, ao contrário do que foi visto em frascos agitados, não causou aprisionamento das células, em parte pelo tamanho do sistema e a baixa concentração do mesmo, e também por se tratar de um sistema com recirculação da fase líquida e alto grau de mistura gerado pelo borbulhamento da fase gasosa. A realização de um planejamento experimental em sistemas como o RCB deve ser pensada, de modo a se otimizar de fato o cultivo das metanotróficas e atingir concentrações celulares que permitam a transição para escalas maiores de produção.

As concentrações finais de células alcançadas em RCB foram muito superiores às obtidas em frascos agitados, o que demonstra uma melhor eficiência de conversão de massa nesse sistema, provavelmente resultante da maior disponibilidade de metano (substrato) e oxigênio na fase líquida. A Figura 5.28 mostra o sistema RCB no final do cultivo, com concentração celular elevada e a Figura 5.29 comprova a presença exclusiva de *Methylocystis hirsuta*.

Figura 5.28: Sistema RCB no final do cultivo de *M. hirsuta,* com elevada concentração celular e nítida turbidez do meio.

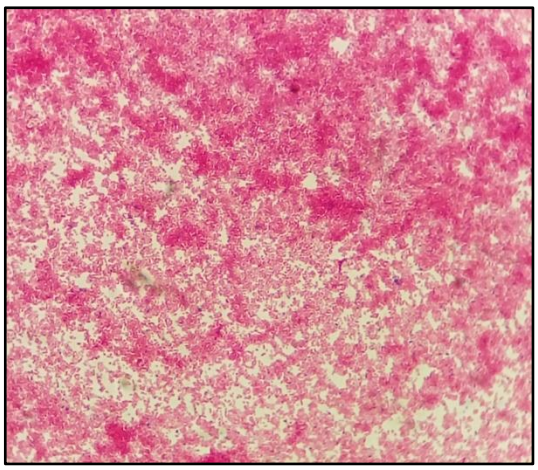

Figura 5.29: Micrografia obtida no final do cultivo de M. hirsuta no sistema RCB com a presença de óleo de soja.

Novas formas de operação desses biorreatores podem ser sugeridas, para reaproveitar a mistura borbulhada ao sistema. Como o cultivo em meios com fonte de carbono único é lento, com crescimento celular em taxas reduzidas mesmo com suplementação, a reutilização dos gases contribui para a viabilização do processo e pode ser um fator decisivo em sua futura utilização industrial. A aquisição de outros dispositivos que possam promover o retorno dos gases ao sistema, como um compressor, pode fazer com que a alimentação intermitente testada nos reatores agitados mecanicamente seja efetiva no RCB, promovendo a passagem do gás continuamente pelo meio reacional e realizando a troca da mistura em intervalos de tempo regulares.

5.4. Avanços obtidos no cultivo de *M. hirsuta*

Com o desenvolvimento do trabalho foram sendo modificados fatores que aumentaram consideravelmente as concentrações celulares obtidas durante os ensaios. É importante ressaltar que as concentrações passaram de valores mínimos, como 0,3 g/L de células em massa seca, para até 4,5 g/L nos experimentos finais no sistema desenvolvido no LADEBIO. A Figura 5.30 apresenta a evolução da produtividade de biomassa obtida durante a tese e corrobora a importância de todas as modificações que foram realizadas tanto no meio de cultivo utilizado quanto na forma de condução deste bioprocesso.

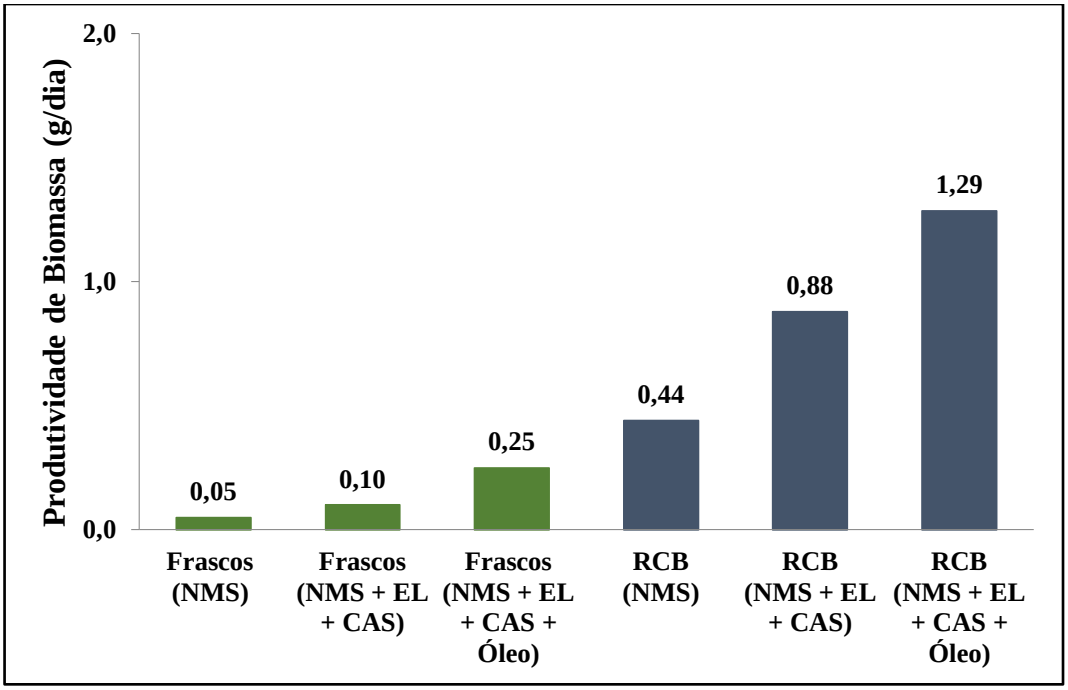

Figura 5.30: Evolução da produtividade de biomassa durante o desenvolvimento da tese.

5.5. Ensaios para caracterização da biomassa bacteriana

A caracterização da biomassa bacteriana foi realizada de acordo com os protocolos descritos no Capítulo 4, utilizando amostras dos cultivos com meio NMS modificado, meio NMS suplementado e meio NMS suplementado com adição de óleo de soja. As amostras foram analisadas em triplicata e os resultados estão expostos na Tabela 5.9.

Tabela 5.9: Composição nutricional das biomassas secas obtidas com M. hirsuta em três diferentes meios de cultivo.

	Teor (%)		
	NMS 1306 modificado	NMS 1306 suplementado	NMS 1306 suplementado + óleo
Proteínas	**25,44 ± 0,80**	**30,88 ± 4,67**	**41,75 ± 0,93**
Carboidratos	31,65 ± 4,57	33,54 ± 0,62	51,50 ± 4,94
Lipídeos	4,17 ± 0,75	3,31 ± 0,64	2,72 ± 0,38
Cinzas	10,94 ± 0,87	10,24 ± 0,54	6,96 ± 0,37
Total	72,19	77,96	102,92

Analisando os resultados obtidos nos ensaios é possível observar um baixo teor de proteínas quando comparado ao esperado para bactérias (em média de 50 a 65%, como apresentado na Tabela 2.6). Em contrapartida, os teores de carboidratos estão relativamente altos, principalmente na amostra com óleo vegetal, enquanto que teores de cinzas e lipídeos estão de acordo com o esperado. O metabolismo de organismos metanotróficos, com sua fonte de carbono único e a necessidade de criação de todas as moléculas complexas necessárias à sua sobrevivência e seu desenvolvimento pode ter ocasionado um baixo rendimento em proteínas. Este fato fica mais evidenciado quando oferecida suplementação para o meio com extrato de levedura, casaminoácidos e o óleo vegetal, com um aumento progressivo do teor proteico conforme a disponibilização de nutrientes adicionais no meio de cultivo e, também, de mais substrato e oxigênio, no caso envolvendo a utilização de óleo vegetal.

Os ensaios realizados, como explicado no Capítulo 4, utilizaram metodologias descritas na literatura para outros tipos de biomassa, em parte animal, parte vegetal, mas não especificamente para bactérias. O laboratório onde as análises foram realizadas é especializado no cultivo de microalgas. Então, a análise de composição nutricional é realizada com células que possuem composição bastante distinta do observado no presente estudo, com modificações visando otimizar as análises daqueles microrganismos.

Observando apenas os valores presentes na tabela, conclui-se que o uso de suplementos favorece o aumento do teor de proteínas na biomassa produzida, com o uso do óleo aumentando ainda mais este percentual, com uma variação positiva de 64% no teor proteico da amostra. O teor de carboidratos se manteve constante quando da adição de suplementos e ficou alterado ao adicionar óleo no cultivo,

apresentando um aumento de cerca de 60% em relação às outras duas composições de meio. Analisando o somatório dos teores vê-se que a amostra do cultivo com óleo ultrapassa 100%, indicando que houve uma leitura superestimada de pelo menos um dos componentes, o que pode ter sido causado por alguma interferência do óleo no método de análise ou algum outro fator relacionado ao seu uso. Para o caso de um teor de carboidratos igual para as três amostras (na faixa dos 33%), todas elas estariam com somatório das frações na casa dos 80%, valor considerado coerente, tendo em vista outros compostos que não poderiam ter sido medidos pelas metodologias empregadas e que podem representar mais de 20% da composição em massa seca da célula, como é o caso dos ácidos nucleicos (Miller & Litsky, 1976).

O fato de os cultivos em frasco apresentarem baixo rendimento em célula unido ao alto custo operacional dos biorreatores, acaba por não permitir a realização de ensaios que necessitem de grande quantidade de biomassa, devido à dificuldade para obtenção da mesma. Análises por métodos mais precisos, como por analisadores CHN ou a análise da composição centesimal, devem ser feitas de modo a se obter os teores exatos de cada componente nas biomassas bacterianas obtidas durante os cultivos.

Capítulo 6

Conclusões

O trabalho realizado envolveu aspectos desafiadores de microbiologia, da engenharia bioquímica e de bioprocessos em geral, com avanços interessantes no que tange à concentração final de células, ao tempo de processo, à utilização de diferentes modelos de biorreator, entre outros. As conclusões que podem ser elencadas a partir desses resultados estão expostas na sequência:

1. As bactérias metanotróficas da espécie *Methylocystis hirsuta* apresentaram capacidade de consumir metano como fonte de carbono em meio mineral mínimo, corroborando informações da literatura. As baixas taxas de crescimento, ocasionando longos tempos de cultivo, levaram à necessidade de se buscar por suplementos para o meio de cultivo e de se desenvolver um sistema reacional que aumentasse as taxas de transferência de metano (substrato) e do oxigênio (microorganismo aeróbio) para a fase líquida, permitindo assim sua assimilação pela célula bacteriana.

2. Ensaios com variação na concentração dos componentes do meio mostraram que podem ser mantidos os seus valores mínimos, o que permite o uso de pequenas concentrações dos componentes e, consequentemente, baixo custo do meio de cultivo. Ao utilizar suplementos pela primeira vez, com o objetivo de observar o comportamento da população bacteriana na presença destes, o metanol e a ureia se mostraram prejudiciais. O primeiro pelo fato de a enzima

que promove a assimilação na via metabólica estar associada à enzima que oxida o metano a metanol, e quando o metano não é disponibilizado a bactéria não é capaz de utilizar este metanol, que fica livre na célula, potencializando seu efeito tóxico, e o segundo por se tratar de uma molécula que pode inibir competitivamente a enzima metano monooxigenase, sendo oxidada a hidroxilamina, que por sua vez não será aproveitada pela ausência da enzima hidroxilamina oxidoredutase.

3. Os ensaios com diferentes proporções dos gases na alimentação apresentaram valores de crescimento celular semelhantes, o que levou à utilização da menor concentração de metano testada, visando reduzir o consumo de matéria-prima. Em relação à fonte de carbono utilizada no processo, ensaios com fontes contendo ligações C-C confirmaram a característica de metano dependente de *Methylocystis hirsuta,* não apresentando nenhum crescimento na ausência de metano e na presença de açúcares, polióis e outros substratos com mais de um carbono em sua molécula.

4. O uso de extrato de levedura em concentração de 2 g/L aumentou o crescimento da bactéria de 0,29 g/L para 0,46 g/L, o que corresponde a um incremento de cerca de 60% na concentração final de células. Fazendo a mesma análise para a peptona e o casaminoácidos, o crescimento chegou a 0,33 e 0,41 g/L, com ganho de 14 e 41%, respectivamente. A mistura de extrato de levedura e peptona, com 2 g/L de cada suplemento, aumentou em 38% a concentração celular, enquanto que a de extrato de levedura e casaminoácidos em 89%. Com base nestes resultados, o uso da peptona não se mostrou interessante, com os experimentos seguintes explorando a mistura de extrato de levedura e casaminoácidos em diferentes concentrações e proporções.

5. Ao utilizar óleo mineral e perfluorocarbono para aumentar a solubilidade dos gases, o efeito foi diferente para cada um desses agentes tensoativos. O óleo de soja (2% v/v) aumentou em 47% a densidade celular e a mistura óleo de soja, extrato de levedura e casaminoácidos (1% v/v e 1 g/L) aumentou a densidade em 75%. O PFC, por outro lado, causou queda no crescimento celular, gerando

concentrações cerca de 9% inferiores ao controle (para 2% v/v). Apesar do efeito negativo do PFC, o uso dos suplementos ainda conseguiu gerar um crescimento superior ao controle (47%), comprovando, mais uma vez, a essencialidade da suplementação do meio e a sua grande influência no crescimento.

6. Ao realizar o planejamento experimental visando otimização do meio para crescimento de *M. hirsuta* foi observada uma variação pequena das concentrações celulares finais, indicando uma influência de outros fatores no resultado final. A maior concentração celular foi de 1,03 g/L, com concentrações de 2,34 g/L de extrato de levedura, 1,5 g/L de casaminoácidos e 1,5% (v/v) de óleo de soja. A análise estatística dos dados não foi conclusiva, sendo necessário utilizar outro sistema para realização dos ensaios, onde a influência no resultado seja proveniente apenas das modificações no meio de cultivo.

7. O K_La obtido com a utilização do biorreator *airlift* de bancada aumentou de 36,1 para 54,4 h^{-1} com a variação da vazão de 4 para 8 L/min e manutenção do mesmo tipo de borbulhador e temperatura de processo. Já o ganho para o uso de borbulhador sinterizado em relação ao borbulhador de 6 furos de 1 mm foi de 17 para 54,4 h^{-1}. A mudança de temperatura causou uma variação não linear do K_La, não sendo possível fazer uma comparação direta entre as 3 temperaturas utilizadas, mas permitindo que se observasse um padrão de valores inferiores para a temperatura de 30°, seguida de 24 e 37°C, que apresentou os melhores resultados de transferência no geral. O uso de recheios randômicos, para o biorreator *airlift*, gerou uma influência negativa nos valores de K_La, prejudicando a transferência de massa.

8. O uso de recheios no sistema de coluna de bolhas melhorou a eficiência de transferência em até 170% para vazões baixas de ar (2 L/min) e em 114% para a vazão de 4 L/min utilizada no cultivo do microrganismo. A comparação realizada entre os diferentes tipos de biorreatores mostrou uma vantagem para o sistema de colunas de bolhas, com valores de K_La atingindo 160 h^{-1} enquanto que para o *airlift* o máximo foi de 54,4 h^{-1} utilizando as mesmas vazões de operação.

9. Ao transferir o processo dos frascos agitados para os biorreatores, as concentrações celulares obtidas aumentaram substancialmente, sendo alcançados valores de 2,6 g/L em reatores agitados mecanicamente e 4,5 g/L no sistema de coluna de bolhas. Estes resultados corroboram a necessidade e importância do controle das condições de processo, como pH (para o STR), temperatura e agitação, bem como de uma transferência de massa mais eficiente dos gases para a fase líquida, permitindo assim o acesso do microrganismo ao substrato.

10. O processo em biorreator com alimentação por pulsos não foi eficiente, falhando em suprir oxigênio e metano para o microrganismo. A vazão de reciclo pode ter sido baixa, sendo necessário um compressor para reinjetar a mistura gasosa e facilitar a solubilização dos gases. Uma nova tentativa de conduzir o processo dessa forma, utilizando desta vez os reatores tipo coluna de bolhas, pode gerar resultados melhores, com maior economia de gás.

11. A transferência de massa do metano para a fase líquida permanece como um aspecto crítico desse processo, deixando em aberto o desenvolvimento de técnicas para um contato ainda mais eficiente entre gás e líquido. As concentrações celulares obtidas, além dos altos valores de K_La, tornam o sistema RCB uma nova e promissora configuração de biorreatores para o cultivo de bactérias metanotróficas, com a significativa vantagem competitiva de reduzir os custos operacionais, uma vez que a agitação mecânica não é necessária. Novas configurações, com mais colunas em série, uso de diferentes tipos de recheio e reciclo da fase gasosa podem ser testadas, aumentando ainda mais a eficiência e a economia deste sistema inovador para o cultivo de metanotróficas. Uma alternativa seria a utilização de reatores pressurizados, aumentando assim a solubilização dos gases e facilitando o acesso do microorganismo ao seu substrato.

12. A análise da composição nutricional da biomassa gerada apresentou um baixo teor de proteínas no extrato utilizando meio mineral, mostrando a essencialidade

de suplementação do meio não só para que se obtenha um maior crescimento celular, com altas concentrações de células no meio de cultivo, mas também para um incremento no teor proteico do material, aumentando assim a produtividade em proteínas e tornando o processo economicamente mais rentável, mesmo com os gastos relativos à adição destas biomoléculas ao cultivo.

Propostas de continuação do trabalho

A partir destes resultados é possível visualizar os próximos passos do estudo de produção de proteínas de unicelular. O foco principal deverá ser nos problemas de engenharia relacionados à mudança para escala piloto, principalmente no que tange à transferência de massa e disponibilidade de substrato e oxigênio para o microrganismo, bem como um reaproveitamento dessa corrente gasosa.

Seguem abaixo alguns tópicos a serem explorados em trabalhos futuros:

- Realizar ensaios de $K_L a$ em biorreator *airlift* em escala piloto, de forma a obter a melhor configuração de sistema para o processo, e promover de maneira eficiente a mudança de escala, incialmente para o airlift de 10 L e, em seguida, para o piloto de 75 L de volume útil*;*

- Desenvolver um procedimento experimental para o uso de contactores, visando à alimentação dos gases já dissolvidos ao biorreator;

- Utilizar outros suplementos, tensoativos e diferentes combinações destes na composição do meio, observando o efeito no crescimento celular e também a composição nutricionaltivo do cultivo, de forma a maximizar a produção de proteínas sem adicionar nenhum composto que seja prejudicial a este propósito;

- Realizar ensaios utilizando gás natural e consórcios bacterianos, de forma a investigar o consumo dos gases presentes no gás natural, que não metano, a produção de metabólitos secundários e o crescimento das bactérias não-metanotróficas do consórcio pelo uso destes metabólitos.

Referências Bibliográficas

ADEDAYO, M.R.; AJIBOYE, E.A.; AKINTUNDE, J.K. & ODAIBO, A. **Single Cell Proteins: As Nutritional Enhancer.** Advances in Applied Science Research, 2, 396-409, 2011.

ALVAREZ, R. & ENRIQUEZ, A. **Nucleic acid reduction in yeast.** Applied Microbiol. Biotechnology, 29, 208-210, 1988.

AMARAL, P.F.F. **Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em Biorreator Multifásico.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

AMERICAN SOCIETY OF CIVIL ENGINEERS (ASCE). **A standard for the measurement of oxygen transfer in clean water.** New York, 1984.

ANP. **Boletim Mensal da Produção de Petróleo e Gás Natural.** Disponível em: http://www.anp.gov.br/publicacoes/boletins-anp/2395-boletim-mensal-da-producao-de-petroleo-e-gas-natural. Acesso em: 15/07/2018.

ANTHONY, C. **The biochemistry of methylotrophs**. Department of Biochemistry. University of Southampton. Academic Press, 1982.

ANTHONY, C. **Assimilation of carbon in methylotrophs, 79–109. In Goldberg, I. and Rokem, J.S. (ed.), Biology of methylotrophs.** Butterworth-Heinemann, Massachusets, 1991.

ANTHONY, C. **The c-type cytochromes of methylotrophic bacteria.** Biochem. Biophys. Acta, 1099, 1–15, 1992.

ANTHONY, C. **How half a century of research was required to understand bacterial growth on C1 and C2 compounds; the story of the serine cycle and the ethylmalonyl-CoA pathway.** Science progress, 94, 109-137, 2011.

ANTONIASSI, R. & LAGO, R.C.A. **Lipid extraction from different matrices.** International workshop on fats, oils and oilseed analysis. Rio de Janeiro: IUPAC,160-168, 2000.

ANVARI, M. & KHAYATI, G. **Submerged yeast fermentation of cheese whey for protein production and nutritional profile analysis.** Advance Journal of Food Science and Technology, 3, 122-126, 2011.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC, 18th ed.** Gaithersburg: AOAC International, 2005.

AUED-PIMENTEL, S. & ZENEBON, O. **Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação.** Rev Inst Adolfo Lutz, 68, 167-181, 2009.

AUMAN, A.J.; SPEAKE, C.C. & LIDSTROM, M.E. ***nif*H Sequences and Nitrogen Fixation in Type I and Type II Methanotrophs.** Applied and Environmental Microbiology, 67, 4009-4016, 2001.

BAMBERG, J.H. **British Petroleum and global oil, 1950-1975: The challenge of nationalism.** British Petroleum Series, Cambridge University Press, 3, 426–428, 2000.

BD. Disponível em: <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/brochures/br_1_222880_academia.pdf>. Acesso em: 17/02/2016.

BLIGH, E.G. & DYER, W.J. **A rapid method of total lipid extraction and purification.** Canadian Journal Biochem Physiol., 37, 911-917, 1959.

BODROSSY, L.; HOLMES, E.M.; HOLMES, A.J.; KOVÁCS, K.L. & MURRELL, J.C. **Analysis of 16s rRNA and methane monooxygenase gene sequences reveals a novel group of thermotolerant and thermophilic methanotrophs, Methylocaldum gen. nov.** Arch. Microbiology, 168, 493-503, 1997.

BOTHE, H.; JENSEN, K.M.; MERGEL, A.; LARSEN, J.; JøRGENSEN, C. *et al*. **Heterotrophic bacteria growing in association with Methylococcus capsulatus (Bath) in a single cell protein production process.** Applied Microbiology and Biotechnology, 59, 33-39, 2002.

BOWMAN, J.P. **The methanotrophs – the families Methylococcaceae and Methylocystaceae Ch. 3.1.14.** Prokaryotes Vol. 5, 266–289, 2006.

BOWMAN, J.P.; SLI, L.I.; NICHOLS, P.D. & HAYWARD, A.C. **Revised taxonomy of the methanotrophs: description of Methylobacter gen. nov., emendation of Methylococcus, validation of Methylosinus and Methylocystis species, and a proposal that the family Methylococcaceae includes only the group I methanotrophs.** Int. J. Syst. Bacteriol., 43, 735–753, 1993.

BRIGMON, R.L.; FRANCK, M.M.; BRAY, J.S.; PATEL, R.B.; BERRY, C.J. *et al*. **Immunoassays for bacteria that degrade trichloroethylene.** In Annals of the 95th General Meeting American Society for Microbiology, Washington, 1995.

BUCKLEY, D.H. & SCHIMIDT, T.M. **Exploring the diversity of soil: a microbial rainforest.** Biodioversity of Microbial Life. Wiley-Liss Inc., 183–208, 2002.

CERRI, M.O. **Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores Airlift de circulação interna geometricamente semelhantes.** São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2009.

CHISTI, M.Y. **Airlift bioreactors.** 1º Ed. London: Elsevier, 1989.

CHOU, S.C. & GOLDSTEIN, A.. **Chromogenic groupings in the Lowry protein determination.** Biochem. Journal, 75, 109, 1960.

CICERONE, R.J. & OREMLAND, R.S. **Biogeochemical aspects of atmospheric methane.** Global Biogeochem. Cycles, 2, 299–327, 1988.

DALTON, H. **Structure and mechanism of action of the enzymes involved in methane oxidation**. Applications of enzyme biotechnology, Plenum Press, New York, 1991.

DALTON, H. & STIRLING, D.I. **Co-metabolism.** Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 297, 481-496, 1982.

DANIELL, J.; KOPKE, M. & SIMPSON, S.D. **Commercial Biomass Syngas Fermentation.** Energies, 5, 5372-5417, 2012.

DANCKWERTS, P.V. **Significance of Liquid-Film Coefficients in Gas Absorption.** Ind. Eng. Chem., 43, 1460-1467, 1951.

DAVIDSON, V.L.; NEHER, J. W. & CECCHINI, G. **The biosynthesis and assembly of methanol dehydrogenase in bacterium W3A1.** J. Biol. Chem., 260, 9642–9647, 1985.

DE VISSCHER, A.; BOECKX, P. & VAN CLEEMPUT, O. "**Artificial methane sinks"** in REAY, DS, HEWITT, CN & GRACE, J (eds) "Greenhouse gas sinks". Wallingford: Oxfordshire, 2007.

DEDYSH, S.N.; PANIKOV, N.S. & TIEDJE, J.M. **Acidophilic methanotrophic communities from Sphagnum peat bogs.** Appl. Environ. Microb., 64, 922–929, 1998.

DEDYSH, S.N.; LIESACK, W.; KHMELENINA, V.N.; SUZINA, N.E. & TROTSENKO, Y.A. *et al*. **Methylocella palustris gen nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine pathway methanotrophs.** Int. J. Syst. Evol. Microbiology, 50, 955–969, 2000.

DEDYSH, S.N.; KHMELENINA, V.N.; SUZINA, N.E.; TROTSENKO, Y.A.; SEMRAU, J.D. *et al.* **Methylocapsa acidiphilagen. nov., sp. nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogen fixing acidophilic bacterium from Sphagnum bog.** Int. J. Syst. Evol. Microbiology, 52, 251–256, 2002.

DEDYSH, S.N.; BERESTOVSKAYA, Y.Y.; VASYLIEVA, L.V.; BELOVA, S.E.; KHMELENINA, V.N. *et al.* **Methylocella tundrae sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic tundra peatlands.** Int. J. Syst. Evol. Microbiology, 54, 151–156, 2004.

DIJKHUIZEN, L.; LEVERING, P.R. & VRIES, G.E. **The physiology and biochemistry of aerobic methanol-utilizing gram-negative and gram-positive bacteria. In J. C. Murrell and H. Dalton (ed.), Methane and methanol oxidizers.** Plenum Press, New York, 149–181, 1992.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. **Colorimetric method for determination of sugars and related substances.** Anal. Chem., 26, 350, 1956.

DUNFIELD, P.F.; KHMELENINA, V.N.; SUZINA, N.E.; TROTSENKO, Y. & DEDYSH, S.N. **Methylocella silvestris sp. nov., a novel methanotroph isolated from an acidic forest cambisol.** Int. J. Syst. Evol. Microbiology, 53, 1231–1239, 2003.

DUNFIELD, P.F.; YURYEV, A. & SENIN, P. **Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia.** Nature, 450, 879–883, 2007.

DURRE, P. & EIKMANNS, B.J. **C1-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation.** Current Opinion in Biotechnology, 35, 63-72, 2015.

DUXBURY, J.M.; HARPER, L.A. & MOSIER, A.R. **Contributions of agroecosystems to global climate change. In Harper, L.A.; Mosier, A.R. & Duxbury, J.M. (eds). Agricultural ecosystem effects on trace gases and global climate change.** Wisconsin: American Society of Agronomy, 1-18, 1993.

ENGINEERING TOOLBOX. **Solubility of Gases in Water.** Disponível em: <http://www.engineeringtoolbox.com/gases-solubility-water-d_1148.html>. Acesso em: 19/01/2016.

EPA. **Methane and nitrous oxide emissions from natural sources.** Office of Atmospheric Programs. Disponível em: http://www.epa.gov/. Acesso em 2015.
ESRL (Earth System Research Laboratory). Disponível em < http://www.cmdl.noaa.gov/ccgg>. Acesso em 2015.

FOLCH, J.; LEES, M. & STANLEY, G. H. S. **A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.** Journal of Biol Chem, 226, 497-509, 1957.

FRANK, J.; JANVIER, M.; HEIBER-LANGER, I.; DUINE, J.A.; GASSES, G. *et al*. **Structural aspects of methanol oxidation in Gram-negative bacteria. In Microbial growth on C1 compounds.** Intercept Press Ltd., 209–220, 1993.

GARCIA-OCHOA, F. & GOMES, E. **Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview.** Biotechnology Advance, 27, 153–176, 2009.

GÁS NATURAL. Disponível em: http://gasnet.com.br/gasnatural/gas_completo.asp#gas11. Acesso em: 05/01/2016.
GULLIVER, J.S. **Introduction to chemical transport in the environment.** Cambridge Univ. Press, New York, 2007.

HAN, B.; CHEN, Y.; ABELL, G.; JIANG, H.; BODROSSY, L. *et al.* **Diversity and activity of methanotrophs in alkaline soil from a Chinese coal mine.** FEMS Microbiol. Ecol., 70, 40–51, 2009.

HANSON, R.S. & HANSON, T.E. **Methanotrophic bacteria.** Microbiological Reviews, 60, 439–471, 1996.

HASSAN, I.T.M. & ROBINSON, C.W. **Mass transfer coefficients in mechanically agitated gas—aqueous electrolyte dispersions.** The Canadian Journal of Chemical Engineering, 58, 198-205, 1980.

HENSTRA, A.M.; SIPMA, J.; RINZEMA, A.; STAMS, A.J.M. **Microbiology of synthesis gas fermentation for biofuel production.** Current Opinion in Biotechnology, v. 18, p. 200-206, 2007.

HIGBIE, R. **The Rate of Absorption of a Pure Gas into a Still Liquid During Short Periods of exposure.** Trans. Am. Inst. Chem. Engrs., 35, 365-389, 1935.

HOGAN, K.B.; HOFFMAN, J.S. & THOMPSON, A.M. **Methane on the greenhouse agenda.** Nature, 354, 181–182, 1991.

HOLMBERG, K. *et al*. **Surfactants and polymers in aqueous solutions**. 2. ed. Götemborg, Sweden: John Wiley & Sons, 7-23, 2002.

HU, A. & LU, Y. **The differential effects of ammonium and nitrate on methanotrophs in rice field soil.** Soil Biology & Biochemistry, 85, 31-38, 2015.

INFOPETRO. **Uma Agenda para o Gás Natural no Novo Governo.** Disponível em: http://infopetro.wordpress.com/2011/01/03/uma-agenda-para-o-gas-natural-no-novo-governo/. Acesso em: 20/08/2014.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). **Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability.** Disponível em: https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/wg2/ar4_wg2_full_report.pdf.

ISLAM, T.; JENSEN, S.; REIGSTAD, L.J. & BIRKELAND, N. K. **Methane oxidation at 55 1C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the Verrucomicrobia phylum.** P Natl. Acad. Sci. USA, 105, 300–304, 2008.

KALYUZHNAYA, M.G.; PURI, A.W. & LIDSTROM, M.E. **Metabolic engineering in methanotrophic bacteria.** Metabolic Engineering, 29, 142-152, 2015.

KARGI, F. & MOO-YOUNG, M. **Transport phenomena in bioprocess.** Comprehensive Biotechnology, 2, 5-56, 1985.

KHADEM, A.F.; POL, A.; JETTEN, M.S.M. & OP DEN CAMP, H.J.M. **Nitrogen fixation by the verrumicrobial methanotroph '*Methylacidiphilum fumariolicum*' SolV.** Microbiology, 156, 1052-1059, 2010.

KHALIL, M.A.K. & RASMUSSEN, R.A. **The changing composition of the Earth's atmosphere, In Composition, Chemistry, and Climate of the Atmosphere**. Van Nostrand Reinhold, New York, 1995.

KHMELENINA, V.N.; KALYUZHNAYA, M.G.; STAROSTINA, N.G.; SUZINA, N.E. & TROTSENKO, Y.A. **Isolation and characterization of halotolerant alkaliphilic methanotrophic bacteria from Tuva Soda Lakes.** Curr. Microbiol., 35, 257–261, 1997.

KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR., A.. **Purificação de produtos biotecnológicos.** In: SCHIMIDELL, W. (ed). Biotecnologia Industrial Vol.2. São Paulo: Blucher, 2001, 493-522.

KLASSON, K.T.; ACKERSON, M.D.; CLAUSEN, E.C. & GADDY, J.L. **Bioconversion of synthesis gas into liquid or gaseous fuels.** Enzyme Microb. Technol., 14, 602-608, 1992.

KUHAD, R.C.; SINGH, A.; TRIPATHI, K.K.; SAXENA, R.K. & ERIKSSON, K.E.L. **Microorganisms as an alternative source of protein.** Nutr. Rev., 55, 65–75, 1997.

LEES, V.; OWENS, N.J. & MURRELL, J.C. **Nitrogen metabolism in marine methanotrophs.** Arch Microbiology, 157, 60–65, 1991.

LEGLER, G.; MULLER-PLATZ, C.M.; MENTGES-HETTKAMP, M.; PFLIEGER, G. & JULICH, E.. **On the chemical basis of the Lowry protein determination.** Anal. Biochem., 150, 278, 1985.

LEWIS, W.K. & WHITMAN, W.G. **Principles of Gas Absorption.** Industrial and Engineering Chemistry, 16, 1215-1220, 1924.

LIDSTROM, M.E. **Isolation and characterization of marine methanotrophs.** Antonie van Leeuwenhoek, 54, 189–199, 1998.

LINDNER, A.S.; PACHECO, A.; ALDRICH, H.C.; STANIEC, A.C.; UZ, I. *et al*. ***Methylocystis hirsuta* sp. nov., a Novel Methanotroph Isolated from a Groundwater Aquifer.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57, 1891–1900, 2007.

LIPSCOMB, J.D. **Biochemistry of the soluble methane monoxygenase.** Annu. Rev. Microbiol., 48, 371–399, 1994.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** Journal Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.

METHANE. Disponível em: http://pt.wikipedia.org/wiki. Acessado em: 05 jan. 2012.

METHANOTROPH COMMONS. Disponível em: <www.methanotrophs.org>, acesso contínuo entre 05/01/2016 e 17/07/2018.

MILLER, M. & LITSKY, W. **Single Cell Protein. In Industrial Microbiology.** McGraw-Hill Inc, Mishawaka, 1976.

MOTA, M.F.; SOUZA, M.F.; BON, E.P.; RODRIGUES, M.A.; FREITAS, S.P. *et al.* **Colorimetric protein determination in microalgae (Chlorophyta): association of milling and SDS treatment for total protein extraction.** J. Phycol., 0, 0, 2018. DOI:10.1111/jpy.12754.

MURRELL, J.C. & DALTON, H. **Nitrogen Fixation in Obligate Methanotrophs.** Journal of General Microbiology, 129, 3481-3486, 1983.

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

OLDENHUIS, R, VINK, RLJM, JANSSEN, DB & WITHOLT, B. **Degradation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by Methylosinus trichosporium OB3b expressing soluble methane monooxygenase.** Appl. Environ. Microbiol., v.55, 2819–2826, 1989.

OMEL'CHENKO MV, VASIL'EVA LV, ZAVAZIN GA, SAVEL'EVA ND, LYSENKO AM, MITYUSHINA LL, KHMELENINA VN, TROTSENKO YA. **A novel psychrophilic methanotroph of the genus Methylobacter.** Microbiology (Russian), v. 65, p. 339–343, 1996.

OP DEN CAMP, H.J.M.; ISLAM, T.; STOTT, M.B.; HARHNGI, H.R.; HYNES, A. *et al*. **Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia.** Environ. Microbiol. Rep., 1, 293–306, 2009.

PARAJÓ, J.C.; SANTOS, V.; DOMINGUEZ, H.; VÁZQUEZ M. **NH4OH-based pretreatment for improving the nutritional quality of single cell protein.** Applied Biochem. Biotechnology, 55, 133-149, 1995.

PEREIRA JR., N.; BON, E.S.P. & FERRARA, M.A. **Tecnologia de Bioprocessos**, ed. N. Pereira Jr., Gráfica da UFRJ, 2008. Disponível eletronicamente em www.ladebio.org.br.

PEREIRA JR., N. **Relatório Técnico: Produção de proteínas para alimentação animal a partir de gás natural.** Rio de Janeiro, 70 p., 2012.

PEREIRA JR., N. **Notas de Aula: Biorreatores.** Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

PETROBRAS. **Plano de Negócios e Gestão 2013-2017**. Disponível em: http://www.investidorpetrobras.com.br/pt/apresentacoes/apresentacao-do-png-2013-2017.htm>. Acesso em: 20/08/2014.

PETROBRAS. **Plano de Negócios e Gestão 2018-2022**. Disponível em: http://www.petrobras.com.br/pt/quem-somos/estrategia/plano-de-negocios-e-gestao/>. Acesso em: 15/07/2018.

PIEJA, A.J.; ROSTKOWSKI, K.H. & CRIDDLE, C.S. **Distribution and Selection of Poly-3 Hydroxybutyrate Production Capacity in Methanotrophic Proteobacteria.** Environmental Microbiology, 62, 564–573, 2011.

POL, A.; HEIJMANS, K.; HARHANGI, H.R.; TEDESCO, D.; JETTEN, M.S.M. *et al.* **Methanotrophy below pH 1 by a new Verrucomicrobiaspecies.** Nature, 450, 874–878, 2007.

RAHALKAR, M.; BUSSMANN, I.; & SCHINK, B. **Methylosoma difficile gen. nov., sp. nov., a novel methanotroph enriched by gradient cultivation from littoral sediment of Lake Constance.** Int. Journal Syst. Evol. Microbiology, 57, 1073–1080, 2007.

SANGWAN, P.; KOVAC, S.; DAVIS, K.E.R.; SAIT, M. & JANSSEN, P.H. **Detection and cultivation of soil Verrucomicrobia.**Appl. Environ. Microbiology, 71, 8402–8410, 2005.

SEMRAU, J.D.; DISPIRITO, A.A. & YOON, S. **Methanotrophs and copper.** FEMS Microbiol. Rev., 34, 496–531, 2010.

SIEBURTH, J.Mc.N.; JOHNSON, P.W.; EBERHART, M.A.; SIERACKI, M.E.; LIDSTROM, M.E. *et al*. **The first methane-oxidizing bacterium from the upper mixing layer of the deep ocean: Methylomonaspelagicasp**. Curr. Microbiology, 14, 285–293, 1987.

SOROKIN, D.Y.; JONES, B.E. & KUENEN, J.G. **An obligate methylotrophic, methane-oxidizing Methylomicrobiumspecies from a highly alkaline environment.** Extremophiles, 4, 145–155, 2000.

SCHOELL, M. **The hydrogen and carbon isotopic composition of methane from natural gases of various origins.** Geochimica et Cosmochimica Acta, 44, 649-661, 1980.

SHEEHAN, B.T. & JOHNSON, M.J. **Production of bacterial cells from methane**, Appl. Microbiology, 21, 511–515, 1971.

SILVA, J.B.A.; MANCILHA, I.M.; VANNETTI, M.C.D. & TEIXEIRA, M.A. **Microbial protein production by Paecilomyces variotii cultivated in eucalyptus hemicellulosic hydrolyzate.** Bioresource Technology, 52, 197-200, 1995.

SIMÕES, A.C.P. **Crescimento de *Methylobacterium organophilum* em methanol visando à produçao de proteínas de unicelular.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

SKOGMAN, H. **The Symba Process**. Starch, 28, 278–282, 1976.

SKREDE, A., BERGE, G.M., STOREBAKKEN, T., HERSTAD, O., AARSTAD, K.G. *et al.* **D*igestibility* of bacterial protein grown on natural gas in mink, pigs, chicken and Atlantic salmon**. Animal Feed Science and Technology, 76, 103-116, 1998.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TENPLETON, D. *et al*. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP).** NREL National Renewable Energy Laboratory, 2008.

STEIN, L.Y. & KLOTZ, M.G.. **Nitrifying and denitrifying pathways of methanotrophic bacteria.** Biochemical Society Transactions, v. 39, p. 1826-1831, 2011.

TAGUCHI, H. & HUMPHREY, A.E. **Dynamic Measurement of the Volumetric Oxygen Transfer Coefficient in Fermentation Systems.** Journal of Fermentation Technology, 44, 881-889, 1966.

THEISEN, A.R. & MURRELL, J.C. **Facultative methanotrophs revisited.** J. Bacteriol., 187, 4303–4305, 1995.

TOUROVA, T.P.; OMEL'CHENKO, M.V.; FEGEDING, K.V. & VASIL'EVA. **The phylogenetic position of Methylobacterpsychrophilussp**. Microbiology (Russian), 68, 493–495, 1999.

UNIBIO. Disponível em: <http://www.unibio.dk/>. Acessado em 17/01/2016.

USBIO. Disponível em: <http://www.usbio.net/technicalSheet.php?item=C2080>. Acesso em: 17/02/2016.

VARY, P.S. & JOHNSON, M.J. **Cell yields of bacteria grown on methane.** Applied Microbiology, 15, 1473–1478, 1967.

VAZ, C.E.M.; MAIA, J.L.P.; SANTOS, W.G. **Tecnologia da Indústria do Gás Natural.** 1° ed. São Paulo: Blucher, 2008.

WAGNER, M. & HORN, M. **The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical reference.**Curr. Opin. Biotech., 17, 241–249, 2006.

WENDLANDT, K.D.; JECHOREK, M.; HELM, J. & STOTTMEISTER, U. **Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane.** Journal of Biotechnology, 86, 127-133, 2001.

WHITTENBURY, R.; PHILLIPS, K.C. & WILKINSON, J.G. **Enrichment, isolation and some properties of methane utilizing bacteria.** J. Gen. Microbiol, 61, 205–218, 1970.

WILLEY, J.D. **The effect of ionic strength on the solubility of an electrolyte.** Journal of Chemical Education, 81, 2004.

WILSON, J.T. & WILSON, B.H. **Biotransformation of trichloroethylene in soil.** Appl. Environ. Microbiology, 49, 242–243, 1985.

WISE, M.G.; MCARTHUR, J.V. & SHIMKETS, L.J. **Methylosarcina fibrata gen. Bov., sp. Nov. and Methylosarcina quisquiliarum sp. Nov., novel type I methanotrophs.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 611-621, 2001.

WOLF, H.J. & HANSON, R.S. **Alcohol dehydrogenase from Methylobacterium organophilum.** Appl. Environ. Microbiology, 36, 105–114, 1978.

YU, Y.; RAMSAY, J.A. & RAMSAY, B.A. **On-line estimation of dissolved methane concentration during methanotrophic.** Biotechnology and Bioengineering, 95, 5, 2006.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V. & LICHTIG, J. **Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes.** Química Nova, 21, 6, 1998.

Anexos

Journal of Biotechnology & Biomaterials

Fernandes RP et al., J Biotechnol Biomater 2018, 8:3
DOI: 10.4172/2155-952X.1000285

Research Article Open Access

Cultivation of *Methylocystis hirsuta* in Bubble Columns Packed with Pall Rings Utilizing Methane as Carbon Source

Rodrigo Pimentel Fernandes[1], Ana Cristina Pantoja Simoes[1], Carina Heigl[1], Luiz Felipe Amarante Modesto[1], Ricardo Pires Peoanha[2] and Nei Pereira Jr[1*]

[1]*Laboratories of Bioprocess Development, School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil*

[2]*Department of Chemical Engineering, School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*

***Corresponding author:** Nei Pereira Jr, Laboratories of Bioprocess Development, School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil, E-mail: nei@eq.ufrj.br

Received date: August 28, 2018; **Accepted date:** September 17, 2018; **Published date:** September 20, 2018

Copyright: © 2018 Pereira Jr N, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Methanotrophic bacteria use methane as a primary carbon source. The nutritional composition of the species is suggestive of its use as an alternative means of protein production. Furthermore, the production process under study is well within the context of clean technology. This work investigated the mass transfer coefficient, K_La, of oxygen and methane in a new bioreactor system, specially designed for cultivation of Methylocystis hirsuta, and the growth of this bacteria in different conditions and media compositions. The growth system consisted of three bubble column reactors (BCR) in series, packed with stainless steel Pall rings (1.5 cm), using methane as substrate. Methane and oxygen mass transfer to the liquid phase are critical phenomena in this process, and the new system mass transfer capacity was shown to compete with those of traditional bioreactors. Cell concentration achieved with a mineral medium was 1.1 g/L and 2.1 g/L with addition of supplements. The use of soybean oil, a tensioactive agent, increased cell concentration up to 4.5 g/L, showing the importance of an efficient mass transfer from the gas to the liquid phase. Clearly the process could be further improved by enhancing this transport, increasing the availability of oxygen and methane to the microorganism cells. The BCR system tested in this work is a promising new configuration of bioreactors for cultivation of methanotrophic bacteria, with a significant competitive advantage of lowering operational costs since mechanical agitation is no longer required.

Keywords: Greenhouse gas; Methanotrophs; Single cell protein; Methylocystis hirsuta; Pall rings; Bubble column.

Introduction

Worldwide population growth, along with its consequent increasing demand for food, is responsible for the current global protein scarcity, making necessary the search for new protein sources. Since the 1950s, the prospective uses of non-conventional resources, such as Single-Cell Protein (SCP), have been studied. SCP comprises either dry microbial cells or total protein extracted from a mixed or pure culture that can serve as feeding supplement for animals or even humans [1,2].

Compared to more traditional sources, the use of SCP presents some advantages: higher rates of protein synthesis in prokaryotes, high content of protein, lipids, carbohydrates, nucleic acids, vitamins, minerals and some essential amino acids, mainly lysine and methionine, and independence on seasonal factors [2,3]. A proper choice of microorganism for SCP must consider the product destination, as well as the unique properties of each microbial species [4].

Since microorganisms can use different types of substrates, a wide range of materials, residual or not, can serve as feedstock for SCP processes. Oil & Gas industry, for example, can provide natural gas (typically 94 mole % of CH_4) for SCP production [5-7]. In this case the reactor design should allow an efficient mass transfer of CH_4 to the liquid phase where microorganisms are suspended. This would require knowledge about microbial metabolism and composition, cell growth kinetics, culture media, aeration rate, temperature and pressure [8].

Although not many microbial species are capable of metabolizing CH_4, there is a group of methanotrophic bacteria that exhibit this ability. These bacteria are able to assimilate methane through the action of the enzyme methane monooxygenase, which converts methane to methanol, followed by the action of methanol dehydrogenase, transforming methanol to formaldehyde. The generated formaldehyde can follow two distinct metabolic pathways to be converted in biomass. In metanotrophic bacteria Type I it follows the ribulose monophosphate (RMP) pathway and in Type II it follows the serine pathway. As examples of Type I families we have Methylomonas and Methylobacter, while as Type II it is possible to mention the families Methylosinus and Methylocystis [9-11]. Additionally, their cell composition is suitable for animal feeding after adequate treatments. These bacteria also have the potential to be applied in bioremediation, polyhydroxybutyrate (PHB) production and nitrogen fixation [11-13]. Some species of methanotrophs are currently used for animal feeding, fully approved by the European Union [14].

An important parameter widely used to evaluate system's capacity to transfer gas to liquid phase, is the volumetric mass transfer coefficient, K_La, which can be calculated by different methods [15,16]. This coefficient was originally introduced for oxygen, whose concentration in liquid phase can be easily measured by dissolved oxygen electrodes. It can be estimated for other gases, such as methane, allowing an assessment of the system's capacity to transfer CH_4 to the microorganism cells. K_La values are related to several factors, such as the feed rate of the gas mixture, the residence time of the gas and the presence of fillings in the bioreactor, what increases the tortuosity of the gases, through the liquid column as well as their residence time in

Citation: Fernandes RP, Simoes ACP, Helgi C, Modesto LFA, Pereira Jr N et al. (2018) Cultivation of *Methylocystis hirsuta* in Bubble Columns Packed with Pall Rings Utilizing Methane as Carbon Source. J Biotechnol Biomater 8: 285. doi:10.4172/2155-952X.1000285

the liquid phase. These parameters should be investigated to improve the efficiency of the mass transfer during the process, allowing a better use not only of oxygen but also of the substrate methane.

Considering all factors related to the cultivation of methanotrophs and the use of a new bioreactor system, some other parameters should be investigated in order to optimize cell growth and obtain higher yields in protein production. Culture media that use a single carbon source, such as methane, require supplementation with vitamins, cofactors and other nutrients, which are necessary to achieve higher yields and rates of growth. It is also important to investigate the use of substances that allow greater availability of gases to the liquid phase, such as tensoactives, establishing essential interaction between the hydrophobic and hydrophilic substances that are in the continuous and discontinuous phases.

These factors along with high mass transfer coefficients will make it possible to obtain higher cell density in smaller time intervals. The present work aims at estimating K_La values for oxygen and methane as well as evaluating fermentation conditions for the methanotrophic bacteria Methylocystis hirsuta, so as to maximize the cell concentration for a new bioreactor design.

Materials and Methods

K_La measurement by the gassing-out method

Assays were carried out using the gassing-out method (or degasification) which consists of bubbling N2 through the system so as to remove all dissolved oxygen (DO) from the liquid phase. After that, airflow is initiated, and values of DO were measured every 15 seconds. The K_La value for each system was calculated with the following classical equation based on the mass balance of oxygen:

$$Ln\frac{(C_S - C_{L,1})}{(C_S - C_{L,0})} = -k_La(t_1 - t_0)$$

where C_S is the saturation concentration of O_2, $C_{L,1}$ and t1 are, respectively, the values of DO and time at the end of exponential phase and CL,0 and t0 are, respectively, the values of DO and time at point 0.

The reactor used to evaluate K_La was a system of three interconnected glass bubble columns packed with Pall rings of stainless steel with approximately 1.5 cm of diameter and height. The packing was aimed at promoting turbulence in the liquid phase, breaking up bubbles and improving the mass transfer from the gas to the liquid. Efficiency of the fillings in increasing the value of K_La of the system was observed when comparing the results with and without the use of Pall rings (Figures 1 and 2).

Considering that dissolved methane electrodes are not available commercially, values of K_La for methane were estimated on the basis of K_La for oxygen ($K_{La(o2)}$), using the following correlation proposed by Yu et al. [15] for pneumatically agitated reactors:

$$(K_L\alpha)_{O_2} = 1.125(K_L\alpha)CH_4$$

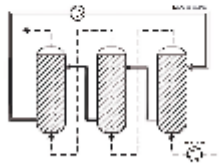

Figure 1: Schematic of the bubble column reactors (BCR) used during experiments. Dashed and continuous lines represent, respectively, gas and liquid flows between columns. Gas injected in fermentation assays was filtered by a 0.22 µm Millipore filter.

Figure 2: Pall rings used to fill the BCR columns. Each piece has 1.5 cm of diameter and heigh.

Fermentation assays

Culture medium used to evaluate *Methylocystis hirsuta* (ATCC BAA-1344) growth was a modified version of NMS 1306, recommended by the American Type Culture Collection (ATCC). Preliminary assays were carried out in shake flasks with controlled atmosphere to investigate fermentation conditions and possible influences in cell growth. The modified NMS 1306 composition is shown in Table 1.

Full scale assays were carried out in the previously described BCR system, consisting of three 1 L columns in series (total volume of 3 L) and using the modified NMS 1306. Assays with and without filling were done to evaluate the interference in cell growth. All subsequent experiments were done with the BCR system filled with Pall rings.

Previous experiments in shaken flasks indicated that yeast extract and casaminoacids are effective sources of metabolic supplements to M. hirsuta. This was fully confirmed in a second fermentation in the BCR system, using the modified NMS1306 supplemented with yeast extract and casaminoacids (0.2% (w/v) each).

Following the assays described above, soybean oil was used in order to speed up the solubilization of methane in water.

Citation: Fernandes RP, Simoes ACP, Helgi C, Modesto LFA, Pereira Jr N et al. (2018) Cultivation of *Methylocystis hirsuta* in Bubble Columns Packed with Pall Rings Utilizing Methane as Carbon Source. J Biotechnol Biomater 8: 285. doi:10.4172/2155-952X.1000285

Solutions	Components	Mass
NMS (1000 mL)	$MgSO_4 . 7H_2O$	1.0 g
	$CaCl_2 . 6H_2O$	0.20 g
	KNO_3	1.0 g
	KH_2PO_4	0.272 g
	$Na_2HPO_4 . 12H_2O$	0.717 g
	$CuSO_4$	1.4 mg
	Traces element solution	0.5 mL
Traces element solution (1000 mL)	EDTA	500.0 mg
	$FeSO_4 . 7H_2O$	200.0 mg
	$ZnSO_4 . 7H_2O$	10.0 mg
	$MnCl_2 . 4H_2O$	3.0 mg
	H_3BO_3	30.0 mg
	$CoCl_2 . 6H_2O$	20.0 mg
	CaCl2 . 2H2O	1.0 mg
	NiCl2 . 6H2O	2.0 mg
	Na2MoO4 . 2H2O	3.0 mg

Table 1: Modified NMS1306 composition.

Soybean oil acts as a tensioactive agent, increasing both the transfer rate of methane to the liquid as well as the availability of substrate for the microorganisms. Assay conditions were exactly the same as previous fermentations in BCR, except for the additional use of 1% (v/v) of soybean oil. In both cases, medium flow rates were such as to maintain the total volume of liquid, as well as the concentrations of supplements, at suitable levels for the microorganism growth.

The BCR system allowed for temperature monitoring only (around 30°C). The air-methane mixture flow rate was 4 L/min and its composition was maintained in 30% methane and 70% air. This proportion was optimized in a separate experiment, not reported here.

Results

KLa measurement by the gassing-out method

As expected, for both configurations the highest values were those for higher airflow rate, possibly related to the higher levels of turbulence/mixture in the columns. Calculated values of $((K_{La})O_2)$ were 166.1, 138.7, 111.2 and 79.9 h^{-1} for the BCR filled with Pall rings and 96.9, 71.1, 51.9 and 29.6 for the BCR without fillings with 8, 6, 4 and 2 L/min of airflow rate, respectively. Results of $((K_{La})O_2)$ assays are shown in Figure 3.

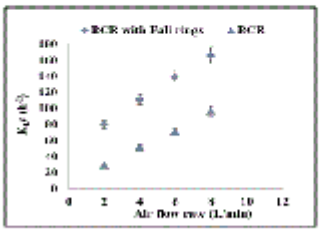

Figure 3: $(K_{La})_{O2}$ values of BCR system with and without Pall rings by airflow rates.

Fermentation assays

Final cell concentration obtained with pure mineral media was only 1.1 g/L with fillings and 0.8 without the Pall rings. With supplements it increased by almost two fold (2.1 g/L) and with oil addition cell concentration achieved the highest value (4.5 g/L), a gain, respectively, of 91% and 300% as compared to the pure mineral medium with fillings. The "No methane" curve shows growth kinetics of the microorganism without methane supply, which confirms the use of methane as exclusive carbon source even in the presence of supplements. Figure 4 presents the growth kinetics of *M. hirsuta* using the BCR system.

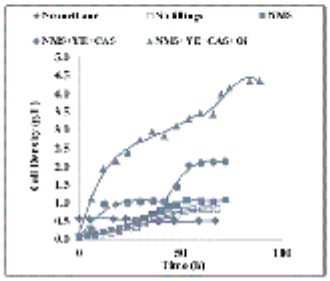

Figure 4: Growth kinetics of *M. hirsuta* in BCR with modified NMS 1306, supplemented NMS1306 and supplemented NMS 1306 with addiction of soybean oil (1% (v/v)). Flow rate of the mixture of gases was 4 L/min with a composition of 30% of methane and 70% of air.

During supplemented NMS1306 assay, cell growth ceased possibly due to the depletion of supplements present in culture medium and cell concentration reached 1.0 g/L in 12 hours. After 30 hours without any further cell growth, the system was fed with supplemented medium to restore the initial levels of yeast extract and casaminoacids, and cell concentration rose to 2.1 g/L. On completion of fermentation, a sample of the culture medium was examined in a microscope (LEICA DSC295). Only small gram negative cells were present, confirming that the assay wasn't contaminated. Figure 5 shows the BCR system after 60 hours of fermentation.

Citation: Fernandes RP, Simoes ACP, Helgi C, Modesto LFA, Pereira Jr N et al. (2018) Cultivation of *Methylocystis hirsuta* in Bubble Columns Packed with Pall Rings Utilizing Methane as Carbon Source. J Biotechnol Biomater 8: 285. doi:10.4172/2155-952X.1000285

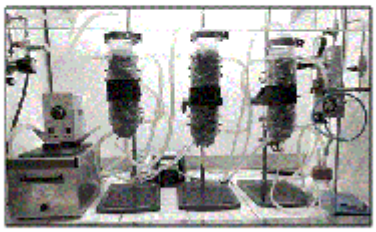

Figure 5: BCR system after 60 hours of growth of *M. hirsute*.

Discussion

The gain in KLa values using Pall rings reached 71, 95, 114 and 170% for 8, 6, 4 and 2 L/min which show the influence of the fillings in aeration efficiency, especially in situations of low turbulence and reduced air supply to the liquid phase. The presence of Pall rings is associated with tortuosity of bed passages and an increased gas hold up, with the gas evenly distributed across the bed section. Bubble coalescence, known to be detrimental for the process, was minimized while bubble breakage was promoted. Overall, the mass transfer from the bubble phase to the liquid improved as shown by the high values of. was estimated for the BCR filled with Pall rings using Yu et al. [17] correlation, and the following values were obtained: 147.6, 123.3, 98.9 and 71.1 for 8, 6, 4 and 2 L/min. These indicate an improved capacity for the developed bioreactor to efficiently supply oxygen and methane required for cell metabolism, actually making the new system a promising one for the cultivation of microorganisms in general.

In fermentation assays, observe the gains of adding supplements and oil to the NMS 1306 medium, either in relation to processing time or final concentrations of cells. Fermentation time to reach 1 g/L was reduced from 60 to about 20 and 12 hours, respectively, for the supplemented medium (with yeast extract and casaminoacids) and for supplemented medium plus soybean oil. Methane, a hydrophobic gas with very low water solubility, had its transference to the liquid facilitated by the presence of a tension active, increasing the contact area between gas (bubbles) and liquid, that is, improving its solubilization rate. The low cost of soybean oil in Brazil and its use in the food industry makes it an excellent choice of surfactant for SCP cultivation.

Traditional bubble column type reactors are known to be in disadvantage when compared to mechanically stirred and airlift reactors, which allow a more efficient circulation and homogenization of the culture medium. However, in this work, the use of packed bubble columns in series has increased the efficiency of methane transfer rate to the liquid, as seen in Figure 3, roughly in proportion to the increase in the gas flow rate. The increased methane residence time associated to the packing, provided a fermentation system of easy design, low operational cost compared to stirred reactors, and high efficiency in the mass transfer to the liquid phase.

Final cell concentrations achieved in BCR were much higher than those obtained in shake flasks (previously investigated, data not shown). These results reinforce the utmost importance of enhanced gas mass transfer promoted by this system, resulting in an increased availability of methane (substrate) and oxygen in the liquid phase. Mass transfer of methane to the liquid phase stands as a critical aspect of this process, leaving open the development of techniques for even more efficient contact between gas and liquid. Cell concentrations obtained, in addition to high KLa values, makes the innovative BCR a promising new configuration of bioreactor for cultivation of methanotrophic bacteria, with the significant competitive advantage of lowering the operational costs since mechanical agitation is not required.

References

1. Kuhad RC, Singh A, Tripathi KK, Saxena RK, Eriksson L (1997) Microorganisms as an alternative source of protein. Nutr Rev 55: 65-75.
2. Nasseri AT, Rasoul-Amini S, Morowvat MH, Ghasemi Y (2011) Single Cell Protein: Production and Process. Am J Food Technol 6: 103-116.
3. Adedayo MR, Ajiboye EA, Akintunde JK, Odaibo A (2011) Single Cell Proteins: As Nutritional Enhancer. Adv Appl Sci Res 2: 396-409.
4. Miller M, Litsky W (1976) Single Cell Protein in Industrial Microbiology. McGraw Hill Inc. Indiana, Mishawaka.
5. Bowman JP (2006) The Families Methylococcaceae and Methylocystaceae. The Prokaryotes 266-289.
6. Durre P, Eikmanns BJ (2015) C1-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation. Curr Opin Biotechnol 35: 63-72.
7. Vary PS, Johnson MJ (1967) Cell yields of bacteria grown on methane. Appl Microbiol 15: 1473-1478.
8. Garcia-Ochoa F, Gomes E (2009) Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. Biotechnol Adv 27: 153-176.
9. Anthony C (2011) How half a century of research was required to understand bacterial growth on C1 and C2 compounds; the story of the serine cycle and the ethyl malonyl-CoA pathway. Science Progress 94: 109-137.
10. Hanson RS, Hanson TE (1996) Methanotrophic bacteria. Microbiol Reviews 60: 439-471.
11. Khmelenina VN, Rozova ON, But SY, Mustakhimov II, Reshetnikov AS, et al. (2015) Biosynthesis of Secondary Metabolites in Methanotrophs: Biochemical and Genetic Aspects (Review). Appl Biochem Microbiol 51: 150-158.
12. Wilson JT, Wilson BH (1985) Biotransformation of trichloroethylene in soil. Appl Environ Microbiol 49: 242-243.
13. Wendlandt KD, Jechorek M, Helm J (2001) Producing Poly-3-Hydroxybutyrate with a High Molecular Mass from Methane. J Biotechnol 86: 127-133.
14. Auman AJ, Speake CC, Lidstrom ME (2011) nifH Sequences and Nitrogen Fixation in Type I and Type II Methanotrophs. Appl Environ Microbiol 67: 4009-4016.
15. Strong PJ, Kalyuzhnaya M, Silverman J, Clarke WP (2016) A methanotroph-based biorefinery: Potential scenarios for generating multiple products from a single fermentation. Bioresour Technol 215: 314-323.
16. Cerri MO, Esperança MN, Badino AC, Ribeiro MPA (2016) A new approach for KLa determination by gassing-out method in pneumatic bioreactors. J Chem Technol Biotechnol 91: 3061-3069.
17. Yu Y, Ramsay JA, Ramsay BA (2006) On-line estimation of dissolved methane concentration during methanotrophic fermentation. Biotechnol Bioengineering 95: 788-793.

XXI SINAFERM
XII SHEB
Aracaju - Sergipe

XXI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS
XII SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA

3 a 6 de setembro de 2017
Aracaju, Sergipe, Brasil

EVALUATION OF METHYLOCYSTIS HIRSUTA GROWTH ON SUPPLEMENTED MINERAL MEDIA USING METHANE AS CARBON SOURCE

Rodrigo Pimentel Fernandes[1], Ana Cristina Pantoja Simões[1], Manuela Temtemples de Carvalho[2], Camila Ruiz Lopes[2] and Nei Pereira Jr.[2]

[1] Federal University of Rio de Janeiro, Technology of Chemical and Biochemical Processes

[2] Federal University of Rio de Janeiro, School of Chemistry

E-mail: rpfernandes89@hotmail.com

ABSTRACT

The growing demand for food promotes the search for new protein sources, leading us to look for different alternatives. Microorganisms that use methane as substrate, in spite of being used for feeding purpose, have the advantage of using a greenhouse gas as carbon source, mitigating the effects of this pollutant on the atmosphere. This work aimed to obtain a culture medium suitable for the growth of Methylocystis hirsuta using shake flasks and a stirred tank bioreactor. Supplements were used for the mineral medium in order to increase the availability of nutrients, and their use proved to be efficient, with increases up to 88% in final cell concentration. Maximum values of cell density obtained were 0.75 g/L for the shake flasks and 2.6 g/L for the stirred tank.

1. INTRODUCTION

Methanotrophic bacteria are microorganisms capable of using methane as carbon source. The interest in their use can be justified by the consumption of this greenhouse gas, reducing its concentration in the atmosphere, and the low cost of this raw material, being able to generate products with high added value (Shindell *et al.*, 2012) and low cost. These bacteria have potential to be applied in bioremediation (Wilson & Wilson, 1985), PHB production (Wendlandt *et al.*, 2001), nitrogen fixation (Auman *et al.*, 2001) and, above all, single cell proteins (SCP) (Pereira Jr., 2012), due to its importance in the world scenario of population growth and crescent demand for food.

XXI SINAFERM
XII SHEB
Aracaju - Sergipe

XXI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS
XII SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA

3 a 6 de setembro de 2017
Aracaju, Sergipe, Brasil

Compared with most common sources of proteins, SCP is characterized by a number of advantages, such as: higher protein synthesis rate in prokaryotes, high protein content and independence in seasonal factors (Adebayo *et al.*, 2011; Nasseri *et al.*, 2011). The objective of this work is to evaluate culture media composition for growth of methanotrophic bacteria Methylocystis hirsuta, in shake flasks and a stirred tank bioreactor (STR), aiming to achieve high cell concentrations.

2. MATERIALS AND METHODS

The culture medium used to grow *Methylocystis hirsuta* was the *American Type Culture Collection* (ATCC) NMS 1306, removing the iron chelate solution and with addition of a 1.4 mg/L $CuSO_4$ solution. Cell growth was carried out in previously sterilized penicillin flasks with controlled atmosphere, suitable for small-scale culture of methanotrophic bacteria. Since culture media is composed of a one-carbon source (methane) and a basic mineral medium, bacterial growth may require supplementation to reach high cell densities. Hence, yeast extract (YE), peptone (P) and casamino acids (CAS) were added and had their influence investigated. Assays were performed in a rotary shaker at 200 rpm and temperature of 30°C, with a 24-hour interval between feedings.

First, in order to enhance availability of vitamins, cofactors and nitrogen sources for *M. hirsuta*, yeast extract, peptone and casamino acids were individually added to culture media, each of them at 0.5 g/L, 1.0 g/L and 2.0 g/L, and respective cell concentrations were evaluated. Furthermore, mixtures composed of yeast extract/peptone (YE + P) and yeast extract/casamino acids (YE + CAS), at 0.25 g/L, 0.5 g/L, 1.0 g/L and 2.0 g/L, of each component, were added and had its effects analyzed. Gas feeding composition was 30% methane and 70% air.

After supplementation assays, a STR was used to enhance the mass transfer of gases into the liquid phase. The bioreactor was operated with a volume of 1 L of modified NMS 1306 supplemented with yeast extract and casamino acids at 2 g/L each and pH, temperature and dissolved oxygen controlled. Medium feedings were done with the purpose of maintaining the total volume, as well as the concentrations of supplements, at suitable levels for the microorganism growth.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

Modified NMS1306 supplemented with yeast extract, peptone and casamino acids led to higher growth rates and final cell concentrations when compared to control, as shown in Table 1.

XXI SINAFERM
XII SHEB
Aracaju - Sergipe

XXI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS
XII SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA

3 a 6 de setembro de 2017
Aracaju, Sergipe, Brasil

Table 1. Cell concentration of *M. hirsuta* for different concentrations of yeast extract (YE), peptone (P) and casamino acids (CAS) in modified NMS 1306 (T= 30°C and pH 7.0).

Supplements	Concentration of supplements (g/L)			
	0.25	0.5	1.0	2.0
	Cell Concentration (g/L)			
YE	-	0.37	0.40	0.47
P	-	0.31	0.36	0.38
CAS	-	0.38	0.41	0.43
YE + P	0.37	0.36	0.42	0.44
YE + CAS*	0.52	0.54	0.54	0.75
Control	0.29			

*Control used for this condition had a final concentration of 0.40 g/L of cells.

For all supplements added, increases in initial loadings promoted higher cell growth. The use of yeast extract increased bacterial growth from 0.29 to 0.47 g/L, a result 62 % superior in comparison to the control flask without any supplements. On the other hand, peptone and casamino acids promoted increases equivalent to 31 % and 48 %, respectively. Addition of the mixture "YE + P", each of them at 2 g/L, led to a 52 % improvement in cell concentration, while for the mixture "YE + CAS" results were 88 % superior, indicating this one as the most promising mixture for future assays. The use of both sources, even elevating costs associated to the process, is responsible for providing a wider variety of biomolecules to the mineral medium, which is interesting when working with more dense cultures of cells, such as those in bioreactors, where depletion of components is more likely to occur.

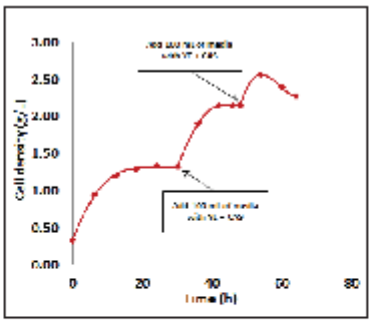

Figure 1. Growth kinetics of M. hirsuta in STR with modified NMS 1306 supplemented with 2 g/L of yeast extract and casamino acids (T= 30°C and pH 7.0).

XXI SINAFERM
XII SHEB
Aracaju - Sergipe

XXI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS
XII SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA

3 a 6 de setembro de 2017
Aracaju, Sergipe, Brasil

Results obtained for the STR experiment were better than the ones shown in shake flasks, with cell density reaching 2.6 g/L in 54 hours. It was needed to make medium replenishment to maintain cell growth after inactivity at 30 and 48 hours. This higher result reinforces the relevance of maintaining optimal process conditions, such as temperature and pH, and constant aeration and feeding (air and methane). Another aspect of utmost importance regards the enhanced mass transfer promoted by this system, which could increase the availability of methane (substrate) and air in the liquid phase.

4. CONCLUSIONS

Addition of supplements made it possible to reach higher cell concentrations than on the control, indicating essentialness of media supplementation. For assays carried out in bioreactor, further studies are required, aiming at improving cell concentrations and optimizing methanotrophs culture, using previously optimized supplemented medium and other process conditions, such as new bioreactors configurations. Combination of other supplements and substances that may improve gas transfer to the liquid phase ought to be investigated to more conclusions about their effect and importance.

5. REFERENCES

Adedayo, M.R., Ajiboye, E.A., Akintunde, J.K., Odaibo, A., 2011. Single Cell Proteins: As Nutritional Enhancer. Advances in Applied Science Research 2, 5, 396-409.

Auman, A.J., Speake, C.C., Lidstrom, M.E., 2001. nifH Sequences and Nitrogen Fixation in Type I and Type II Methanotrophs. Applied and Environmental Microbiology 67, 5, 4009-4016.

Nasseri, A.T., Rasoul-Amini, S., Morowvat, M.H., Ghasemi, Y., 2011. Single Cell Protein: Production and Process. American Journal of Food Technology, 6, 2, 103-116.

Pereira Jr., N., 2012. Relatório Técnico: Produção de Proteínas para Alimentação Animal a partir de Gás Natural. Rio de Janeiro, 70 p.

Shindell, D., Kuylenstierna, J.C., Vignati, E., Van Dingenen, R., Amann, M., Klimont, Z., Anenberg, S.C., Muller, N., Janssens-Maenhout, G., Raes, F., et al., 2012. Simultaneously Mitigating Near-Term Climate Change and Improving Human Health and Food Security. Science 335, 183-189.

Wendlandt, K.D., Jechorek, M., Helm, J., Stottmeister, U., 2001. Producing Poly-3-Hydroxybutyrate with a High Molecular Mass from Methane. Journal of Biotechnology 86, 127-133.

XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química
COBEQ 2016
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro
ENBEQ 2016
XVI Encontro Brasileiro sobre o Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS A PARTIR DE GÁS NATURAL UTILIZANDO A BACTÉRIA METANOTRÓFICA *METHYLOCYSTIS HIRSUTA*

R. P. FERNANDES[1], A. C. P. SIMÕES[1], M. T. de CARVALHO[2], T. M. LIMA[2] e N. PEREIRA Jr[2]

[1] Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química
[2] Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química
E-mail para contato: rpfernandes89@ufrj.br

RESUMO – *Proteínas de unicelulares (PTU) têm sido estudadas desde a década de 1950 como uma fonte proteica alternativa, tendo em vista o aumento da demanda por alimentos em consequência do crescimento populacional. Bactérias metanotróficas, que utilizam metano como fonte de carbono, mostraram-se promissoras nesse contexto, tanto por sua composição quanto por seu apelo verde, devido ao tipo de substrato que utilizam. Este trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento de Methylocystis hirsuta, com variações no meio de cultivo e nas condições operacionais do bioprocesso, utilizando metano como substrato. Foram avaliadas diferentes concentrações dos componentes do meio, bem como adição de suplementos, a fim de possibilitar maiores taxas de crescimento. Os experimentos ocorreram em frascos e em biorreatores. Os ensaios mostraram que o meio mineral utilizado necessita de suplementação para o crescimento de M. hirsuta, que alcançou densidades celulares de 0,7 g/L em frascos e 1,0 g/L em biorreator agitado.*

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional, aliado ao aumento da demanda por alimentos, é responsável por gerar uma crescente deficiência mundial de proteínas, tornando imprescindível a busca por novas fontes destes compostos. Desde a década de 1950, intensivos esforços têm sido realizados a fim de se explorar o uso de fontes alternativas e não convencionais, como a proteína de unicelulares (PTU), ou, em inglês, Single Cell Protein (SCP). Essa nomenclatura é utilizada para se referir à células microbianas secas ou ao total de proteínas extraídas de uma cultura, sejam elas puras ou mistas, que podem ser empregadas como suplemento alimentício para animais ou humanos (Nasseri *et al.*, 2011).

O uso de tais proteínas apresenta diversas vantagens em relação às fontes convencionais, podendo ser destacadas: a velocidade da síntese proteica nos unicelulares em relação à produção em sistemas vivos superiores; o alto conteúdo em proteínas, lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos,

vitaminas e sais minerais, bem como o elevado teor de aminoácidos essenciais, como lisina e metionina; a independência de fatores sazonais; entre outros (Adebayo *et al.*, 2011; Nasseri *et al.*, 2011). A escolha do microrganismo para a produção da PTU deve se basear em fatores relacionados ao seu metabolismo, ao substrato que será utilizado para a produção e ao uso final do produto, tendo em vista as características únicas de composição celular de cada espécie (Miller & Litsky, 1976).

A capacidade dos microrganismos de consumir diferentes substratos permite que uma ampla gama de excedentes/resíduos possam ser utilizados e, nesse contexto, pode-se pensar na indústria de petróleo, lançando mão, por exemplo, do gás natural, rico em metano, para a produção de PTU (Vary & Johnson, 1967). No cenário dos bioprocessos, a ulitização, como substrato, do gás natural, com teor superior a 70% de metano, evidencia desafios tais como optar por um reator que possibilite uma alta eficiência na transferência de massa da fase gasosa (substrato) para a fase liquida, sem gastos relevantes com agitação, bem como eleger a melhor condição de processo, levando em conta o microrganismo utilizado e fatores como a sua composição, as taxas de crescimento, o meio de cultivo e a taxa de aeração, além da temperatura e da pressão ideais, de forma a tornar o processo viável economicamente.

Para que seja possível o uso do metano como fonte de carbono para a produção de PTU, é necessário que o microrganismo utilizado seja capaz de consumir esse substrato, fator responsável por restringir as opções. Dentre estas, estão às bactérias metanotróficas, já utilizadas comercialmente para este fim, em virtude de utilizarem metano como fonte de carbono e apresentarem composição média que as torna adequadas para o uso como alimento após tratamento.

O objetivo deste trabalho foi otimizar o meio de cultivo para a bactéria metanotrófica *Methylocystis hirsuta*, variando a composição do mesmo e adicionando suplementos, inicialmente em frascos de baixo volume, e, em seguida, realizar ensaio em biorreator com o meio otimizado, de forma a obter altas densidades celulares.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Ensaio para otimização do meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado para o crescimento de *Methylocystis hirsuta* foi o NMS1306, indicado pela ATCC (American Type Culture Collection), banco de células onde foi comprada a cepa, e sua composição está descrita na Tabela 1.

A utilização de metano como fonte de carbono gera dificuldade no que tange a alimentação da quantidade adequada de substrato e de oxigênio no meio de cultivo. Dessa forma, o uso de recipientes normais, como erlenmeyers, mostrou-se ineficaz, devido à dificuldade de evitar perdas gasosas no momento da alimentação. Uma solução encontrada, utilizada no cultivo de microrganismos anaeróbios, foi a implementação do cultivo em frascos comumente chamados de frascos de penicilina.

Estes frascos, por serem vedados por uma tampa de borracha e feitos para trabalhar com atmosfera controlada, mostraram-se ideais para o cultivo em pequena escala das bactérias metanotróficas. Os frascos possuem volume total de 100 mL e os cultivos foram feitos com volume de 50 mL de meio, de forma a se manter uma capacidade de agitação suficiente para a transferência do metano para a fase líquida. Os frascos com 50 mL de *headspace* foram alimentados seguindo um protocolo simples, utilizando agulhas e seringas, de forma a controlar a proporção dos gases na alimentação. O ensaio foi realizado em um shaker *innova 44*, da New Brunswick, para garantir condições de agitação e temperatura constantes, de 200 rpm e 30ºC. Foram feitas duplicatas para todas as condições e as alimentações foram realizadas com 24 horas de intervalo entre elas.

Tabela 1 – Composição do Meio NMS1306 da ATCC.

Soluções	Sais	Quantidades
NMS (1000 mL*)	Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$)	1,0 g
	Cloreto de cálcio hexahidratado ($CaCl_2.6H_2O$)	0,20 g
	Nitrato de potássio (KNO_3)	1,0 g
	Solução de quelante férrico	2,0 mL
	Solução de componentes traço	0,5 mL
***Buffer* de fosfato (1000 mL*)**	Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	0,272 g
	Fosfato de sódio dibásico dodecahidratado ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	0,717 g
Quelante férrico (100 mL*)	Citrato de amônio férrico	0,1 g
	EDTA (sais de sódio)	0,2 g
	Ácido clorídrico concentrado (HCl)	0,3 mL
Solução traços (1000 mL*)	EDTA	500,0 mg
	Sulfato de ferro II heptahidratado ($FeSO_4.7H_2O$)	200,0 mg
	Sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4.7H_2O$)	10,0 mg
	Cloreto de manganês tetrahidratado ($MnCl_2.4H_2O$)	3,0 mg
	Ácido bórico (H_3BO_3)	30,0 mg
	Cloreto de cobalto hexahidratado ($CoCl_2.6H_2O$)	20,0 mg
	Cloreto de cálcio dihidratado ($CaCl_2.2H_2O$)	1,0 mg
	Cloreto de níquel hexahidratado ($NiCl_2.6H_2O$)	2,0 mg
	Molibdato de sódio ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	3,0 mg

Foram realizados experimentos com diferentes concentrações dos componentes do meio, de forma a avaliar a real necessidade do uso de alguns destes, como a solução quelante de ferro, e a concentração ideal de outros para o crescimento, caso dos fosfatos, do nitrato, entre outros. A concentração do componente utilizada no ensaio para o novo meio de cultivo foi proporcional à utilizada no meio NMS1306 original. A variação foi de 1, 1,5 e 2 vezes o valor inicial para os componentes já presentes no meio NMS e de 1, 1,5 e 2 g/L para os componentes adicionados posteriormente.

XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química
COBEQ 2016
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro
ENBEQ 2016
XVI Encontro Brasileiro sobre o Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

2.2. Ensaio com suplementação do meio de cultivo

Utilizando uma fonte de carbono único, o metano, e com um meio mineral extremamente básico, a bactéria pode exigir uma suplementação do meio para que ocorra um crescimento acelerado e alcance densidades celulares mais elevadas. Para tal, foram testados fatores que poderiam promover um rendimento maior em células. O meio utilizado neste experimento foi o NMS1306 modificado, obtido a partir dos resultados do ensaio da seção 2.1. De acordo com os resultados obtidos, que serão apresentados no decorrer do trabalho, foi removida a solução quelante de ferro e mantido o sulfato de cobre. Foram utilizados extrato de levedura e peptona, com o intuito de aumentar a disponibilidade de vitaminas, cofatores, entre outros, e ampliar a quantidade de nitrogênio oferecida ao microrganismos; ureia, como uma fonte de nitrogênio com assimilação mais fácil e potencial substituta para o nitrato; e metanol, que está presente na via metabólica das metanotróficas, sendo formado pela incorporação de oxigênio ao metano. A alimentação dos frascos foi realizada com a proporção de 50% de ar e de metano e todos os suplementos foram utilizados com concentração de 0,5 g/L.

2.3. Ensaio em biorreator

Após os experimentos em frascos agitados, foi testado o cultivo em biorreator agitado mecanicamente, com condições de processo controladas. O biorreator BioFlo & Celligen 310, da New Brunswick, foi utilizado no experimento. Este equipamento possui controle automático das condições do processo, como temperatura, pH, velocidade de agitação e vazão de alimentação de ar. Esse ensaio foi realizado visando avaliar uma possível melhora na transferência do substrato gasoso para a fase líquida e consequente aumento na taxa de crescimento da célula. Foi utilizado um volume de inóculo correspondente a 10% (v/v) do volume final de meio de cultivo, e o mesmo teve seu crescimento em frascos de penicilina contendo meio NMS1306 modificado mantidos em shaker com agitação de 200 rpm e temperatura de 30°C. Foi utilizado um volume final de 800 mL, temperatura de 30°C, pH 7,0 e agitação de 400 rpm. Soluções de NaOH (2M) e HCl (2M) foram bombeadas automaticamente pelo reator para a manutenção do pH 7,0. O meio utilizado foi o NMS1306 modificado com suplementação de 0,5 g/L de extrato de levedura e peptona. O experimento foi realizado com uma vazão da mistura gasosa de 4 L/min, e com proporção de 50% de metano e ar.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ensaio para otimização do meio de cultivo

O meio de cultivo é um fator marcante para avaliar a viabilidade industrial de um bioprocesso. Por esse motivo, busca-se otimizar o meio, com composição e concentrações ideais dos reagentes, de forma que seja capaz de sustentar o crescimento do microrganismo, com o menor custo possível. Os ensaios realizados com modificações na composição inicial do meio NMS1306 apresentaram os resultados expostos na Figura 1.

PROMOÇÃO ABEQ
REALIZAÇÃO Departamento de Engenharia Química UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
ORGANIZAÇÃO

XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química
COBEQ 2016
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro
ENBEQ 2016
XVI Encontro Brasileiro sobre o Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

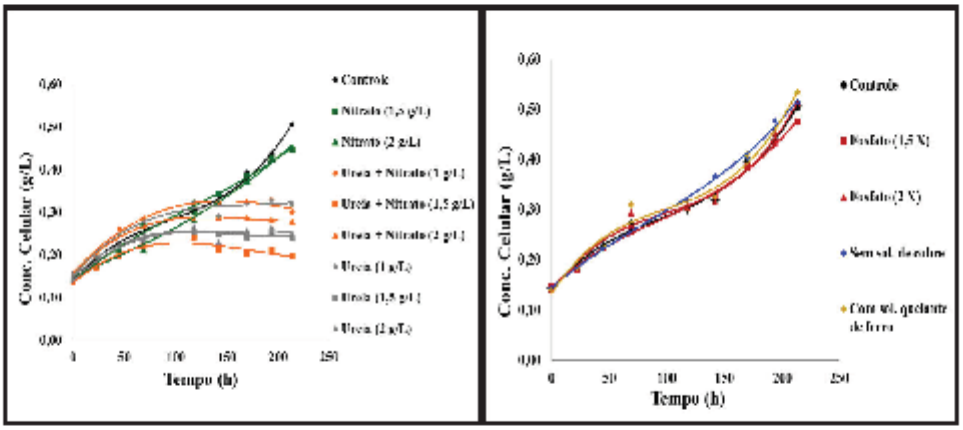

Figura 1 – Cinética de crescimento de M. *hirsuta* com variações na composição do meio de cultivo. As concentrações de fosfato são proporcionais ao valor inicial proposto para o meio NMS1306 da ATCC. Proporção de metano e ar de 50%.

É possível observar que a variação nas concentrações dos componentes iniciais do meio não resultou em um crescimento acelerado de *M. hirsuta*. A solução quelante de ferro não demonstrou nenhum tipo de auxílio no crescimento, indicando que a mesma não é necessária para o propósito do projeto, podendo ser removida. Vale ressaltar que a solução não estava presente nos meios de cultivo encontrados na literatura e sua composição não era simples, onerando o processo. A presença de cobre também não apresentou vantagem no crescimento de *M. hirsuta*, porém ela foi mantida no meio de cultivo devido ao baixo consumo de cobre e recorrência na literatura. A concentração dos outros componentes do meio foi mantida de acordo com o proposto pela ATCC.

Outro aspecto analisado neste ensaio foi o uso de ureia na formulação do meio de cultivo. Utilizado em diversos meios por sua assimilação mais fácil a ureia se mostrou prejudicial ao crescimento da bactéria. Observando as curvas de crescimento é possível verificar que todos os meios contendo ureia tiveram uma inibição do crescimento a partir de 100 horas de cultivo, apesar de, no início do experimento, apresentarem um crescimento mais acelerado quando comparados aos frascos sem ureia. A interrupção do crescimento mesmo nos frascos contendo nitrato além de ureia pode indicar que a causa não tenha sido uma indisponibilidade de nitrogênio, mas sim a presença de algum composto tóxico à célula, seja ele a própria ureia ou algum outro produzido durante o processo. A presença da ureia pode ter estimulado a geração de algum subproduto nocivo à célula, que acabou por inibir o crescimento quando esse atingiu uma dada concentração no meio.

PROMOÇÃO REALIZAÇÃO ORGANIZAÇÃO
ABEQ
Departamento de Engenharia Química
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
ICONE

XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química
COBEQ 2016
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro
ENBEQ 2016
XVI Encontro Brasileiro sobre o Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

3.2. Ensaio com suplementação do meio de cultivo

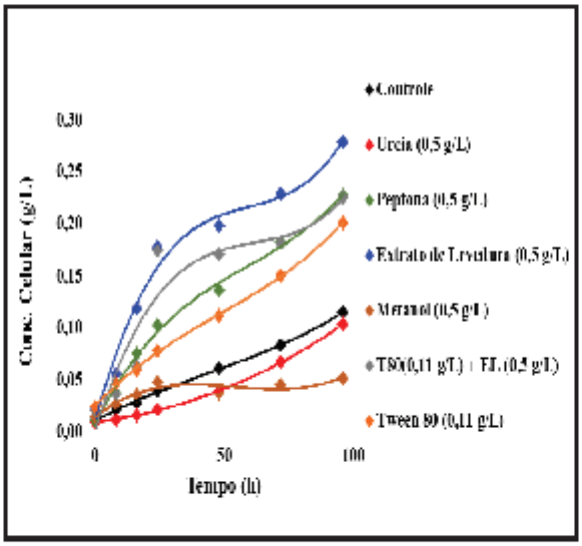

Figura 2: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* em meio NMS1306 modificado com adição de fontes de nitrogênio e suplementos. Proporção de 50% de metano e ar.

Pela primeira vez foram testados suplementos para o meio de cultivo. O fato de o meio mineral ser tão pobre em nutrientes é um aspecto importante do cultivo e que deve ser levado em consideração; por esse motivo, a suplementação do meio foi melhor explorada, como será discutido a seguir. O uso de extrato de levedura e peptona (fontes de nitrogênio, vitaminas, cofatores, entre outros) apresentou um efeito positivo no crescimento, alcançando uma concentração final de células aproximadamente três vezes maior que a do controle. Foram utilizadas baixas concentrações desses compostos de forma a avaliar a capacidade da célula, tida como metanotrófica obrigatória, de utilizar essas fontes de nutrientes para acelerar o seu crescimento.

A adição de metanol no meio de cultivo correspondeu a uma tentativa de acelerar o crescimento fornecendo uma molécula que participa da rota metabólica em uma etapa posterior à assimilação do metano. A oxidação do metano a metanol se dá pela ação da enzima metano monooxigenase (MMO), e este metanol produzido prossegue na via até ser convertido a formaldeído pela metanol desidrogenase. Estudos anteriores, como o de Kalyuzhnaya *et al* (2015) sugerem que em algumas espécies de metanotróficas a enzima responsável pela oxidação do metanol, a metanol desidrogenase, interage diretamente com a MMO, de modo que ela somente atua caso a MMO também esteja ativa, impedindo o consumo direto do metanol como fonte de carbono. Esta hipótese talvez justifique a taxa

ABEQ
Departamento de Engenharia Química
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química
COBEQ 2016
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro
ENBEQ 2016
XVI Encontro Brasileiro sobre o Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

de crescimento inferior do meio com metanol em relação ao controle, pois, uma vez que não houve consumo do metanol, e o mesmo foi disponibilizado para a célula, pode ter se tornado tóxico e prejudicado o crescimento celular.

O efeito da ureia neste experimento foi similar ao verificado no tópico 3.1, apresentando concentração celular final inferior a do controle.

3.3. Ensaio em biorreator

Para o ensaio em biorreator BioFlo houve controle de todos os parâmetros do processo. A Figura 3 ilustra o crescimento no ensaio realizado. A concentração inicial de células foi de aproximadamente 0,2 g/L de *M. hirsuta*, enquanto a vazão de mistura utilizada foi de 4 L/min com 50% de metano. O cultivo foi mantido por 164 horas, alcançando uma densidade celular de 1 g/L.

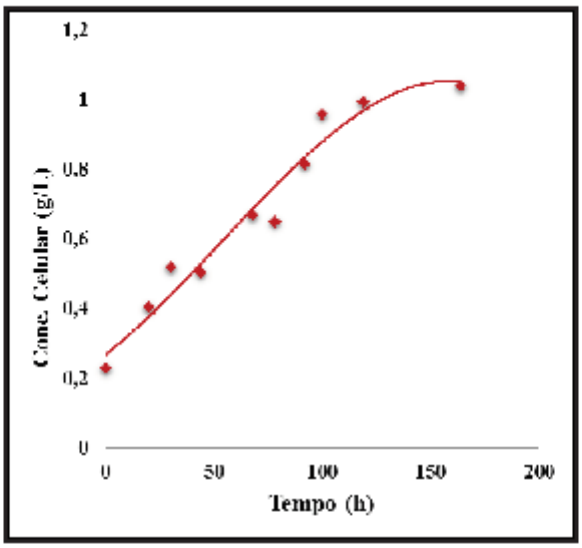

Figura 3: Cinética de crescimento de *M. hirsuta* em biorreator agitado mecanicamente com meio NMS1306 com adição de 0,5 g/L de extrato de levedura e peptona. Proporção de alimentação de 50% de metano e ar.

O uso do biorreator, permitindo o controle das condições ótimas de processo durante todo o tempo, possibilitou uma maior fase exponencial, e, aliado ao uso dos suplementos, levou a densidade celular aos valores mais elevados obtidos até então.

XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química
COBEQ 2016
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro
ENBEQ 2016
XVI Encontro Brasileiro sobre o Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

4. CONCLUSÕES

O meio NMS 1306 não precisa sofrer alterações no que diz respeito à sua composição básica, com as concentrações de sais se mostrando suficientes para o crescimento da célula. O uso de um substrato de carbono único faz com que o metabolismo da bactéria *M. hirsuta* seja lento, tornando seu tempo de crescimento elevado. O uso de extrato de levedura e peptona reduziu o tempo de crescimento e aumentou a concentração final de células no cultivo. A utilização do meio modificado e suplementado em biorreator mostrou um crescimento superior ao dos frascos, caracterizando a importância da manutenção das condições ideais de processo e sugerindo novos ensaios em escalas maiores, de forma a se obter densidades celulares ainda mais elevadas.

5. REFERÊNCIAS

ADEDAYO, M.R.; AJIBOYE, E.A.; AKINTUNDE, J.K.; ODAIBO, A. Single Cell Proteins: As Nutritional Enhancer. *Advances in Applied Science Research*, v. 2, n. 5, p. 396-409, 2011.

KALYUZHNAYA, M.G.; PURI, A.W.; LIDSTROM, M.E. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria. *Metabolic Engineering*, v.29, p.142-152, 2015.

MILLER, M.; LITSKY, W. Single Cell Protein. In Industrial Microbiology. Mishawaka, *McGraw-Hill Inc*, 1976.

NASSERI, A.T.; RASOUL-AMINI, S.; MOROWVAT, M.H.; GHASEMI, Y. Single Cell Protein: Production and Process. *American Journal of Food Technology*, v. 6, n. 2, p. 103-116, 2011.

VARY, P.S.; JOHNSON, M.J. Cell yields of bacteria grown on methane. *Applied Microbiology*, v.15, 1473–1478, 1967.