



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS



Tese

Maximização dos parâmetros operacionais e comparação de meio para
melhoria da produção e acúmulo de P(3HB) por bactérias nativas

Mariane Igansi Alves

Química de Alimentos

Pelotas, 27 de março de 2019

Mariane Igansi Alves

Maximização de parâmetros operacionais e comparação de meio para
melhoria da produção e acúmulo de P(3HB) por bactérias nativas

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito final à obtenção do título de
Doutora em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.

Comitê de orientação: Prof^a. Dr^a. Angelita da Silveira Moreira (orientadora)

Prof^a. Dr^a. Patrícia Diaz de Oliveira (coorientadora)

Pelotas, 27 de março de 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A314m Alves, Mariane Igansi

Maximização de parâmetros operacionais e comparação de meio para melhoria da produção e acúmulo de P(3HB) por bactérias nativas / Mariane Igansi Alves ; Angelita da Silveira Moreira, orientadora ; Patrícia Diaz de Oliveira, coorientadora. — Pelotas, 2019.

170 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. *Bacillus megaterium*. 2. Biopolímero microbiano. 3. Delineamento Composto Central Rotacional. 4. Poli(3-hidroxibutirato). 5. *Ralstonia solanacearum*. I. Moreira, Angelita da Silveira, orient. II. Oliveira, Patrícia Diaz de, coorient. III. Título.

CDD : 664

Mariane Igansi Alves

Maximização de parâmetros operacionais e comparação de meio para melhoria da produção e acúmulo de P(3HB) por bactérias nativas

Tese, como requisito, para a obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas.

Data de defesa: 27 de março de 2019.

Banca examinadora:

.....
Prof^a. Dr^a. Angelita da Silveira Moreira (Orientadora), Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini, Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina

.....
Prof^a. Dr^a. Lígia Furlan, Doutora em Química pela Universidade Federal de Santa Catarina

.....
Prof^a. Dr^a. Rosane da Silva Rodrigues, Doutora em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas

Dedicatória

Para a minha família, com carinho e gratidão.

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida, e por todas as graças alcançadas.

À Universidade Federal de Pelotas, juntamente com o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realizar o doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Prof^a. Dr^a. Angelita da Silveira Moreira pela oportunidade.

À Prof^a. Dr^a. Patrícia Diaz de Oliveira por toda orientação e confiança durante esta etapa.

À banca examinadora Prof^a. Dr^a Ângela Maria Fiorentini, Prof^a. Dr^a Lígia Furlan e Prof^a. Dr^a Rosane da Silva Rodrigues pelo aceite e considerações ao meu trabalho.

À minha família, meus pais Luiz Fernando e Rose Meri e minha irmã Marcele, por acreditarem e apoiarem todas as minhas decisões, vocês são o meu exemplo de vida.

Minha segunda família, aquela que também me deu força desde o início da caminhada, meus tios Zeneida Alves Michels e Max Teógenes Michels, assim como meus primos, que abriram as portas da sua casa para que eu pudesse realizar todos os meus sonhos.

Ao meu namorado Guilherme, pelo incentivo, parceria e por entender a ausência para que eu alcance os meus objetivos e sonhos.

Um agradecimento especial à minha colega de trabalho Karine que se tornou com o tempo uma grande amiga, que hoje tenho certeza que posso contar tanto no trabalho quanto para a vida.

Aos demais amigos do laboratório de Biopolímeros, Matheus, Camila, Izadora, Jackson, Bruna, Bianca, Maria Luiza, Giovane, Diago, Matheus Montano, Adriel, Gabriela e todos os outros que já passaram por lá, pelo apoio, amizade e ajuda nos experimentos.

A todos que de alguma forma participaram para a elaboração deste trabalho.

Muito obrigada!

“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que
você realmente para e encara o medo de frente”.

Eleanor Roosevelt

Resumo

Alves, Mariane Igansi. Maximização de parâmetros operacionais e comparação de meios para melhoria da produção e acúmulo de P(3HB) por bactérias nativas. 2019. 170f. Exame de tese. Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A crescente preocupação com o impacto ambiental que os descartes de forma errônea dos plásticos de origem petroquímica causam, tem levado a uma busca de matérias-primas que possam substituí-los. Biopolímeros microbianos são polímeros biodegradáveis produzidos em processos fermentativos por microrganismos a partir de matérias-primas renováveis; alguns tem sido estudados e utilizados como substituintes dos plásticos de origem petroquímica. O poli(3hidroxibutirato) [P(3HB)] é um bioplástico lipofílico da família dos polihidroxialcanoatos com propriedades térmicas e mecânicas semelhantes ao polipropileno. Um dos entraves à sua ampla utilização comercial é normalmente a baixa produção, que eleva seu custo. O rendimento do produto e a produtividade de muitos processos biológicos podem ser substancialmente melhorados, através da composição dos meios de cultivo e dos parâmetros operacionais nos processos fermentativos, como aeração, agitação, temperatura, pH, entre outros. O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é uma ferramenta que começou a ser utilizada há alguns anos, em bioprocessos, mas que ainda não é utilizada rotineiramente. Quando bem conduzido permite ampliar o volume de dados/respostas obtidos em menor tempo, com economia de material. Assim, fez-se, inicialmente, uma ampla revisão bibliográfica sobre a produção de P(3HB), enfatizando as fontes de carbono e nitrogênio utilizados no meio de cultivo e os principais parâmetros operacionais do processo - aeração, agitação, pH, temperatura e tempo. Após, em biorreator de bancada, os parâmetros aeração e agitação na fase de multiplicação celular foram estudados para *Ralstonia solanacearum* RS. O processo foi realizado utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional 2² (DCCR 2²). Utilizou-se meio YM modificado e 32 °C; as variáveis independentes foram agitação (150 a 250 rpm) e aeração (0,3 a 1 vvm), e as dependentes foram densidade óptica (DO_{600nm}), massa celular seca (MCS) e rendimento de P(3HB). Obteve-se os melhores resultados de crescimento celular (DO_{600nm} 18,04 abs e MCS 4,82 g L⁻¹) com a combinação de 1 vvm com 250 rpm. O maior rendimento polimérico foi 45,06 %, com aeração de 1,05 vvm e agitação de 200 rpm. Os modelos matemáticos gerados não foram preditivos e significativos para as variáveis dependentes DO_{600nm} e MCS, somente para o rendimento do P(3HB). A combinação 1 vvm e 250 rpm foi selecionada como padrão na fase de multiplicação celular em biorreator. Obtiveram-se polímeros com polidispersão entre 2,07- 6 e uma massa molar (Da) de $8,7 \times 10^4$ - $1,1 \times 10^5$, o que os torna adequados a aplicações nobres e diferenciadas nas áreas médica e farmacêutica, como na fabricação de fios de sutura, enxerto ósseo e liberação controlada de fármacos, as quais requerem polímero de baixa massa molar e alta polidispersividade é benéfica. Já com *Bacillus megaterium* CN3 em agitador incubador orbital, realizou-se um estudo referente ao pH inicial do meio YM modificado e à fonte de carbono e na fase de crescimento celular, utilizou-se dois DCCR 2², sendo um para cada açúcar. A temperatura utilizada foi 36 °C; as variáveis independentes foram sacarose (15 a 45 g L⁻¹) e pH inicial (5,8 a 7,2), e

glicose (10 a 50 g L⁻¹) e pH inicial (5,5 a 9,5); as dependentes foram pH final, DO_{600nm}, MCS, consumo de açúcar e nitrogênio. Com a combinação selecionada - sacarose 47,1 g L⁻¹ e pH inicial 7,2 – produziu-se inóculo para utilização na fase de produção de polímero, na qual comparou-se os meios quimicamente definidos F4 (fonte de N ureia) e MM (fonte de N sulfato de amônio) e diferentes tempos. O maior acúmulo - 45,1 % de P(3HB) - ocorreu com o meio MM em 24 h. Para ambas bactérias conseguiu-se, mediante o uso do DCCR 2², elevar a produção e rendimento em relação aos resultados anteriores, confirmando a importância dessa ferramenta, tanto para estudo de parâmetros operacionais como para composição de meio. As quantidades produzidas foram satisfatórias para bactérias nativas.

Palavras- chave: *Bacillus megaterium*, Biopolímero microbiano; Delineamento Composto Central Rotacional; poli(3-hidroxibutirato), *Ralstonia solanacearum*

Abstract

Alves, Mariane Igansi. Optimization of operational parameters and media comparison through Rotational Central Compound Design 2² for improved production and accumulation of P (3HB) by native bacteria. 2019. 170f. Doctoral thesis examination in Graduate Program in Food Science and Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas.

The growing concern about the environmental impact that the mistakenly discard of the petrochemical origin causes, has led to a search for raw materials that can replace them. Microbial biopolymers are biodegradable polymers produced in fermentative processes by microorganisms from renewable raw materials; some have been studied and used as substituents of plastics of pre-chemical origin. Poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] is a lipophilic bioplastic of the polyhydroxyalkanoate family with thermal and mechanical properties similar to polypropylene. One of the obstacles to its widespread commercial use is usually low production, which raises its cost. The yield of the product and the productivity of many biological processes can be substantially improved by the composition of the culture media and the operational parameters in the fermentation processes, such as aeration, stirring, temperature, pH, among others. The Central Composite Rotational Design (CCRD) is a tool that has been used for several years in bioprocesses, but is not yet routinely used. When well conducted, it allows to increase the volume of data/ answers obtained in less time, with material saving. Thus, a broad bibliographic review was initially made on the production of P(3HB), emphasizing the carbon and nitrogen sources used in the culture medium and the main operational parameters of the process - aeration, agitation, pH, temperature and time. After, in the bioreactor, the parameters aeration and agitation in the cell multiplication phase were studied for *Ralstonia solanacearum* RS. The process was performed using a Central Composite Rotational Design 2² (CCRD 2²). Modified YM medium and 32 °C were used; the independent variables were agitation (150 to 250 rpm) and aeration (0.3 to 1 vvm), and the dependents were optical density (OD_{600nm}), dry cell weight (DCW) yield and P(3HB) accumulation. The best cell growth results (OD_{600nm} 18.04 abs and DCW 4.82 g.L⁻¹) were obtained with the combination of 1 vvm at 250 rpm. The highest polymer yield was 45.06 %, aeration of 1.05 vvm and agitation of 200 rpm. The mathematical models generated were not predictive and significant for the dependent variables OD_{600nm} and dcw, only for the P(3HB) accumulation. The combination 1 vvm and 250 rpm was selected as the standard in the cell multiplication phase in bioreactor. Polymers with polydispersion between 2.07- 6 and a molar mass (Da) of 8.7×10^4 - 1.1×10^5 were obtained, which makes them suitable for noble and differentiated applications in medical and pharmaceutical areas, as in manufacturing suture wires, bone grafting, and controlled drug release, which require low molar mass polymer and high polydispersity is beneficial. With *Bacillus megaterium* CN3 in an orbital shaker incubator, a study was carried out regarding the initial pH of the modified YM medium and the carbon source, and in the cell growth phase two CRRD 2² were used, one for each sugar. The temperature used was 36 °C; the independent variables were sucrose (15 to 45 g.L⁻¹) and initial pH (5.8 to 7.2), and glucose (10 to 50 g.L⁻¹) and initial pH (5.5 to 9.5); the dependents were final pH, OD_{600nm}, DCW, sugar and nitrogen consumption. With the selected combination - sucrose 47.1 g.L⁻¹

and initial pH 7.2 - inoculum was produced for use in the polymer production stage, in which the chemically defined F4 (source of N urea) and MM (source of ammonium sulfate) and different times. The highest accumulation - 45.1% of P (3HB) - occurred with the MM medium in 24 h. For both bacteria, the use of CRRD 2² was able to increase production and yield in relation to previous results, confirming the importance of this tool, both for the study of operational parameters and for media composition. The quantities produced were satisfactory for native bacteria.

Key- words: *Bacillus megaterium*; Central Composite Rotational Design; Microbial Biopolymer; poly(3-hydroxybutyrate); *Ralstonia solanacearum*.

Lista de Figuras

Figura 1. Utilização e consumo de plásticos de origem petroquímica no Brasil	26
Figura 2. Classificação geral dos polímeros.....	28
Figura 3. Representação da morfologia dos grânulos de PHA nas células bacterianas: A) observados em microscópio de contraste de fase; B) observados em microscópio de transmissão eletrônica; C) observados em microscópio de força atômica mostrando a presença de partículas globulares na superfície dos grânulos; D) com uma monocamada da membrana fosfolipídica de superfície.	31
Figura 4. Representação esquemática do grânulo de PHA.....	32
Figura 5. Estrutura geral dos PHAs.....	33
Figura 6. Fase da biossíntese do PHA.....	35
Figura 7. Reação de obtenção do P(3HB).	36
Figura 8. Ciclo fechado para a produção e degradação de PHA.	37
Figura 9. Diagrama do transporte de oxigênio de uma bolha de ar para o interior da célula. 1) Difusão do gás do interior da bolha até a interface gás-líquido. 2) Passagem da interface gás- líquido. 3) Difusão da película estagnada de líquido, externa à bolha. 4) Transporte através do meio líquido. 5) Difusão da película estagnada externa ao agregador celular. 6) Passagem pela interface película estagnada- agregado celular. 7) Difusão no agregado celular. 8) Passagem pela membrana celular. 9) Difusão interna na célula.	45

Capítulo 1

Figure 1. Production process P(3HB) with its phases of production, recovery and applicability	63
Figure 2. Scheme for metabolic routes synthesis PHA Source.	64
Figure 3. Scheme of the main metabolic pathways of residual biomass synthesis and P (3HB) from different carbon sources. EMP: Embden- Meyerhoff- Parns. EDP: Entner- Doudoroff Pathway.....	66

Capítulo 2

Fig 1. Growth curves of the <i>R. solanacearum</i> RS strains, P(3HB) accumulation and sugar and nitrogen residuals. (A) shaker and bioreactor, cellular concentration expressed as OD _{600nm} ; (B) bioreactor, dry cellular weight (DCW) and P(3HB) accumulation (g.L ⁻¹); (C) bioreactor, sugar and nitrogen residuals during 48 h (g.L ⁻¹).....	102
Fig 2. (A) Response and contour surfaces as a function of P(3HB) accumulation for the variables aeration and agitation.	110

Capítulo 3

Figura 1. Gráfico de Pareto para pH final, DO _{600nm} , MCS, consumo de açúcar e nitrogênio em função das variáveis independentes pH e concentração de....	133
Figura 2. Gráfico de Pareto para pH final, DO _{600nm} , MCS, consumo de açúcar e nitrogênio em função das variáveis independentes pH e concentração de glicose iniciais.	137
Figura 3. Densidade óptica (DO _{600nm}) (A) e pH (B) em 24, 48 e 72h nos meios de cultivo F4 e MM inoculados com células crescidas de <i>B. megaterium</i> CN3 na condição selecionada segundo o DCCR2 ² usando sacarose.	138
Figura 4. Massa celular seca (g L ⁻¹) (A) a acúmulo de P(3HB) (%) (B) em 24, 48 e 72 h nos meios de cultivo F4 e MM inoculados com células crescidas de <i>B. megaterium</i> CN3 na condição selecionada segundo o DCCR2 ² usando sacarose.	140
Figura 5. Consumo de açúcar (A) e de nitrogênio (g L ⁻¹) (B) em 24, 48 e 72 h nos meios de cultivo F4 e MM inoculados com células crescidas de <i>B. megaterium</i> CN3 na condição selecionada segundo o DCCR2 ² usando sacarose.	141

Lista de Tabelas

Tabela 1. Propriedades de diferentes PHAs comparados com diferentes polímeros petroquímicos.	34
---	----

Capítulo 1

Table 1. Global production of P(3HB).....	58
Table 2. PHA yield (%) by different microorganisms.....	61
Table 3. Dry cell mass yield and accumulation of P (3HB) obtained in cultures of different microorganisms, carbon and nitrogen sources.....	72
Table 4. Dry Cell Mass yield (DCW) and accumulation of P(3HB) obtained in cultures of different microorganisms under different conditions in a shaker and a bioreactor.....	80

Capítulo 2

Table 1. Matrix of the 2 ² CCRD. Coded and real levels of aeration and agitation and the response variables of the <i>R. solanacearum</i> RS inoculum incubated for 24 h at 32°C in YM culture medium, using sucrose as the carbon source.....	106
Table 2. Analysis of variance (ANOVA) for the quadratic polynomial model fitted for the maximum P(3HB) yield.. Analysis of variance (ANOVA) of aeration and agitation of the response variables of the <i>R. solanacearum</i> RS inoculum incubated for 24 h at 32°C in YM culture medium using sucrose as the carbon source.	107
Table 3. Polydispersity index and average Mm for the recovered P(3HB). Gel Permeation Chromatography (GPC) of the aeration and agitation treatment for the <i>R. solanacearum</i> RS inoculum incubated for 24 h at 32°C in YM culture medium using sucrose as the carbon source.	108

Capítulo 3

Tabela 1. Composição dos meios de cultivo, em g L ⁻¹ , utilizados na fase de crescimento celular e produção do P(3HB) por <i>B. megaterium</i> CN3..	127
Tabela 2. Matriz do planejamento experimental DCCR 2 ² usando sacarose. Níveis codificados e reais de pH e concentração de sacarose iniciais e valores das variáveis resposta obtidas na fase de crescimento celular de <i>B. megaterium</i>	

CN3 durante 24 h a 36°C com diferentes variações no meio de cultivo YM modificado.	130
Tabela 3. Matriz do segundo planejamento experimental DCCR 2 ² usando glicose. Níveis codificados e reais de pH e concentração de glicose iniciais e valores das variáveis resposta obtidas na fase de crescimento celular de <i>B. megaterium</i> CN3 durante 24 h a 36°C com diferentes variações do meio de cultivo YM modificado.	
	135

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADP - Adenosina difosfato
APA- Água da parboilização do arroz
ATP - Adenosina trifosfato
B. megaterium CN3 - *Bacillus megaterium* CN3
CG - Cromatografia Gasosa
CTE - Cadeia de Transporte de Elétron
DCC- Delineamentos Compostos Centrais
DNS - Ácido dinitrossalicílico
DO_{600nm} - Densidade Óptica a 600nm
EDP - Entner- Doudoroff
EMP - Embden- Meyerhof- Parns
EVA- Espuma vinílica acetinada
FES - Fermentação semissólida
FMS - Fermentação em meio semissólido
FSS - Fermentação em substrato sólido
HÁ - Hidroxiácidos
HCl - Ácido clorídrico
IPT - Instituto de Pesquisa e Tecnologia
MCS - Massa Celular Seca
MRS- Metodologia de Superfície de Resposta
NaOH- Hidróxido de sódio
NYA -*Nutritive Yeast Agar*
OD - Oxigênio dissolvido
PET- Polietilenotereftalato
PHAs - polihidroxialcanoatos
PHA_{scl} - PHAs de cadeia lateral curta
PHA_{mcl} - PHAs de cadeia lateral média
PHA_{lcl}- PHAs de cadeia lateral mais longa
(P3HB) - poli(3-hidroxibutirato)
P(3HB-co-3HV) - poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
P(4HB) - poli(3-hidroxivalerato)
P(3HB-co-4HB) - poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato)

P(4HHx-co-3HO)- poli(3-hidroxihexanoato-co-3-hidroxi octanoato)

PEAD- polietileno de baixa densidade

PP- polipropileno

PS- poliestireno

PVC - policloreto de vinila

R. solanacearum RS - *Ralstonia solanacearum* RS

Sumário

Introdução Geral.....	21
1. Hipótese	24
2. Objetivos	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos	24
2. Revisão Bibliográfica.....	25
2.1 Materiais Plásticos	25
2.2 Plásticos biodegradáveis.....	27
2.3 Biopolímeros	29
2.4 Polihidroxialcanoatos (PHA)s.....	29
2.5 Processos fermentativos	40
2.6 Influência da fonte de carbono e nitrogênio no processo fermentativo	42
2.7 Influência da aeração e agitação no processo fermentativo	43
2.8 Delineamento composto central	46
2.8 Microrganismos produtores de PHAs.....	48
2.9 <i>Ralstonia solanacearum</i>	49
2.10 <i>Bacillus</i> sp.	50
Capítulo 1- Artigo 1	51
Poly (3-hydroxybutyrate)-P (3HB): A Review of Production Process Technology	52
Introduction	53
Biodegradable Plastic Polymers	53
PHAs.....	54
P(3HB).....	56
Microorganisms Producing PHAs	61
Production of P(3HB)	62
Bacterial Metabolism.....	63
Medium Cultivation	66
Growing Conditions: Time, Temperature, pH, and Oxygen	76
Conclusions	84
References	84

Capítulo 2- Artigo 2:	93
Optimization of <i>Ralstonia solanacearum</i> cell growth using a central composite rotational design for the P(3HB) production: effect of agitation and aeration ...	93
Abstract	95
Introduction.....	96
Materials and Methods	98
Microorganism	98
Culture media and operating conditions.....	98
Cell growth and P(3HB) accumulation	99
Total residual sugars.....	100
Total residual nitrogen	101
Gel Permeation Chromatography (GPC)	101
Results and Discussion	101
2 ² central composite rotational design	106
Conclusion.....	112
Acknowledgements	113
References	113
Capítulo 3- Manuscrito 1:	120
Efeito do pH e fonte de carbono iniciais no acúmulo de P(3HB) por <i>Bacillus megaterium</i> CN3.	121
1. Introdução	123
2. Material e Métodos	125
2.1 Microrganismo.....	125
a. Meios de cultivo e condições operacionais	125
b. Determinação do crescimento celular e acúmulo de P(3HB).....	127
c. Determinação do consumo total de açúcares	128
d. Determinação do consumo total de nitrogênio	129
3. Resultados e Discussão	129
3.1 Delineamento Composto Central Rotacional 2 ²	129
a. Crescimento celular e acúmulo de polímero na fase de produção	138
4. Conclusão	143
5. Agradecimentos	143
6. Referências.....	143
13. Conclusão Geral	149

14. Referências Bibliográficas.....	150
-------------------------------------	-----

Introdução Geral

Um dos problemas mais sérios encontrados na sociedade contemporânea foram anteriormente os resíduos sólidos encontrados pelo mundo que tinham em sua composição restos de comida e outros materiais orgânicos, que resultavam na reintegração ao solo mediante os ciclos biogeoquímicos e serviam como adubo para a agricultura (PRADO e MATOS, 2014).

O crescimento acelerado da população bem como o aumento indiscriminado do consumo de produtos industrializados têm sido considerados uma grave consequência da geração descontrolada de resíduos, com resultados desastrosos para o meio ambiente, bem como à sua população (MUCELIN e BELLINI, 2008; PRADO e MATOS, 2014).

Os plásticos convencionais obtidos a partir do petróleo, devido a sua durabilidade e resistência, e por décadas, usados indiscriminadamente (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006). Por não reagirem quimicamente com a maioria das substâncias, são de lenta degradabilidade, provocando problemas nos aterros sanitários, dificultando a troca de gases e a decomposição de outros compostos (LUENGO et al., 2003).

O crescente interesse científico e popular pela preservação ambiental e a tendência de continuidade do consumo de plásticos pelas indústrias gera um contraponto, que torna necessário a pesquisa e o desenvolvimento de substitutos ecologicamente corretos. Neste aspecto, a utilização de biopolímeros seria, cada vez mais uma interessante alternativa à substituição de plásticos convencionais, devido à sua principal característica - a biodegradabilidade - e os produtos gerados na reação de degradação- água (H_2O) e gás carbônico (CO_2) (LUVIZETTO, 2007). A rápida degradação ocorre através da ação enzimática microbiana, sob condições ambientais favoráveis, e as características de termoplasticidade e biocompatibilidade fazem com que os bioplásticos, em geral, sejam cada vez mais estudados para substituírem os plásticos convencionais (PIEMOLINI, 2004).

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres sintetizados por inúmeros microrganismos e armazenados em formas de inclusões citoplasmáticas para a reserva de energia (HOLMES, 1985). Suas propriedades físicas como um material plástico são: elevado ponto de fusão, baixa rigidez, alta resistência à

1 pressão, resistência ao alongamento antes da ruptura e forte resistência ao
2 impacto (POIRIER et al., 1995). O poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)] é o biopolímero
3 mais estudado dentre os PHAs (HOLMES, 1985; CHANPRATEEP, 2010; ALVES
4 et al., 2017). Esses polímeros biodegradáveis de hidroxialcanoatos podem ser
5 obtidos em grande escala através de bioprocessos (PIEMOLINI, 2004). Porém,
6 a produção de PHAs em escala para aplicação industrial não é, ainda,
7 economicamente viável para substituir os plásticos derivados do petróleo na
8 maioria das suas aplicações (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005; LU et al., 2009;
9 REDDY et al., 2016).

10 Os principais fatores que encarecem o custo do processo de produção
11 dos PHAs são os substratos e o processo de extração (LEE e CHOI, 1999;
12 KHANNA e SRIVASTAVA, 2005; REDDY et al., 2016; MACAGNAN, 2017).
13 Porém, para redução do custo global, as principais necessidades são que o
14 microrganismo produtor se adapte a cultivos com densidade celular elevada, que
15 tenha altas velocidades de crescimento e de acúmulo polimérico altas e que
16 utilizem substrato de baixo custo, como os resíduos das agroindústrias. Além
17 disso, o desenvolvimento ou otimização de métodos de extração menos
18 onerosos e poluentes também são importantes. Fatores esses que tornam
19 continuamente necessárias a seleção e identificação de novas linhagens
20 bacterianas e a adaptação dessas aos meios de cultura de baixo custo sob
21 condições otimizadas, para que a produção de PHAs seja mais rentável e
22 econômica (REDDY et al., 2003; LU et al., 2009; TIAN et al., 2009;
23 CHANPRATEEP, 2010).

24 Os estudos realizados, anteriormente, com *Ralstonia solanacearum* RS,
25 em incubador agitador orbital, comprovaram que a fase logarítmica de
26 crescimento, inicia-se partir de 6 h, entrando na fase estacionária, às 22 h de
27 cultivo; o uso de glicose e sacarose como fontes de carbono é eficaz, sendo a
28 sacarose a fonte mais adequada para o crescimento celular; um pH ácido auxilia
29 em um maior rendimento de polímero, dependendo da fonte de carbono usada,
30 além disso, como não requer restrições nutricionais para o acúmulo do
31 biopolímero, o microrganismo pode ser classificado como tendo metabolismo do
32 tipo II (RODRIGUES, 2016, dados não publicados; MACAGNAN et al., 2017).

33 Para o *B. megaterium* CN3 foi determinado que a fase estacionária ocorre
34 em 22 h à temperatura de 36 °C. Na fase de produção, em agitador incubador

1 orbital, utilizando a Água da Parboilização do Arroz (APA) como meio de cultivo,
2 tanto em pH 6,0 como 7,0, o acúmulo de P(3HB) não foi detectado; já em meio
3 mineral F4 (OLIVEIRA, 2010), utilizando sacarose como fonte de carbono, o
4 acúmulo foi de aproximadamente 42 % em pH 6,0 e 44 % em pH 7,0, em 72 h.
5 Porém, ao realizar o aumento de escala para o biorreator de bancada, não
6 obteve-se resultados satisfatórios (RODRIGUES et al., 2016- dados não
7 publicados).

8 A suplementação com lipídeos e adição do precursor ácido butírico
9 também foram estudadas com o intuito de aumentar o acúmulo do P(3HB) por
10 *B. megaterium* CN3. Ao adicionar óleo de arroz com os emulgentes Tween 80-
11 Lecitina de soja nas concentrações de 5 mL.L⁻¹ de óleo de arroz e 25 g.L⁻¹ de
12 Tween 80- Lectina de soja, respectivamente, com acúmulo de 18,2 %. A adição
13 de 3 mM do ácido butírico ao meio mineral F4, em pH 8, proporcionou o maior
14 acúmulo de polímero (57 %) em 72 h na fase de produção (ALVES, 2016- dados
15 não publicados).

16 Assim, objetivou-se com o presente trabalho selecionar, em biorreator
17 de bancada, faixas mais adequadas dos parâmetros de aeração e agitação na
18 fase de multiplicação celular, bem como a determinação em agitador incubador
19 orbital da fonte de carbono e pH iniciais na fase de multiplicação celular e
20 otimização do meio de cultivo utilizando duas fontes diferentes de nitrogênio para
21 o aumento do acúmulo de P(3HB) pelas bactérias nativas *R. solanacearum* RS
22 e *B. megaterium* CN3.

23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1. Hipótese

Bactérias produtoras têm sua multiplicação e acúmulo de poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)] aumentados pela manipulação combinada dos parâmetros operacionais na fase de inóculo bem como fonte de carbono e pH inicial mediante métodos de planejamento fatorial do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) e de análise de superfície de resposta.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Determinar as condições operacionais aeração e agitação e fonte de carbono e pH iniciais favoráveis na fase de multiplicação celular cultivo de linhagem das cepas *Ralstonia solanacearum* RS e *Bacillus megaterium* CN3 visando o acúmulo do biopolímero poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)].

2.2 Objetivos específicos

- DCCR 2² I: Padronizar os parâmetros de aeração e agitação na fase de multiplicação celular, em biorreator para a cepa *R. solanacearum* RS:
 - Determinar o crescimento celular através de DO_{600nm} e massa celular seca;
 - Verificar o perfil de consumo de açúcar e nitrogênio;
 - Recuperar os biopolímeros com metodologia padrão;
 - Caracterizar física e química dos biopolímeros;
- DCCR 2² II: Padronizar a fonte de carbono e pH inicial na fase de multiplicação celular e posterior comparação entre meios de cultivo para acúmulo de P(3HB) em agitador incubador orbital para a cepa *B. megaterium* CN3:
 - Determinar o crescimento celular através de DO_{600nm} e massa celular seca;
 - Verificar o perfil de consumo de açúcar e nitrogênio;
 - Recuperar os biopolímeros com metodologia padrão.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Materiais Plásticos

Os plásticos tiveram sua origem no ano 1920, pelo químico alemão Hermann Staudinger, que descobriu a estrutura molecular polimérica, porém, foi em meados do século XX que começaram as primeiras pesquisas que resultaram em sua invenção e produção. Foi através dos estudos do químico e inventor inglês Alexander Parkes (1813-1890), que descobriu-se o nitrato de celulose, que consistia em um material altamente flexível, impermeável e com características de opacidade, composto formado por ácido nítrico em altas concentrações e celulose extraída da madeira (EVOLUTION PLASTICOS, 2017).

Polímeros são macromoléculas peculiares, caracterizadas pelo seu tamanho, estrutura química e interações intra e intermoleculares. Possuem unidades químicas unidas por ligações covalentes que se repetem ao longo da cadeia, podendo ser naturais, como a seda, a celulose, as fibras de algodão, entre outros, ou sintéticos, como polipropileno (PP), o polietilenotereftalato (PET), o polietileno (PE), o policloreto de vinila (PVC) (MANO e MENDES, 1999). Em função das principais características físicas são classificados como: termoplásticos (plásticos), termorrígidos, borrachas e fibras (AGNELLI, 1996, LUCAS et al., 2001).

Plasticidade é definido como a propriedade de sólidos finos, entre largos limites de umidade, que submetem a grandes deformações, sem sofrer ruptura, fissuramento ou variação de volume apreciável (BARBA et al., 1997).

Em relação as suas vantagens, apresentam-se facilmente processáveis a temperaturas baixas, quando comparados as temperaturas de processamentos de outros materiais, a facilidade que outras substâncias podem ser adicionadas para conferem novas propriedades, podendo ser possível a alteração da cor, bem como cheiro, elasticidade, resistência a impactos, resistência ao calor e a luz, entre outros aspectos, resultando em uma ampliação em seu uso como aditivos, desde plastificantes que são utilizados para aumentar a flexibilidade, lubrificantes, para reduzir a viscosidade, antioxidantes, que aumentam a resistência a oxidação provocada pelo oxigênio e ozônio atmosféricos, biocidas,

para inibir a degradação por microrganismos, entre outros (PIATI e RODRIGUES, 2005).

A produção anual de plástico subiu de 2 milhões de toneladas métricas, em 1950, para 400 milhões de toneladas métricas, em 2015, resultando no destino dos resíduos gerados pela produção abundante de plástico. Das 6,3 bilhões de toneladas de lixo plástico produzidas de 1950 até 2015, apenas 9% foram reciclados (SOARES, 2017).

No Brasil, as principais resinas utilizadas para a produção de produtos plásticos são o polipropileno (PP) com 21,6%, seguido do poliestireno de alta densidade (PEAD) e policloreto de vinila (PVC) com 13,6%, já a resina menos utilizada é a espuma vinílica acetinada (EVA) com 1,3% (ABIPLAST, 2017).

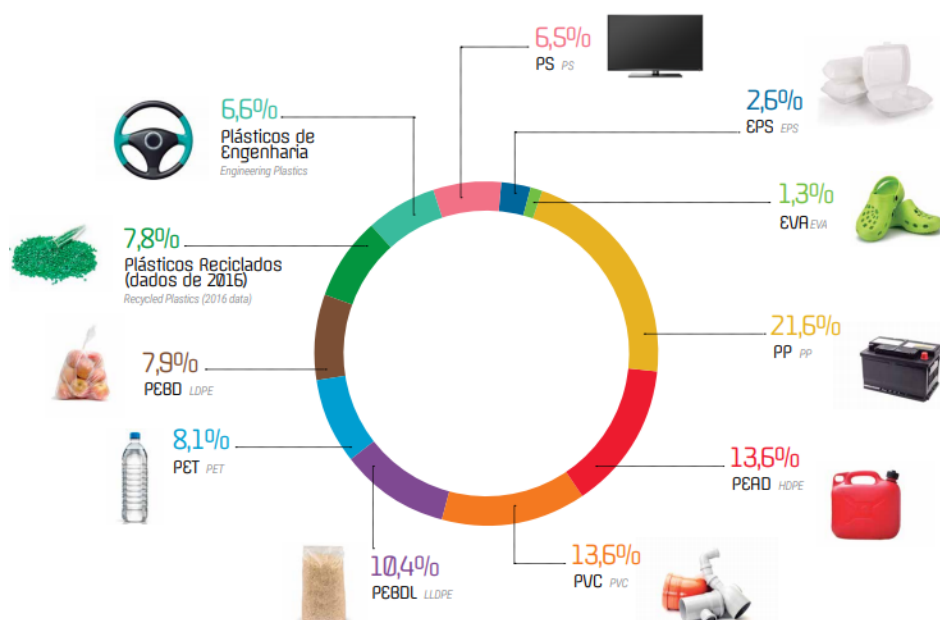


Figura 1. Utilização e consumo de plásticos de origem petroquímica no Brasil

Fonte. ABIPLAST, 2017

Inicialmente, a grande difusão do uso de materiais plásticos em nossa sociedade se deu justamente por sua durabilidade, porém essa propriedade tornou o material plástico um grande vilão do meio ambiente. Entre as possíveis soluções para esse mal, está a redução da produção/consumo, a incineração, a reciclagem e a degradação (CANTO, 2001).

1 A toxicidade de diversos poluentes ambientais tem sido habitualmente
2 investigada quanto a sua teratogenicidade e carcionogenicidade em seres
3 humanos e demais espécies (COLBORN, 1995). Um dos materiais tóxicos
4 produzidos é denominado de xenoestrógeno aplicado livremente a uma série de
5 substâncias químicas tóxicas produzidas pelo homem que confundem os
6 receptores celulares dos estrogênios no organismo, interferindo nas mensagens
7 bioquímicas naturais (IMEBI, 2017).

8 Os xenoestrogênicos são na maioria gerados pela indústria petroquímica.
9 Muitos dos mimetizadores hormonais são organoclorados produzidos pela
10 reação do gás cloro com hidrocarbonetos do petróleo. São utilizadas em
11 plásticos, agrotóxicos, solventes, agentes de branqueamento, refrigerações e
12 outros produtos químicos (IMEBI, 2017).

13 Nesse cenário, novos desenvolvimentos na área de polímeros têm sido
14 realizados para ofertar produtos que possuam boas propriedades mecânicas,
15 mas que tenham um impacto menos drástico no ambiente. Assim, nesse
16 contexto, surgiram os polímeros biodegradáveis, que tendem a dar uma solução
17 ao problema de acúmulo de resíduos plásticos gerados em nossa sociedade.

19 **2.2 Plásticos biodegradáveis**

20 Os plásticos biodegradáveis podem ser divididos em três tipos:
21 completamente biodegradáveis, fotobiodegradáveis e semibiodegradáveis. O
22 primeiro tipo é aquele que apresenta a característica intrínseca de
23 biodegradação. Já os fotobiodegradáveis são polímeros que possuem em sua
24 composição aditivos que incorporam na cadeia polimérica grupos sensíveis à
25 luz; quando expostos à radiação ultravioleta. Plásticos semibiodegradáveis são
26 blends produzidas pela incorporação de polímeros biodegradáveis, como
27 amido, a um polímero plástico que não é biodegradável; com isso, as enzimas
28 microbianas são capazes de promoverem reações de degradação do amido
29 (biodegradação), porém, a parte não amido do polímero continua sendo não
30 biodegradável (REDDY et al., 2003).

Os polímeros completamente biodegradáveis (Fig. 2) são classificados em 4 grupos: 1) agropolímeros, que são obtidos geralmente por fracionamento de biomassa a partir de agroprodutos e são divididos em polissacarídeos, proteínas e lipídeos; 2) polímeros sintetizados por microrganismos a partir de fontes renováveis, como é o caso dos polihidroxialcanoatos (PHAs); 3) polímeros sintetizados quimicamente a partir de monômeros derivados de processos biotecnológicos, como por exemplo poli(ácido láctico) (PLA), que pode ser obtido através da polimerização do ácido láctico de microrganismos; 4) polímeros biodegradáveis oriundos de fontes não renováveis sintetizados por processos petroquímicos como por exemplo, policaprolactona (PCL), poliesteramidas (PEA), co-poliésteres alifáticos (PBSA), co-poliésteres aromáticos (PBAT) (AVEROUS; BOQUILLON, 2004).

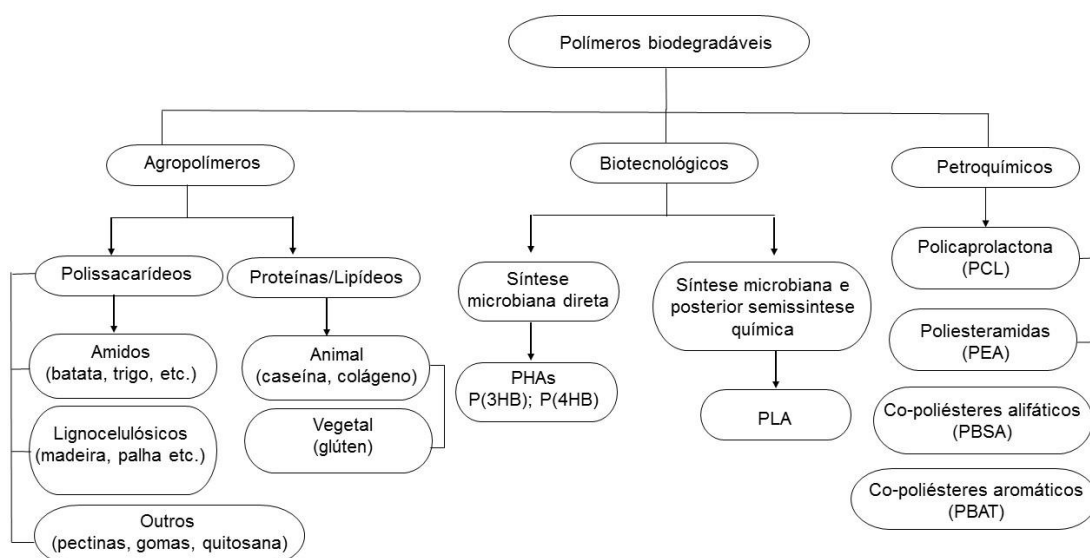


Figura 2. Classificação geral dos polímeros

Fonte: Adaptado de AVEROUS; BOQUILLON, 2004.

Embora um material seja potencialmente biodegradável, sua decomposição no ambiente depende de vários fatores, tais como: a forma como esse polímero será descartado, a presença de microrganismos geradores de enzimas específicas para sua decomposição, condições adequadas à atuação microbiana e enzimática, como temperatura, pH, teor de oxigênio no meio, nutrientes, dentre outros (GRAEBLING et al.,1993).

2.3 Biopolímeros

Por apresentarem uma ampla diversidade em sua estrutura e propriedades físicas, os biopolímeros de origem microbiana, possuem muitas aplicações em indústrias de alimentos, farmacêutica, petrolífera, cosmética, têxtil, de tintas, produtos agrícolas entre outras (LOPES e ANDRADE, 1995).

Há alguns anos, tem-se um considerável interesse em polímeros obtidos por microrganismos, também conhecidos como biopolímeros (BORGES et al, 2004). A produção em meio líquido pode ser pelo cultivo do microrganismo em meio que contém carbono e sais minerais ou por via enzimática (PADILHA, 1997). O termo biopolímero tem sido usado de forma mais ampla, abrangendo todo tipo de polímeros de origem biológica.

Os biopolímeros são classificados em oito grupos, considerando a sua estrutura química: ácidos nucleicos (DNA, RNA), poliamidas (proteínas, poliaminoácidos), polissacarídeos (amido, glicogênio, celulose), polioxiésteres orgânicos (poli (3-hidroxibutirato), poli (ácido málico)), politioésteres (polimercaptoprionato), poliésteres inorgânicos (polifosfatos), poli-isoprenoides (borracha natural), polifenóis (taninos) (HOLMES, 1985).

Os plásticos biodegradáveis vêm, cada vez mais, ganhando importância e a maioria deles é algum tipo de biopolímero.

2.4 Polihidroxialcanoatos (PHA)s

Em 1888 houve, pela primeira vez, relatos sobre a descoberta de grânulos lipofílicos brilhantes em células de *Beijeirinckia*, porém, apenas em 1923, utilizando *Bacillus megaterium*, Maurice Lemoigne determinou o primeiro composto chamado de ácido 3-hidroxibutírico [P(3HB)] e identificou esse material como um provável material de reserva. Durante os trinta anos seguintes, o interesse no P(3HB) ficou restrito à descrição de métodos de detecção e determinação do teor do bioplástico nas células e das condições de cultura que levasse a sua síntese e degradação pelo bacilo. Já em 1958, Macre e Wilkinson verificaram que o armazenamento de grânulos através do *B. megaterium* aumentava quando se elevava as proporções de glicose e nitrogênio do meio de cultivo, concluindo que esses compostos são considerados uma fonte de carbono e energia para o microrganismo estudado (CARMIGNAN, 2006).

No Brasil, a tecnologia da produção de PHAs como plásticos biodegradáveis e biocompatíveis teve seu início na década de 90, no Instituto de Pesquisa e Tecnologia (IPT), Copersucar® e Universidade de São Paulo, utilizando carboidratos como material inicial e buscando estratégias para a utilização de microrganismo oriundo do solo brasileiro (SILVA et al., 2004),

O baixo custo da produção de açúcar no país, juntamente com o excedente energético das usinas de açúcar e álcool, viabilizou a produção integrada desses polímeros no Brasil. Com isso, foi inaugurada em setembro de 2000 a PHB Industrial, uma empresa que produzia e comercializava plástico biodegradável tipo P(3HB) sob o nome Biocycle® (NONATO et al., 2001). A indústria, que atuou até 2015 em escala piloto, chegou a exportar o polímero para o Japão. Atualmente, a planta industrial encontra-se desativada (ALVES et al., 2017).

Os PHAs representam uma classe de poliésteres sintetizados por diversos microrganismos que os acumulam sob a forma de grânulos intracelulares com função de reserva de carbono para obtenção de energia (MADISON e HUISMAN, 1999); o acúmulo pode ultrapassar 80% da massa seca (BYROM, 1987). Esses polímeros têm atraído bastante atenção por serem termoplásticos, biodegradáveis e elastômeros, além de poderem ser produzidos através de fontes renováveis (HOLMES, 1985; STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

2.4.1 Estrutura dos grânulos de PHAs

A superfície do grânulo é composta por uma camada de fosfolípido e proteínas, predominantemente PHAsins, ou seja, uma classe de proteínas capazes de influenciar o número e o tamanho do grânulo. A esteroespecificidade das enzimas biossintéticas são responsáveis pela configuração estereoquímica S, característica apresentada por todos os PHAs conhecidos até o momento

(KESSLER et al., 2001; PÖTTER et al., 2002). Na Fig. 3 (2A a 2D), pode-se observar a morfologia dos grânulos de PHA captadas por diversas técnicas.

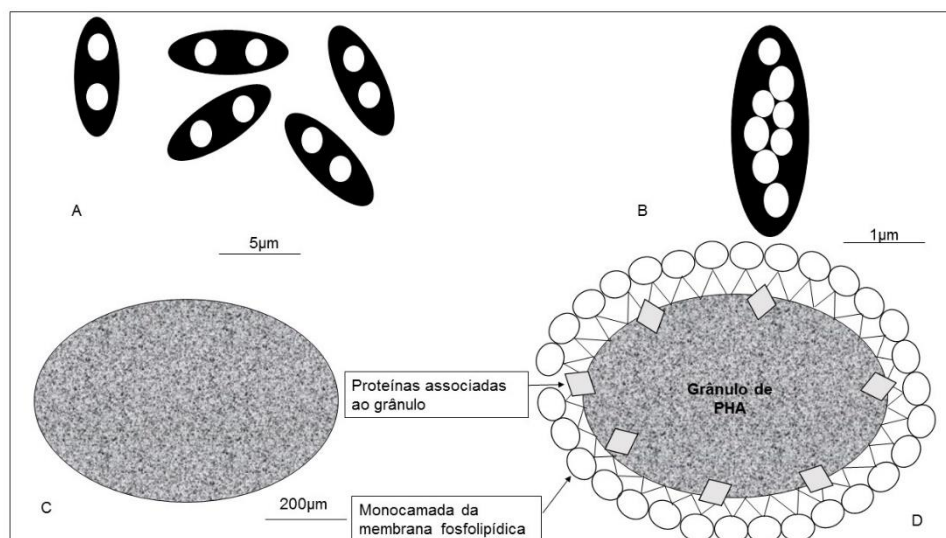


Figura 3. Representação da morfologia dos grânulos de PHA nas células bacterianas: A) observados em microscópio de contraste de fase; B) observados em microscópio de transmissão eletrônica; C) observados em microscópio de força atômica mostrando a presença de partículas globulares na superfície dos grânulos; D) com uma monocamada da membrana fosfolipídica de superfície.

Fonte. Adaptado de KUNASUNDARI e SUDESH, 2011

Geralmente, são acumulados no interior da célula bacteriana de 8 a 13 grânulos, que são constituídos de 98% de polímero e 2% de proteína e apresentam um diâmetro médio de 100 a 800nm, encontrando-se envolvidos por uma micela de 2 a 4nm de espessura, (POUTON e AKHTAR, 1996; KHANNA e SRIVASTANA, 2005). Na Fig. 4 encontra-se esquematizado o grânulo de PHA no qual o centro, formado por PHA, é recoberto por uma camada lipídica integrada às proteínas. A camada de fosfolipídios tem seu lado hidrofóbico direcionado para o centro do grânulo.

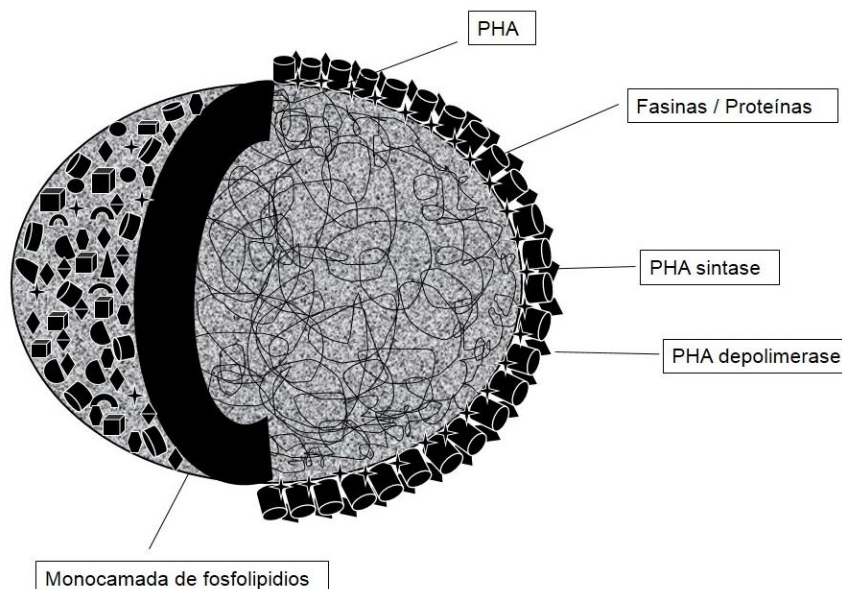


Figura 4. Representação esquemática do grânulo de PHA.

Fonte. Adaptado de ZINN et al., 2001.

2.4.2 Estrutura química dos PHAs

A classificação do PHA pode ser dividida em: polímeros constituídos de unidades monoméricas de hidroxiácidos (HA) com cinco carbonos ou menos, denominados de PHAs de cadeia lateral curta (PHA_{scI}), polímeros constituídos por unidades de HA contendo seis ou mais carbonos em sua composição, denominado de PHAs de cadeia lateral média (PHA_{mcl}) (RAMSAY et al., 1994) e por fim, PHAs de cadeia lateral mais longa (PHA_{lcI}). Normalmente o PHA_{scI} apresenta uma característica de termoplasticidade enquanto o PHA_{mcl} apresenta semelhança com elastômeros (ZINN et al., 2001; SURIYAMONGKOL et al., 2007). A diferença entre os polímeros se dá pelo microrganismo produtor, os substratos e suplementos oferecidos e as condições de cultivo (LEE, 1996a; REHM, 2003; STEINBÜCHEL e EVERSLOH, 2003; GURIEFF e LANT, 2007).

O grupo substituinte S pode variar de um a treze átomos de C, podendo conter insaturações, grupos aromáticos ou ligações com elementos de Cr, Cl ou F. Polímeros tipo PHA possui cadeias lineares, sendo que a polimerização ocorre devido a ligação entre o grupamento carboxila de um monômero e o grupamento hidroxila de outro, formando o poliéster (MADISON e HUISMAN, 1999; LUENGO et al., 2003). Na Fig. 5 observa-se a estrutura geral desses polímeros.

$\left[\begin{array}{c} \text{-O-CH-(CH}_2\text{)}_n\text{-C-} \\ \quad \quad \\ \text{S} \quad \quad \text{O} \end{array} \right]$		
100-3000		
n=1	S= Hidrogênio S= Metil S= Etil S= Propil S= Pentil S= Nonil	Poli(3- hidroxipropionato) Poli(3-hidroxibutirato) Poli(3-hidroxivalerato) Poli(3-hidroxihexanoato) Poli(3-hidroxioctanoato) Poli(3-hidroxidodecanoato)
n= 2	S= Hidrogênio S= Metil	Poli(4-hidroxibutirato) Poli(4-hidroxivalerato)
n= 3	S= Hidrogênio S= Metil	Poli(5-hidroxivalerato) Poli(5-hidroxihexanoato)
n= 4	S= Hexil	Poli(6-hidroxidodecanoato)

Figura 5. Estrutura geral dos PHAs.

Fonte: Adaptado de LEE, 1996.

2.4.3 Propriedades físicas e químicas dos PHAs

Os PHAs são termoplásticos e apresentam alto grau de polimerização, são cristalinos, opticamente ativos e insolúveis em água, conferindo propriedades plásticas que se comparam aos plásticos derivados de petróleo (REDDY et al., 2003; SOLAIMAN et al., 2008). A Tab. 1 mostra as propriedades dos PHAs, onde observam-se as características similares entre o P(3HB) e o PP. O P(3HB) possui menor resistência a solventes, porém, apresenta maior resistência quando exposto à radiação ultravioleta (UV). Na forma de filmes, o P(3HB) tem como característica uma excelente propriedade de barreira a gás e seus filmes são tão resistentes quanto os filmes de polipropileno, porém, não tão resistente quanto o politereftalato de etileno (PET) (HOLMES, 1985).

1 **Tabela 1.** Propriedades de diferentes PHAs comparados com diferentes
 2 polímeros petroquímicos.

Polímero	Temperatura de fusão(°C)	Módulo de Young (GPa)	Tensão de cisalhamento (MPa)	Resistência a ruptura (%)	Resistência ao impacto (Izod)(J/m)
P(3HB) ¹	179	3,5	40	5	50
P(3HB-co-3HV) ²					
3mol%3HV	170	2,9	38	-	60
9mol%3HV	162	1,9	37	-	95
14mol%3HV	150	1,5	35	-	120
20mol%3HV	145	1,2	32	-	200
25%mol%3HV	137	0,7	30	-	400
P(4HB) ³	53	140	104	1000	-
P(3HB-co-4HB) ⁴					
3mol%4HB	166	-	28	45	-
10mol%4HB	159	-	24	242	-
16mol%4HB	-	-	26	444	-
64mol%4HB	50	30	17	591	-
90mol%4HB	50	100	65	1080	-
P(4HHx-co-3HO) ⁵	61	-	10	300	-
PP	170	1,7	34,5	400	45
PET	262	2,2	56	7300	3400
OS	110	3,1	50	-	21

3 Legenda: ¹⁻ poli (3- hidroxibutirato); ²⁻ poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato);
 4 ³⁻ poli(3-hidroxivalerato); ⁴⁻ poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato); ⁵⁻ poli(3-
 5 hidroxihexanoato-co-3-hidroxi octanoato) PP- Polipropileno; PET-
 6 Polietilenotereftalato; PS- Poliestireno
 7 **Fonte.** Adaptado de LEE, 1996^a

8

A resistência à ruptura do P(3HB) é muito inferior à do PP, porém,
 10 essa propriedade pode ser melhorada com a adição de um copolímero
 11 como por exemplo, 4-hidroxibutirato (4HB) ao P(3HB). Um ponto
 12 desfavorável ao P(3HB), encontra-se em sua temperatura de degradação
 13 térmica, próxima aos 200°C, sendo essa muito próxima à temperatura de
 14 fusão. O decréscimo da temperatura de fusão pode ser obtido com a
 15 fração de 3HV, sem afetar a temperatura de degradação, o que resultará
 16 em um melhor processamento térmico do copolímero. Além disso, o
 17 aumento da fração de 3HV torna o polímero mais flexível, pelo decréscimo
 18 do Modulo de Young, aumentando a sua resistência ao impacto. Com
 19 isso, as propriedades do P(3HB-co-3HV) podem ser controladas pelo
 20 ajuste da fração de 3HV durante o cultivo em biorreator (LEE, 1996a).

2.4.4 Síntese de PHAs

Sua síntese ocorre da seguinte forma: primeiramente, há uma fase de crescimento não limitado com o objetivo de crescimento celular, seguida da produção do polímero e seu acúmulo, que ocorre somente em condições de limitação de algum nutriente essencial como P, Fe, Mg, N e O com excesso de carbono (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005). Nessas condições o microrganismo irá crescer e multiplicar-se rapidamente até o consumo total de carbono e até o esgotamento dos nutrientes essenciais. Na ausência de um destes, o crescimento celular é limitado e o carbono que for adicionado será convertido em PHA (CALVÃO, 2009).

Para a síntese de PHA, são necessárias 3 fases metabólicas: primeiramente, uma fonte de carbono disponível para que ocorra a síntese através de um sistema local de transporte da membrana citoplasmática ou pela difusão do composto para a célula. Em seguida, as reações anabólicas ou catabólicas (até mesmo ambas), convertem o composto em hidroxilacil coenzima A tio éster, que serve como substrato para a PHA sintase, também chamada de PHA polimerase. Na terceira fase, a PHA sintase, que é a enzima chave para a síntese de PHAs, catalisa a formação das ligações ésteres com a liberação da coenzima A (STEINBÜCHEL e VELENTIN, 1995). A Fig. 6 indica as fases metabólicas para a obtenção do PHA.

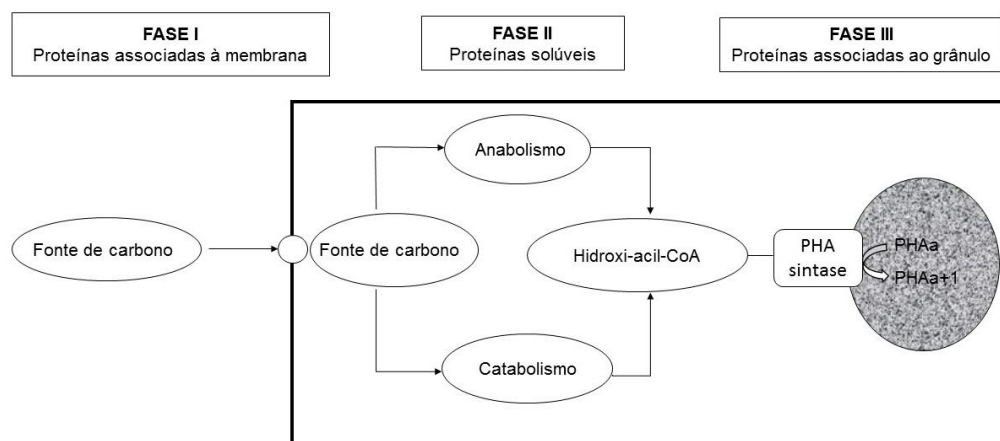


Figura 6. Fase da biossíntese do PHA

Fonte: Adaptado de STEINBÜCHEL e VELENTIN, 1995.

Para a maioria dos microrganismos que realizam a síntese de P(3HB), o mesmo ocorre de forma anaeróbica a partir das moléculas de acetil-CoA. Nos

cultivos onde há limitação de nutriente essencial associado ao excesso de carbono, as moléculas de acetil-CoA que migrariam para o ciclo do ácido tricarboxílico para resultar na geração de energia e material celular, passam a ser convertidas em PHA. Essa conversão é feita através da condensação de duas moléculas de acetil-CoA, pela enzima β -cetotiolase (Pha A), formando acetoacetil-CoA. A enzima acetoacetil-CoA-redutase NADPH dependente (Pha B) catalisa a redução da molécula até o (R)-isômero de 3-hidroxi-butiril-CoA. Assim, a enzima PHB sintase (Pha C) faz a polimerização dos monômeros 3-hidroxi-butirato (3HB), formando o polímero P(3HB) (BYROM, 1987; SUDESH et al., 2000). Outra via para síntese de P(3HB) é a da β -oxidação, na qual são utilizados ácidos graxos como fonte de carbono. Para essa via de síntese as enzimas β -cetotiolase e acetoacetil-CoA redutase catalisam moléculas de acetil-CoA convertendo-as em (S)-3-hidroxi-butiril-CoA, precursor direto do P(3HB), e fornecem diretamente para via de produção do polímero o (R)-3-hidroxi-butiril-CoA (SUDESH et al., 2000). A Fig. 7 mostra o esquema clássico de síntese do P(3HB).

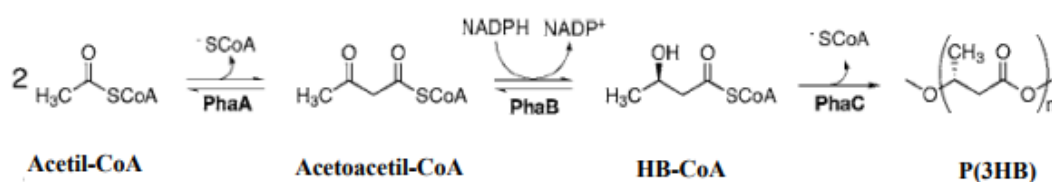


Figura 7. Reação de obtenção do P(3HB).

Fonte: STUBBE et al., 2005.

2.4.5 Produção e Degradação de PHAs

Os PHAs podem ser produzidos por quatro diferentes métodos: i) produção química, ii) produção biotecnológica, como por exemplo: culturas de vários tipos de bactérias, culturas com linhagem de mutantes, culturas com bactérias e leveduras recombinantes, plantas transgênicas, entre outros, iii) combinação da produção biotecnológica e química, semi-síntese através da polimerização química do ácido láctico pela fermentação, iv) isolamento de fontes naturais (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998). A Fig. 8 representa o esquema fechado de produção de PHAs. Uma cultura de cana-de-açúcar usa a

luz solar através da fotossíntese para converter os compostos CO_2 e H_2O em carboidratos que, em sua forma de açúcares simples, fornecem matéria-prima necessária para a produção do biopolímero. O microrganismo específico acumulador de PHA, é utilizado para a produção, usando como fonte de carboidrato o açúcar, transformando-o em polímero que, por sua vez, é extraído e processado em produtos plásticos. Embora os PHAs sejam estáveis em uso normal, quando depositados em meio microbiologicamente ativo são metabolizados enzimaticamente. Em condições aeróbicas, produz-se novamente CO_2 e H_2O , concluindo o ciclo (GARCIA, 2006).

Em condições aeróbicas, o resultado da degradação são os compostos de dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O), enquanto que, em condições anaeróbicas, são produzidos ao fim do processo CO_2 e metano (CH_4) (REDDY et al., 2003).

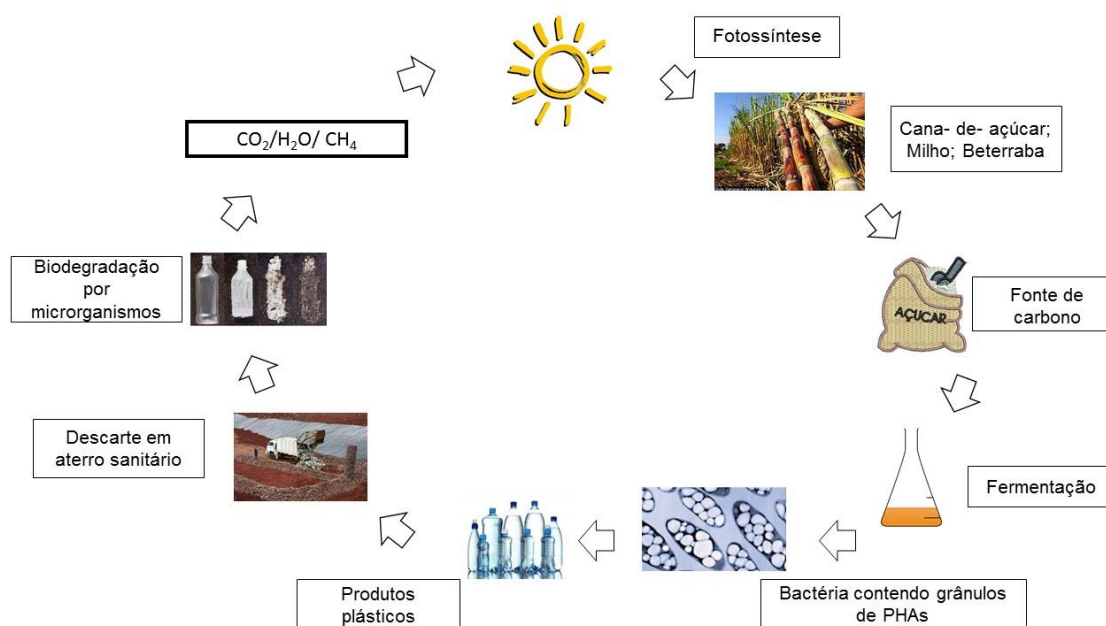


Figura 8. Ciclo fechado para a produção e degradação de PHA.

Fonte. Adaptado de GARCIA, 2006.

Uma característica importante do PHA é sua biodegradabilidade. Na natureza, muitos microrganismos podem degradar os PHAs por ação das enzimas PHA hidrolase e depolimerases, tendo como função a degradação do polímero que se encontra no interior das células para a utilização como fonte de carbono. Porém, estas enzimas não são capazes de degradar o polímero

externo, ou seja, retirado da célula, possivelmente devido à mudança do estado cristalino para o estado amorfo. Muitos microrganismos que são encontrados em solos, águas marinhas e lagos, possuem uma PHA depolimerase extracelular que é capaz de degradar o polímero após sua retirada da célula, utilizando-o como fonte de carbono. A habilidade de degradação de PHA não está apenas restrita a bactérias, muitos fungos também são capazes de degradar esses biopolímeros (JENDROSSEK et al., 1996; MERRICK et al., 1999; SUDESH et al., 2000). A atividade dessas enzimas pode variar e depende da composição do polímero, forma física, dimensões das amostras e condições ambientais (MADISO e HUISMAN, 1999).

O processo de degradação polimérica é caracterizado pela deterioração das propriedades do polímero através da clivagem das cadeias poliméricas para a formação de oligômeros e, posteriormente, monômeros (GOPFERICH, 1996).

A biodegradação dos polímeros ocorre por dois mecanismos que dependem da natureza do polímero e do ambiente. O primeiro mecanismo é a hidrólise biótica e abiótica, seguida pela bioassimilação (hidrobiodegradação), que é um processo primário envolvido na biodegradação das heterocadeias poliméricas tais como a celulose, o amido e poliésteres alifáticos, dos quais o PHA e o PLA são típicos. O segundo, trata-se da peroxidação seguida pela bioassimilação de produtos com baixa massa molar (oxobiodegradação), comum às cadeias de carbono de polímeros (SCOTT, 2000).

A velocidade da biodegradação de PHAs é influenciada por fatores diversos, alguns relacionados ao ambiente (temperatura, umidade, pH e disponibilidade de nutrientes) e outros relacionados ao biopolímero (composição, cristalinidade, aditivos incorporados, espessura e área superficial) (MANO e MENDES, 1999). A biodegradação ocorre por hidrólise enzimática (SUDESH et al., 2000). Entre os meios propostos como inoculantes para a degradação de PHA pode-se citar: lodo ativado, solo orgânico (GARCIA, 2006).

O nosso grupo de pesquisa realizou um trabalho referente ao tempo de biodegradação do P(3HB) produzido pelos microrganismos *R. solanacearum* RS e P(3HB) comercial Biocycle®, frente a solos inoculados com os microrganismos ou não, e folhas forrageiras *Lolium multiflorum* (azevém) e *Lotus corniculatus* L. (cornichão) por um período de 100 dias em casa de vegetação.

Para o estudo da degradação de P(3HB) produzido por *R.solanacearum* em solo simulado por inóculos bacterianos foram utilizados como tratamentos com solo esterilizado, solo esterilizado e acrescido de inóculo de *R. solanacearum* cepa RS e acrescido de inóculo de *B. megaterium* cepa CN3, e solo natural. Os resultados mostraram que o tratamento com *B. megaterium* CN3 foi o mais efetivo tendo uma taxa de degradação superior. O tratamento controle negativo de solo esterilizado teve as menores taxas de degradação, em vista do processo de esterilização e consequente extinção da microbiota nativa. O controle positivo de solo natural também se comportou de maneira prevista, tendo as maiores taxas de degradação de todos os tratamentos em todos os tempos avaliados (TORRES et al., 2018- dados não publicados)

Os tratamentos estudados quando o experimento foi com as plantas forrageiras foram com solo cultivado com azevém e cornichão; solo cultivado com azevém; solo cultivado com cornichão; solo sem cultivo (controle); seus resultados mostraram que para o P(3HB) RS no solo sem cultivo e com azevém, não houve diferença estatística. Em relação aos tratamentos com plantas forrageiras combinadas, comparando com o controle, a presença do cornichão, sozinho ou combinado ao azevém, foi prejudicial; já o azevém sozinho não prejudicou nem estimulou. Para o P(3HB) comercial, a combinação das forrageiras foi positiva, cornichão sozinho foi indiferente e azevém sozinho foi prejudicial (TORRES et al., 2018- dados não publicados).

2.4.6 Mercado e produtos de PHAs

Por serem considerados biodegradáveis, termoprocessáveis e em geral biocompatíveis, os PHAs tornaram-se atrativos como biomateriais podendo ser utilizados em aparatos médicos como por exemplo, suturas, na engenharia de tecidos (MARTIN e WILLANS, 2003; VALAPPIL et al., 2006). Também são empregados na forma de filmes biodegradáveis com utilização diversas na agricultura, além de servirem como uma camada protetora para fertilizantes, herbicidas e inseticidas. Por serem compatíveis com inúmeros alimentos, suas principais aplicações são em blendas na área de embalagens para substituir os plásticos petroquímicos, como em produtos lácteos, bebidas e produtos cárneos (WILLIAMS et al., 1999; SORRENTINO et al., 2007).

O alto custo da produção dos PHAs ainda é um entrave na sua comercialização, mas existem empresas produzindo esses biopolímeros em diversos países (Tab. 1, pg. 58), como por exemplo: Estados Unidos, Japão e Itália. Em alguns dos casos, a produção é feita em escala piloto, mas há um crescente interesse no aumento desta escala (ALVES et al., 2017).

2.5 Processos fermentativos

O termo bioprocesso pode ser entendido como qualquer processo no qual haja a participação de agente biológico e nele esteja padronizado um conjunto de operações ao montante (*upstream*), iniciando-se pela seleção e composição do meio de produção e demais condições que possibilitarão a transformação do substrato em produto por rota bioquímica, seguida por processos de jusante (*downstream*). Quando se refere ao bioprocesso fermentativo, o objetivo é a utilização de microrganismos como maquinário para a obtenção de um produto biotecnológico (PEREIRA et al., 2008).

Os processos fermentativos podem ser classificados de acordo com a maneira na qual o substrato é adicionado e o produto retirado. (FERREIRA, 2005). Podem ser utilizadas: fermentação descontínua, descontínua alimentada, semicontínua e, contínua. As fermentações descontínuas são, até hoje, as mais utilizadas, possuindo uma importância significativa para a obtenção de determinados produtos fermentados. Podem ser chamadas ainda de processo em batelada ou descontínuo de fermentação (CARVALHO e SATO, 2001).

Podendo levar a baixos rendimentos e/ou produtividade quando o substrato é adicionado apenas uma vez no período inicial da fermentação, o processo descontínuo exerce alguns efeitos como inibição e repressão ou desvios para metabolismo celular ou síntese de produtos que não são de interesse (CARVALHO e SATO, 2001). Porém, devido à flexibilidade no fornecimento dos nutrientes necessários ao desenvolvimento do cultivo, tal processo se torna um dos mais promissores quando está relacionado ao crescimento celular e à produção de metabólitos, sendo adequado quando há a necessidade de controlar os nutrientes disponíveis (YAMANE e SHIMIZU, 1984).

Também conhecido como “Melle-Boinot”, o processo descontínuo alimentado, que ganhou importância na produção de etanol no Brasil, no final da

década de 60 e nos anos 70, caracteriza-se basicamente por uma técnica onde um ou mais nutrientes são adicionados ao biorreator durante o cultivo e os produtos gerados permanecem até o final do processo. A vazão de alimentação pode ser contínua ou variar conforme o tempo, e a adição do mosto pode ser contínua ou intermitente (CARVALHO e SATO, 2001). Na fermentação descontínua alimentada, a estratégia da alimentação é muito importante, sendo implantada no controle de culturas que tenham alta densidade de microrganismos (LEE et al., 1999).

A fermentação semicontínua recebe essa denominação porque são intermitentes tanto o fluxo de entrada do meio no reator quando o de saída de material fermentado. Ou seja, enquanto aguarda-se o fim da fermentação, é retirado parcialmente o caldo fermentado e adicionado ao reator um volume de meio de fermentação igual ao volume de caldo fermentado que foi retirado (BORZANI, 2001). Sua produtividade depende de muitos fatores, como: microrganismo utilizado e sua concentração, método de preparo do inóculo, composição do meio, temperatura, pH, fornecimento de oxigênio e de nutrientes durante o desenvolvimento da fermentação, entre outros (BORZANI, 2001).

O processo contínuo teve o seu início com a utilização de um sistema de dornas ligadas em série, com quantidade e tamanho variados, em cascata, onde as primeiras dornas continham um volume total de 70% da fermentação. Com a otimização dos processos de fermentação, a produção a partir do processo contínuo passou a ser caracterizado pela alta produtividade e baixo tempo (ANDRIETTA, 1994).

Taciro (1992) relata que, para que ocorra a ampliação de escala de um processo fermentativo e o mesmo torna-se viável industrialmente, deverá manter as condições do processo uniforme para qualquer volume de operação. Porém, de acordo com Tong e Inloes (1990), para se realizar eficazmente a ampliação da escala do processo, é indispensável primeiramente definir o microrganismo que será empregado, o meio de cultivo e as condições de agitação e aeração mais adequadas que devem ser empregadas no processo.

2.6 Influência da fonte de carbono e nitrogênio no processo fermentativo

No processo fermentativo, as fontes de carbono e nitrogênio são responsáveis pelo crescimento celular e manutenção dos microrganismos. A sua seleção e o modo como são aportados se tornam fatores críticos durante o processo; pois muitos compostos, especialmente açúcares, podem representar uma intensa repressão catabólica da síntese de várias enzimas, além de diminuir a velocidade de crescimento de determinados microrganismos (LILLY, 1979; ALVES et al., 2017).

A fonte de carbono adequada e sua concentração são selecionadas por comparação, analisando o crescimento celular e a produção do produto de interesse. Uma fonte de carbono específica pode oferecer excelentes resultados para o crescimento celular e não necessariamente uma boa produção (DUDMAN, 1964; OKABE et al, 1981; GANDHI et al., 1997).

O tipo da fonte de carbono utilizada influencia a produção e a qualidade do biopolímero produzido. Em geral são usados como fonte de carbono na produção, glicose, manitol, frutose, sorbitol, glicerol e sacarose (DUDMAN, 1964; OKABE et al., 1981; BOZA et al., 2004).

A glicose é um dos mais importantes “primeiros mensageiros” em células. A adição da glicose ou de algum açúcar rapidamente fermentecível às células que possuem como característica crescerem em fontes não fermentáveis (condições de desrepressão) gera sinais metabólicos e dispara uma ampla variedade de fenômenos regulatórios (GANCEDO, 1992). O sinal que será produzido irá interagir com o produto de um gene, regulando sua transcrição por ativação de proteínas repressoras ou pela inibição de proteínas ativadoras (GANCEDO, 1992).

A concentração de glicose no meio exerce uma função reguladora importante no metabolismo, sendo que o transporte de açúcar pode ser uma fase limitante do catabolismo durante o processo fermentativo (REIFENBERGER et al., 1997; DOES e BISSON, 1998).

A ausência ou limitação de fontes de nitrogênio é o principal fator de influência na inativação dos transportadores de açúcares devido a diversos fatores de terminam por estimular a degradação de proteínas. Ou seja, a inativação catabólica não deve ser promovida especificamente pelos

1 mecanismos de controle de glicose, mas pela estimulação ao mecanismo
2 regulador das proteínas principais ligadas à deficiência em nitrogênio (NEVES,
3 2003).

4 A fonte de carbono varia em relação às necessidades do microrganismo
5 e à capacidade de absorção. Pode ser açúcares simples, do tipo
6 monossacarídeo, como a glicose ou frutose (BARBOSA et al., 2005),
7 assimiláveis pelas vias EDP e EMP, respectivamente; ou dissacarídeos, como a
8 sacarose (FACCIN et al., 2013), cuja assimilação depende da produção pelo
9 microrganismo; também açúcares complexos, como amido e pectinas,
10 hidrolizados previamente (VAN-THUOC et al., 2007). Como muitas bactérias não
11 produzem hidrolases necessárias à decomposição desses açúcares complexos,
12 há a necessidade de hidrólise prévia para a liberação de açúcares simples
13 facilmente metabolizáveis, através de acidificação ou por métodos enzimáticos
14 (VAN-THUOC et al, 2007).

15 Dado que a síntese de P(3HB) é conhecida por ser favorecida por
16 estresses ambientais, tais como limitação de nutrientes essenciais como
17 nitrogênio, fosfato ou oxigênio (BRAUNEGG et al., 1998) tal estratégia vem
18 sendo amplamente utilizada.

19 Em experimentos em incubadora orbital variando a razão carbono:
20 nitrogênio, com o objetivo de aumentar a produção do polímero sem que a fonte
21 de carbono seja desperdiçada utilizando o microrganismo *B. megaterium*, Faccin
22 (2013) observou que a melhor condição obtida foi para uma razão carbono:
23 nitrogênio igual a 8, com acúmulo de polímero de 70 % de biomassa seca.
24 Entretanto, foi observado que no experimento com limitação de nitrogênio
25 ocorreu o consumo do polímero.

26 López et al. (2012) reportaram acúmulo de P(3HB) próximo de 60 % na
27 bactéria *B. megaterium* em um cultivo com baixa disponibilidade de oxigênio
28 (percentual de oxigênio dissolvido controlado em 20 %), utilizando tanto glicerol
29 quanto glicose como fonte de carbono. Também foi constatado que uma razão
30 de carbono:nitrogênio (20:80) resultou em um menor acúmulo de P(3HB).

31 **2.7 Influência da aeração e agitação no processo fermentativo**

32 Nos processos fermentativos, o estudo relacionado à aeração e agitação
33
34 se torna importante para o desenvolvimento de melhores condições para o
35

1 crescimento do microrganismo desejado. Alguns autores afirmam que para a
2 obtenção de um resultado eficiente, ou seja, o que irá produzir concentrações de
3 produtos elevados quanto possível as condições de aeração e agitação devem
4 possibilitar a dispersão de pequenas bolhas de ar, aumentando a superfície de
5 contato, com consequente suprimento de oxigênio (O₂) aos microrganismos, e a
6 manutenção das células em suspensão e o aumento da transferência de calor e
7 massa do meio (AIBA et al., 1973; WANG et al., 1979; LEE, 1992).

8 Bioquimicamente, o último elemento a aceitar elétrons ao final da cadeia
9 respiratória é o O₂ em processos aeróbios, reduzindo-se então à água,
10 permitindo que ocorra a reoxidação das enzimas que participam das reações de
11 desidrogenação (ao longo da Glicólise e do Ciclo de Krebs), e também a
12 estocagem de energia através da passagem das moléculas de Adenosina
13 difosfato (ADP) para Adenosina trifosfato (ATP); sendo que, as duas irão
14 participar nas reações de síntese de moléculas, para a sobrevivência das células
15 e para o surgimento de novas, durante o processo de proliferação da biomassa
16 microbiana, para as quais é fundamental a introdução de energia (SCHIMIDELL,
17 2001).

18 Para que um cultivo seja altamente eficiente, ocorrendo com elevadas
19 velocidades de crescimento celular, são necessárias altas velocidades de
20 consumo da fonte de carbono, a fim de que haja abundância de elétrons
21 transportados na cadeia respiratória (geração de ATP), mas significa também,
22 obrigatoriamente, a existência de oxigênio dissolvido, a fim de que estes elétrons
23 sejam drenados ao final da cadeia (SCHIMIDELL, 2001). A Equação 1 indica a
24 oxidação completa da glicose.



28 Para que um mol de glicose seja oxidado, é necessário o consumo de seis
29 mols de oxigênio, o que indica a importância da oxigenação de um meio de
30 cultura no processo fermentativo aeróbio. Por ser pouco solúvel em meio líquido
31 (solubilidade do O₂ em água, a 25 °C e no nível do mar, é de 8,6 mg.L⁻¹)
32 (CONNEL, 1999), a demanda de oxigênio durante o processo pode atingir
33 apenas alguns miligramas por litro do meio de cultivo; com isso, o suprimento de
34 oxigênio deve ser de uma concentração eficaz, para que as células encontrem a

possibilidade de converter, de forma adequada, o substrato no produto (NEVES, 2003). Porém, o oxigênio pode apresentar efeitos tóxicos nos microrganismos aeróbios sob pressões parciais não muito maiores que no ar sobre 1 bar. Essa toxicidade é iniciada pela redução univalente do O_2 , a qual, conduz a danos às enzimas, ácidos nucleicos ou lipídeos. Sendo assim, um fornecimento acima do necessário pela demanda de oxigênio pode causar efeitos adversos nas células (SCHIMIDELL, 2001).

O sistema de agitação e aeração tem por objetivo o fornecimento do oxigênio para a manutenção de uma dada atividade respiratória de um certo conjunto de células. Assim, o que se visa é transferir o oxigênio da fase gasosa para o líquido, fazer com que esse oxigênio dissolvido chegue às células suspensas, penetre nessas células e seja consumido na reação (SCHIMIDELL, 2001).

O transporte de O_2 desde a bolha de ar até o interior da célula é afetado e controlado por uma resistência, e essa transferência de oxigênio pode ser subdividida em resistências específicas, como mostra a Figura 9.

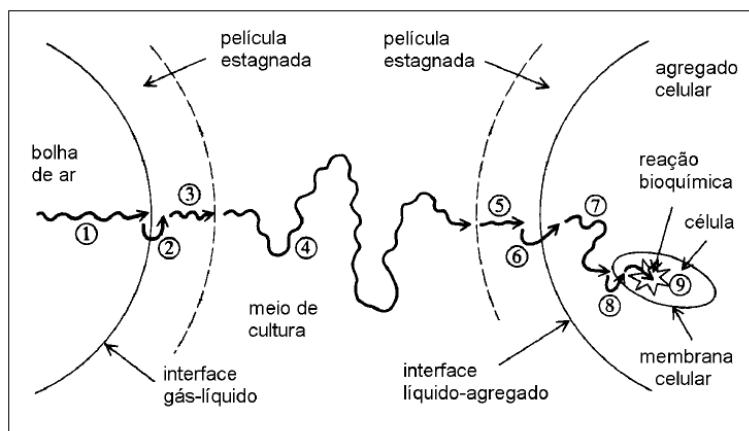


Figura 9. Diagrama do transporte de oxigênio de uma bolha de ar para o interior da célula. 1) Difusão do gás do interior da bolha até a interface gás-líquido. 2) Passagem da interface gás- líquido. 3) Difusão da película estagnada de líquido, externa à bolha.

4) Transporte através do meio líquido. 5) Difusão da película estagnada externa ao agregador celular. 6) Passagem pela interface película estagnada- agregado celular. 7) Difusão no agregado celular. 8) Passagem pela membrana celular. 9) Difusão interna na célula.

Fonte. BAILEY e OLLIS, 1986.

Para a transferência de oxigênio do gás para o líquido, a primeira resistência (1) está relacionada à presença de uma película gasosa estagnada, através da qual o oxigênio deve difundir; a resistência dois (2) está associada à interface gás-líquido; a terceira (3) indica a resistência associada à película líquida estagnada ao redor da bolha de gás. No lado do consumo do oxigênio, há a resistência cinco (5), que é caracterizada pela película líquida em torno da célula; outra imposta pela resistência à membrana celular (6); a resistência devido à difusão do oxigênio no citoplasma (7); a resistência oito (8) está associada à velocidade da reação de consumo final desse oxigênio (SCHIMIDELL, 2001).

Essas resistências, por sua vez, podem ser agrupadas em três grandes grupos (NEVES, 2003):

- 1) Transferência do oxigênio da bolha para a solução.
- 2) Transferência do oxigênio dissolvido através do meio de cultivo.
- 3) Utilização do oxigênio pela célula.

No início do processo fermentativo descontínuo, a demanda de oxigênio é bastante baixa devido ao fato de que a concentração celular ser menor, porém, com o aumento do tempo, a concentração celular se eleva, tornando obrigatório o fornecimento de forma crescente de O_2 (NEVES, 2003).

2.8 Delineamento composto central

A metodologia de superfície de resposta (MRS) tem sido bastante utilizada para modelar pesquisas sobre otimização de processos em nível experimental (MYERS e MONTGOMERY, 1995). A MRS pode ser usado para avaliar o efeito e a interação de vários fatores experimentais controlados (variáveis independentes) que influenciam as respostas selecionadas (variáveis dependentes). Além disso, a MRS tem sido efetivamente aplicada em pesquisas industriais e em estudos biológicos para otimizar processos microbianos e fermentações bacterianas (PREETHA et al., 2007).

Na maioria dos estudos por superfície de resposta, a qualidade das estimativas dos parâmetros depende principalmente do método utilizado e da utilização de planos adequados para a coleta de dados. Esses planos são denominados delineamentos. Dentre os delineamentos mais econômicos,

destacam-se os delineamentos compostos centrais (DCC) (MENDONÇA, 2012), sendo um dos mais populares delineamentos para o ajuste de modelos de até segunda ordem (MYERS e MONTGOMERY, 1995) constituído por três partes: cúbica (fatorial), axial (α) e central.

Segundo Myers e Montgomery (1995), os pontos axiais são situados nos eixos do sistema de coordenadas com distância $\pm \alpha$ da origem. São esses pontos que contribuem de grande modo na estimativa dos termos quadráticos do modelo de segunda ordem, não contribuindo assim para a estimativa dos efeitos das interações. Os responsáveis por isso são os pontos cúbicos, que são as combinações geralmente utilizadas em ajustes de modelos de primeira ordem com ou sem interações duplas entre os fatores. O ponto central, além de ser responsável também pela estimativa dos efeitos quadráticos, possibilita a estimativa do erro puro, quando ele é repetido.

Portanto, dada à economia do número de combinações planejadas pelo DCC e pela expectativa promissora desse delineamento, torna-se importante verificar o seu potencial em delinear tratamentos visando os ajustes de superfícies de respostas para experimentos que apresentam naturalmente maiores efeitos aleatórios.

No estudo de Rodríguez- Carnona e colaboradores em 2007, o uso do Delineamento composto central Rotacional (DCCR) mostrou ser uma ferramenta útil para o estudo de otimização de meio utilizando um subproduto industrial de óleo como fonte de carbono para a produção de PHA por *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (NCIMB 40045), obtendo como resultado um aumento na produtividade da biomassa de 0,06 para 0,39 g.L⁻¹h⁻¹ e aumento na produtividade de PHA de 0,03 para 1 g.L⁻¹h⁻¹.

O delineamento para o ajuste do pH e concentração de açúcar na fase de multiplicação celular para o aumento do acúmulo de P(3HB) pela *R. solanacearum* RS em agitador incubador orbital, estudado por Macaganan et al., (2018), resultou em um aumento significativo (DO_{600nm} 20,6 abs e MCS 5,35 g.L⁻¹) quando utilizada a sacarose como fonte de carbono e um pH mais ácido, comparado ao uso da glicose também em pH ácido, que proporcionou uma DO_{600nm} 12,5 e MCS 2,74 g.L⁻¹.

2.8 Microrganismos produtores de PHAs

Bactérias Gram positivas e negativas têm a capacidade de acumular PHAs, podendo ser encontradas em diversos locais na natureza, como solo, água do mar, efluentes, entre outros (BYROM, 1987). Já foram citados na literatura mais de 300 microrganismos capazes de sintetizar PHAs, porém, somente uma pequena parte é empregada no desenvolvimento de processos produtivos incluindo, *Ralstonia* sp., *Azotobacter vinelandii*, *Alcaligenes latus*, *Cupriavidus necator* nativo e recombinante, *Escherichia coli* recombinante, *Alcaligenes eutrophus*, *Protomonas extroquens*, *Chromobacterium violaceum* (LEE, 1996b) e *Pseudomonas* sp. (CROCHEMORE, 2012) e *Bacillus* sp. (RODRIGUES et al., 2016- dados não publicados). Em condições de desenvolvimento normais, a maioria das bactérias acumula uma pequena porcentagem de PHA (1 a 15%), porém, em condições especiais de crescimento e com estratégias de fermentação adequadas, podem alcançar altos valores (próximo a 90%) de sua massa celular seca (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005).

Com isso, a seleção do microrganismo para produção industrial de PHA é baseada em vários fatores, como alta velocidade de crescimento, utilização de diferentes substratos, principalmente de baixo custo, capacidade de acumular grande quantidade de polímero (ao menos 60% da massa celular seca) e elevado fator de conversão do substrato em biopolímero (LEE, 1996a; RAMSAY et al., 1990). Na produção industrial é exigido que as linhagens de microrganismos com o máximo de características associadas à produção, como rápido crescimento em fontes de carbono de baixo custo, porcentagem alta de PHA, eficiência na transformação do substrato em produto, adaptação e extração do polímero pelas células bacterianas, além de ser inofensivo aos seres humanos e ao meio ambiente. Além disso, a linhagem bacteriana utilizada para a produção do polímero deve apresentar baixa demanda de oxigênio (CHEN, 2003).

Os microrganismos usados para a produção de PHAs podem ser divididos em dois grupos. O primeiro grupo (I) é caracterizado por produzir o polímero quando em excesso de carbono e o seu crescimento é interrompido ou reduzido pela carência de nutrientes essenciais como N, P, Mg, K, S ou mesmo O (LEE, 1996b). Já o segundo (II), acumula quantidades expressivas de PHA ainda em

fase de crescimento celular (LEE, 1996b; CROCHEMORE, 2012). Em ambos os grupos, excesso de carbono é necessário (LEE, 1996b). Com isso, o desenvolvimento e a estratégia de crescimento é dependente do tipo de microrganismo que é estudado. Normalmente, bactérias que pertencem ao primeiro grupo apresentam melhores condições em sistema de fermentação em batelada dividido em duas etapas, enquanto microrganismos do segundo grupo demonstram melhores resultados quando são produzidos em sistema de alimentação contínua (VANDAMME e COENYE, 2004).

2.9 *Ralstonia solanacearum*

Dentre os microrganismos acumuladores de P(3HB), o gênero *Ralstonia* sp. possui elevado rendimento de polímero (aproximadamente 80%) em relação à biomassa, velocidade de produção alta e possibilidade de cultivo em diferentes substratos, tornando-o favorável à produção industrial (BYROM, 1987; RAMSAY et al., 1990).

Ralstonia solanacearum pertence ao domínio Eubacteria, divisão Proteobacteria, classe β -Proteobacteria, ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae e gênero *Ralstonia* (EUZÉBY, 2011). Inicialmente descrita como *Bacillus solanacearum*, em 1896, por Smith, *R. solanacearum* também foi denominada *Pseudomonas solanacearum*, em 1914; em 1992 foi transferida para o gênero *Burkholderia*, e, em 1995, após análises moleculares, foi reclassificada como *Ralstonia solanacearum* (YABUUCHI et al., 1992; YABUUCHI et al., 1995).

A *R. solanacearum* é uma bactéria Gram-negativa, com uma temperatura de crescimento de 25 até 35 °C, aeróbica estrita, em forma de bacilo, não esporogênica e não fluorescente, medindo de $0,5-1,0 \times 1,5-4,0 \mu\text{m}$, móvel por meio de um ou mais flagelos polares, com exceção de cepas virulentas, que são imóveis por não possuírem flagelos. A espécie é tolerante a sais e agente causal da murcha bacteriana que acomete mais de 54 famílias botânicas. Já foram coletados isolados tanto na água quanto no solo (MEHAN et al., 1994).

R. solanacearum RS, isolada de cactos por pesquisadores do laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel e mantida na coleção de culturas do Laboratório de Biopolímeros da unidade do curso de Biotecnologia

do Centro de Desenvolvimento Tecnológico- CDTec/ UFPel, foi o objeto de estudo para o crescimento celular otimizando os parâmetros de aeração e agitação em biorreator de bancada.

2.10 *Bacillus* sp.

Dentre os microrganismos produtores de PHA, destacam-se os *Bacillus*. São encontrados normalmente no ambiente, porém, diante da grande variedade existente, são pouco explorados. O gênero *Bacillus* apresenta características desejáveis para a produção de PHA, como o curto tempo de geração, crescimento fácil que possibilita alcançar uma alta densidade celular, utilização de fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo, como tolerância a alta temperatura e alta pressão osmótica. Com condições adequadas, apresentam rápido crescimento e são capazes de se desenvolver em diversas fontes de carbono de baixo custo (WU et al., 2001). Além de serem capazes de secretar grande quantidade de enzimas e serem considerados bons “hospedeiros” para a expressão de genes heterólogos (LAW et al., 2003).

As bactérias pertencentes ao gênero são bastante empregadas na produção industrial, sobretudo na obtenção de enzimas e proteínas, podendo citar a produção industrial de vitamina B12, penicilina amidase, enzima utilizada na produção de antibióticos sintéticos, entre outras (VARY, 1994). Todavia, não são muito utilizadas na produção de PHAs, principalmente por consumir a reserva de biopolímero para fins de esporulação, levando a um baixo percentual de acúmulo (WU et al., 2001), mas, apesar disso, muitos estudos estão sendo realizados na tentativa de aumentar o acúmulo de PHA por esta bactéria, testando fontes de carbono alternativas e de baixo custo (FACCIN et al., 2013).

B. megaterium CN3, isolada do solo em 1999 por pesquisadores do Laboratório de Biopolímeros da unidade do curso de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico- CDTec/ UFPel e mantida em sua coleção de culturas, foi o objeto de estudo para o crescimento celular otimizando a fonte de carbono e pH inicial para posterior comparação dos meios de cultivo na produção de P(3HB) em agitador incubador orbital.

Capítulo 1- Artigo 1

Poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB): A Review of Production Process Technology

Artigo publicado no periódico - *Industrial Biotechnology*

DOI: 10.1089/ind.2017.0013

Qualis 2013-2016 em Ciência dos Alimentos: A2

Fator de impacto: 1.13

INSS: 1550-9087

Poly (3-hydroxybutyrate)-P (3HB): A Review of Production Process Technology

Mariane I. Alves¹, Karine L. Macagnan², Amanda A. Rodrigues², Dener A. de Assis³, Matheus M. Torres², Patrícia D. de Oliveira², Lígia Furlan³, Claire T. Vendruscolo², Angelita da S. Moreira^{1,3*}

¹Department of Food Science and Technology, Faculty of Agronomy
Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

²Technological Development Center, Biotechnology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

³Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

*Corresponding author: Angelita da Silveira Moreira; Adress: Campus
Universitário- Universidade Federal de Pelotas, s/n- Prédio 19 CEP: 96010-900-
Caixa Postal: 354- Pelotas/RS; e-mail: angelitadasilveiramoreira@gmail.com

Abstract: For decades, the conventional plastics obtained from fossil fuel sources have been used indiscriminately due to their durability and resistance. However, their use is problematic because of their rapid disposability and slow degradation. The growing scientific interest in the environmental issues associated with the rising consumption of plastics has become of increasing importance in the quest to develop biodegradable substitutes. Poly (3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] is one of the most studied and characterized microbial biopolymers from the family of polyhydroxyalkanoates (PHAs), the main features are rapid biodegradability, low toxicity, and biocompatibility. The worldwide production of PHAs is approximately 100 t/year, with expected to grow to 500,000 t/year by 2020. Researchers have sought to increase the intracellular accumulation and polymer yield of PHAs by screening strains and improving the cultivation and operating procedures employed during the production processes. The synthesis of P(3HB) normally involves two stages. The first step occurs under growing conditions without nutrient limitation. The second step, polymer production, occurs under conditions in which some of the essential nutrients, such as P, Fe, Mg, and C, are limited and carbon is excessive. This review presents an

overview of the metabolic mechanisms of synthesis, production process, recovery and applicability of P(3HB)- related microorganisms as potential producers. It also highlights studies on the optimization of carbon and nitrogen sources in the culture medium and operational parameters that optimize the bioprocess used to obtain P(3HB), both at laboratory- and industrial- scale.

Keywords: polyhydroxyalkanoate; bioprocess; bioplastic; culture conditions; operating parameters

Introduction

The economic exploitation of polymers of biological origin, or biopolymers as they are also known, has occurred in parallel with human development. For many years, there has been considerable interest in the biopolymer polysaccharides produced by microorganisms. These polysaccharides are known as microbial biopolymers and have the ability to form viscous solutions and gels in aqueous media.¹ Recently, however, other types of microbial biopolymers have attracted attention due to their thermoplasticity characteristics and solubility in association to biodegradability: the polyhydroxyalkanoates (PHAs), including poly(3hydroxybutyrate) and its copolymers.²

This review describes the metabolic mechanisms of the synthesis, the production process, recovery and applicability of P(3HB) and the potential microorganisms that can produce P(3HB) both in laboratory and industrial scale, emphasizing the various studies involving carbon and nitrogen sources in the culture medium and the operational parameters by which a higher yield of biopolymer can be obtained.

Biodegradable Plastic Polymers

Three types of biodegradation are of interest when examining biodegradable plastics: completely biodegradable, photo-biodegradable, and semi-biodegradable. The first type encompasses those plastics that have an intrinsic biodegradation characteristic. For example, the composition of photo-biodegradable polymers includes additives that incorporate polymer chain groups that are sensitive to light. The degradation of these plastics is initiated when they

are exposed to ultraviolet radiation and, as a consequence, complete biodegradation may occur. Semi-biodegradable blends incorporate biodegradable polymers, such as starch, and additional polymers that are non-biodegradable. Thus, microorganisms can attack the starch and, therefore, instigate a process of biodegradation; however, the non-starch portion of the polymer remains non-biodegradable.³

Relative to the origin, fully biodegradable polymers are classified into four groups: i) agro polymers, which are generally obtained by fractionation of biomass from agro products and are divided into polysaccharides, proteins, and lipids; ii) microbial biopolymers, which are synthesized by the microorganisms from renewable sources, as is the case of polyhydroxyalkanoates (PHAs); iii) chemically semi-synthesized polymers, which are derived from monomers of the biotechnological processes, such as poly (lactic acid) (PLA), which can be obtained by polymerizing the lactic acid produced by microbial fermentation; and iv) polymers from non-renewable sources (fossil fuels), which are synthesized by chemical processes such as aromatic copolyesters like poly- butyrate (PBAT).⁴

The breakdown of biodegradable materials in the environment depends on factors such as how the polymer is discarded, the presence of micro-specific enzyme generators that facilitate decomposition, temperature, pH, the oxygen content in the medium, and nutrients.⁵ Further, the intrinsic factors of the polymer, such as the degree of crystallinity and molar mass, may influence the rate of biodegradation.⁶

PHAs

The discovery of bright lipophilic granules in *Beijeirinckia* cells was reported for the first time in 1888; however, it was not until 1923 that Maurice Lemoigne utilized the *Bacillus megaterium* and identified the first compound named 3-hydroxybutyrate [P(3HB)] as a probable storage material. Over the next thirty years, interest in P(3HB) was restricted to the description of methods of detection and the determination of the bioplastic content of cells and culture conditions that would lead to their synthesis and degradation by the bacillus. In 1958, Wilkinson Macre found that the storage granules of *B. megaterium* increased when the medium proportions of glucose and nitrogen were increased,

1 and he concluded that these compounds were likely a source of carbon and
2 energy for the microorganism studied.⁷

3 In Brazil, the technology associated with the production of PHAs,
4 biodegradable and biocompatible plastics, was first introduced in the 1990s at the
5 Institute for Research and Technology (IPT), Copersucar®, and the University of
6 São Paulo, where researchers used carbohydrates as the starting material and
7 sought strategies by which it was possible to use the micro-organism derived
8 from Brazilian soil.

9 The low cost of sugar production in Brazil in combination with the energy
10 surplus of sugar and alcohol entails that Brazil is an ideal location for the
11 integrated production of these polymers. Thus, their production was inaugurated
12 in September 2000 by PHB Industrial, a company that produced and marketed
13 biodegradable plastic type P(3HB) under the name of Biocycle®.⁸ The industry
14 operated on a pilot scale until 2015 and even exported products to Japan.
15 However, the industrial plant is now defunct.

16 PHAs represent a class of polyesters that uses many microorganisms as
17 a natural source. These microorganisms accumulate in the form of granules that
18 have an intracellular carbon reserve function for energy.⁹ The accumulation of
19 these granules can exceed 80%.¹⁰ These polymers have attracted significant
20 attention from researchers because they are thermoplastic, biodegradable, and
21 elastomeric, and can be produced from renewable sources.^{10- 18}

22 An important feature of PHA is that it is biodegradable. In nature, many
23 microorganisms can degrade PHA through hydrolase enzymes and the PHA
24 depolymerase produced within the cell so PHA can be used as a carbon source.
25 However, these enzymes cannot degrade the polymer externally; i.e., after it is
26 removed from the cell, and this is potentially due to the change from the
27 crystalline state to the amorphous state.

28 Many of the microorganisms found in soils, marine waters, and lakes have
29 an extracellular PHA depolymerase that can degrade the polymer after removal
30 from the cell so it can be used as a carbon source. The degradation ability of PHA
31 is not restricted to bacteria; many fungi can also degrade these biopolymers.^{19- 21}
32 The activity of these enzymes may vary and depend on the polymer composition,
33 physical form of the sample dimensions, and the environmental conditions.⁹

The rate of the biodegradation of PHAs is influenced by several factors, some of which are related to the environment, such as time, temperature, humidity, pH, and nutrient availability, and others that are related to the biopolymers (composition, crystallinity, additions, thickness, and surface area). Biodegradation starts on the surface through a process of enzymatic hydrolysis.^{21,22} The enzymatic degradation involves two steps: First, the adsorption of the enzyme on the polymer surface; second, the hydrolysis of the polymer chains, which occurs in the active site of enzymes.^{21,23}

Under aerobic conditions, degradation results in the production of carbon dioxide (CO₂) and water (H₂O). However, under anaerobic conditions, degradation occurs at the end of the process, resulting in the production of CO₂ and methane (CH₄).³ Among the means proposed as inoculants of the degradation of this biopolymer include activated sludge and organic soil.

P(3HB)

P(3HB) is the PHA that has been the most frequently studied and characterized to date. P(3HB) is a natural polymer and biodegradable aliphatic homopolymer type that is composed of monomers of four carbon atoms.²⁴ It is soluble in some organic solvents and insoluble in water.¹⁸ It has the chemical formula (C₄H₆O₂)_n, which corresponds to 55.81 % carbon, 7.03 % hydrogen, and 37.16 % oxygen by weight.²⁵

The industrial interest in the use of P(3HB) emerged during the 1960s when its thermoplastic properties were first described.²⁶ Its synthesis was first conducted in 1971 via the polymerization of a racemic mixture of β -butyrolactone using a catalyst system of triethylaluminum and water, which resulted in a stereoregular polymer that is partially optically inactive. In additional studies, P(3HB) was biotechnologically obtained from bacteria with a low molar mass (1x10⁴ Da) and crystallinity (29 %).^{25,27}

Because of its interesting thermoplastic properties, in its original form, P(3HB) can be processed as a classic thermoplastic, resisting a wide temperature range from 30 °C to 120 °C.²⁸ P(3HB) is non-toxic, and its degradation produces 3-hydroxybutyric acid, a normal constituent of human

1 blood even at high concentrations; thus, it can be used both in products that come
2 into contact with human or animal tissue and for human consumption.²⁹

3 At present, several companies are dedicated to the production of PHB and
4 its co-polymers on both a pilot and industrial scale. The largest number of
5 manufacturing companies are located in China. The Tian company produces
6 P(3HB-co-3HV), trade name Enmat®. It had an estimated capacity of 2,000 t/year
7 in 2007, but this is expected to rise to 50,000 t/year by 2020. Green Bio-DSM
8 produces KanekaPHBH® [P(3HB-co-3HHx)]; unfortunately, its pilot and
9 industrial-scale capacities were not disclosed in 2007, nor was its outlook for the
10 year 2020. The Tianzhu company produces PHBH®, i.e., the polymer form of
11 P(3HB-co-3HHx) on both pilot and research scales.

12 Danimer Scientific (Bainbridge, GA) produces Meredian PHA, which is a
13 non-specific polymer. Production of this polymer is expected to reach 272,000
14 t/year by 2020. Additionally, in the United States, the Tephaflex® TephElast®
15 polymers are produced at both pilot and research scales. In Japan, Mitsubishi
16 (Tokyo) produces P(3HB) under the trade name Biogreen® at both the pilot and
17 research scales. It did not disclose its production capacity in 2007 or its expected
18 future capacity for 2020. Kaneka (Osaka, Japan) produces P(3HB-co-3HHx),
19 marketed as Kaneka PHBH, with a capacity in 2007 of 100 tons/year; the forecast
20 for 2020 is 50,000 tons/year. In Ulm, Germany, Biomers produced 10 tons/year in
21 2007 under the name Biomer™ at both the pilot and research scales. In Canada,
22 the Biomatera (Toronto) company produced the polymer P(3HB-co-3HV),
23 marketed under the name Biomatera®, at both the research and pilot scales. The
24 Bi-on Company (Bologna, Italy) produces PHA-MINERV, which is completely
25 degraded within 10 days in the normal river water, and is considered an
26 alternative to polyethylene terephthalate, polyethylene, polypropylene,
27 highdensity polyethylene, and low-density polyethylene. BASF (Ludwigshafen,
28 Germany) produces P(3HB) and poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)
29 (P(3HBV)) biopolymers at pilot scale. The same polymers are produced in the
30 United States by Monsanto (St. Louis, Missouri). In China, TianAn Biopolymer
31 produced P(3HBV) with the commercial name ENMAT® at industrial scale (2,000
32 tons/year), and until 2007, Tianjin GreenBio produced 1,000 tons/year of the
33 copolymer P(3HB-co-4HB).

1 While there has been expansion, many industries have ceased production
2 of PHAs. Zeneca, located in England, produced Biopol® polymer P(3HB-co-3HV),
3 but suspended production in 1996; Monsanto, which produced the Biopol® brand
4 (P(3HB)/PHV/PHA) in Italy, ceased production in 1998. Procter & Gamble
5 (Cincinnati, OH) produced Nodax® P copolymer (3HB)/HHX, but ended this
6 activity in 2006. However, it passed its production technology to Kaneca and
7 Meredian, now Danimer. The technology Biopol®, which belonged to Zeneca,
8 was transferred initially to Monsanto, which, in turn, transferred it to Metabolix
9 (Cambridge, MA). In 2007, Metabolix and Archer Daniels Midland company
10 (ADM; Chicago, IL) formed the Telles Company, which was dissolved in 2012.
11 The Imperial Chemical Industries (London, England) produced the copolymer
12 P(3HBV) until 2008.

13 Until recently, P(3HB) was produced in Brazil by the PHB SA company
14 under the name BIOCYCLE®. The company, located in Serrana, São Paulo,
15 operated in partnership with the Institute of Technological Research, Copersucar,
16 and the University of São Paulo. They used the microorganism *Ralstonia*
17 *eutropha*, which was genetically modified for the use of sucrose as a carbon
18 source, in a pilot plant. The company projected a capacity of 10,000 tons/year for
19 2020 but ceased production of P(3HB) in mid-2015. Table 1 shows the main data
20 related to the industrial production of P(3HB).

21 P(3HB) is similar to polypropylene in that it is insoluble in water; offers
22 equivalent high-melting temperature and shear stress; and has high crystallinity.
23 However, it has less strength at rupture,³⁰ which results in a brittle material due
24 to its low thermal stability and rigidity.^{9,15,21,31} P(3HB) has the ability to
25 hydrolytically degrade, which distinguishes it from the majority of biodegradable
26 polymers that are currently available because they are typically sensitive to light
27 or moisture or are water soluble. It has excellent solvent resistance and exhibits
28 a high resistance to oils, fats, and UV rays, yet exhibits low resistance to acids
29 and alkalis. In comparison to polypropylene, P(3HB) has a higher density and
30 lower oxygen permeability, resulting in an oxygen-sensitive material that is
31 suitable for use in packaging.²⁸

Table 1. Global production of P (3HB).

Company	Country	PHA Comercial name	(co) Polymer	Capacity (2007)	Future Capacity (2020)
Tianan	China	Enmat	P(3HB-co-3HV)	2.000 t/year	50.000 t/year
Telles	USA	Mirel	Copolymers de P(3HB)	250 t/year	500.000 t/year
Kaneka	Japan	Kaneka PHBH	P(3HB-co-3HHx)	100 t/year	50.000 t/year
Green Bio- DSM	China	Green Bio	P(3HB-co-4HB)	-	-
Biomers	Germany	Biomer	P(3HB)	10 t/year	-
Mitsubishi Gas Chemical	Japan	Biogreen	P(3HB)	-	-
Biomatera	Canada	Biomatera	P(3HB-co-3HV)	-	-
Danimer	USA	Meridian PHA	-	-	272.000 t/year
Tepha	USA	Tepha Flex, TephElast	-	-	-
Tianzhu	China	PHBH	P(3HB-co-3HHx)	-	-
Bi- on	Italy	Minerv- PHA	-	-	-
Zenica	England	Biopol	(P3HB-co-3HV)	Disabled in 1996	
Monsato	Italy	Biopol	(P(3HB)/PHV/PHA)	Disabled in 1998	
Procter & Gamble	USA	Nodax	P(3HB)/HHx	Disabled in 2006	
PHB Industrial	Brazil	Biocycle	P(3HB) e P(3HB-co- 3HV)	50 t/year	10.000 t/year Disabled in 2015
Imperial Chemical Industries	England		P(3HBV)		Disabled in 2008

BASF	Germany		P(3HB); P(3HBV)		
Monsanto	USA		P(3HB); P(3HBV)		
TianAn Biopolymer	China	ENMAT	P(3HBV)	2000 t/year	
Tianjin GreenBio	China		(P3HB-co-4HB)	1000 t/year	

1 Microorganisms Producing PHAs

2
3 Positive and Gram-negative bacteria have the ability to accumulate PHAs
4 and can be found in several sources in nature including soil, sea water, and
5 wastewater.¹⁰ More than 300 microorganisms capable of synthesizing PHAs
6 have been listed in the literature; however, only a small number are currently
7 used in the development of PHAs, including *Ralstonia sp.*, *Azotobacter vinelandii*,
8 *Alcaligenes latus*, *Cupriavidus nate* and *recombinant necator*, *recombinant*
9 *Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus extroquens* *Protomonas*,
10 *Chromobacterium violaceum*,¹⁵ and *Pseudomonas sp.*³² Under normal growth
11 conditions, most bacteria build up a small percentage of PHA (1–15%); however,
12 under special growth conditions and fermentation strategies, the PHA percentage
13 can reach almost 90% of its dried cell mass.²³

14 As such, the selection of microorganisms for the industrial production of
15 PHAs is based on several factors, such as highspeed growth, the use of different
16 substrates, the relative cost, the ability to accumulate a large amount of polymer
17 (at least 60% of the dry cell mass, DCW), and the high conversion factor of the
18 substrate biopolymer.^{15,32} To be viable for industrial production, it is important
19 that the strains of microorganisms that are employed in the process have
20 optimum characteristics associated with production; for example, rapid growth in
21 a lowcost carbon source, a high percentage of PHA efficiency in the
22 transformation of substrate to product, and efficient adaptation and extraction of
23 the polymer into bacterial cells. They also need to be safe for both humans and
24 the environment. Furthermore, the bacterial strain used to produce the polymer
25 should have a low oxygen demand.³³

26 The microorganisms used for the production of PHAs can be divided into
27 two groups. The first group is characterized by polymer production in the
28 presence of excessive carbon; growth is stopped or reduced by a lack of essential
29 nutrients such as N, P, Mg, K, S, or O.¹⁵ The second accumulates significant
30 amounts of PHA, even during the cell growth phase.^{15,32} Thus, both the
31 development and growth strategy are dependent on the type of microorganism
32 studied. The bacteria that belong to the first group typically perform better in a
33 batch fermentation system divided into two stages, while the microorganisms
34 from the second group yield better results when they are produced in a

continuous feed system.³⁴ Table 2 shows the different PHA production levels by microorganisms.

Table 2. PHA yield (%) by different microorganisms

Microorganisms	PHA	Group	PHA (%)
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	P(3HB)	I	1,1-5,0
<i>Chromobacterium violaceum</i>	P(3HV)		62
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	P(3HV)		0,02
<i>Pseudomonas putida</i> BM01	P(3HV)		55
<i>Pseudomonas putida</i> GPp104	P(3HB)		14-22
<i>Cupriavidus necator</i>	P(3HB-co-3HV)		74
<i>Pseudomonas sp.</i>	P(3HB)	II	29
<i>Ralstonia solanacearum</i>	P(3HB)		45

Among the wide variety of biopolymer known PHAs, the P(3HB) is widely distributed. This, along with poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), [(PHB-HV)] and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [(PHB-HHX)], are the most industrially produced and exploited PHAs on a commercial scale.³³

Production of P(3HB)

The synthesis of P(3HB) commences with the non-limited growth phase, during which cell growth occurs. Following that, the polymer is then produced and accumulated; however, this commonly take place in the limited presence of essential nutrients such as P, Fe, Mg, and N, with excess carbon.²³ Under these conditions, the microorganism rapidly grows and multiplies until the consumption of the initial total carbon and the depletion of essential nutrients; in the absence of these, the cell growth is limited, and the carbon is converted to PHA.³⁵ Fig. 1 presents a flowchart of the P(3HB) production process. Using a pure culture and incubating in a initial volume of medium (V1), the pre-inoculum is obtained. After a certain time, the V1 increases to a larger volume (V2), and this process continues until the V5 volume is reached, which corresponds to the final inoculum. The produced inoculum is then transferred to a bioreactor containing compressed air, and the culture medium is sterilized to initiate the bioplastic

manufacturing process. During the polymer recovery step, the culture medium undergoes centrifugation or filtration, and the pellet, in turn, is extracted using an organic solvent. Finally, the cell debris is discarded, and the organic phase is evaporated, resulting in P(3HB). After its formation, P(3HB) can be used in a variety of materials including pharmaceutical capsules, plastic objects, scaffolds, sutures, and dental prostheses.

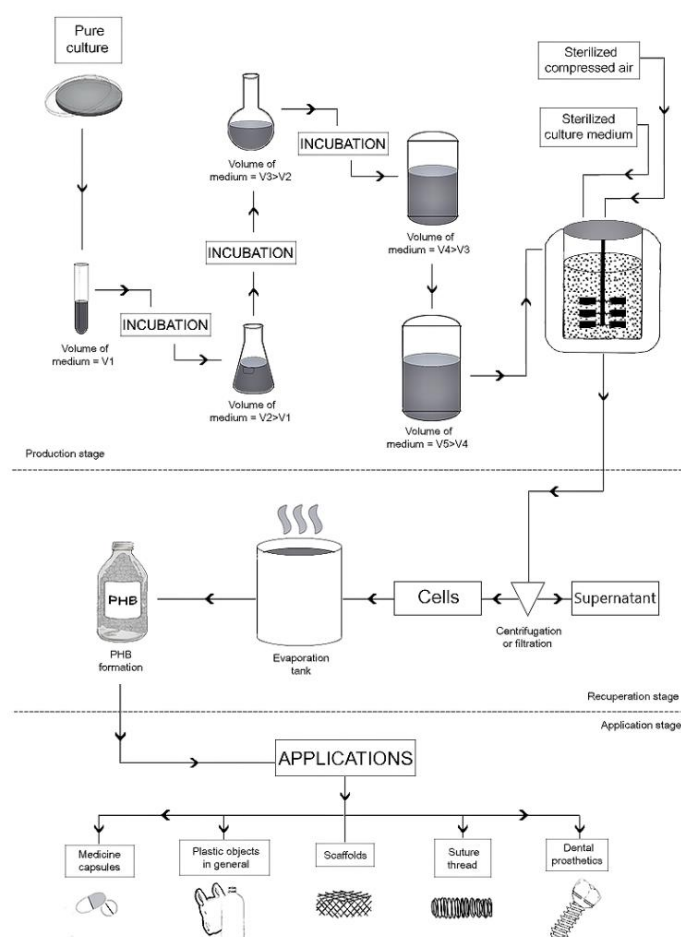
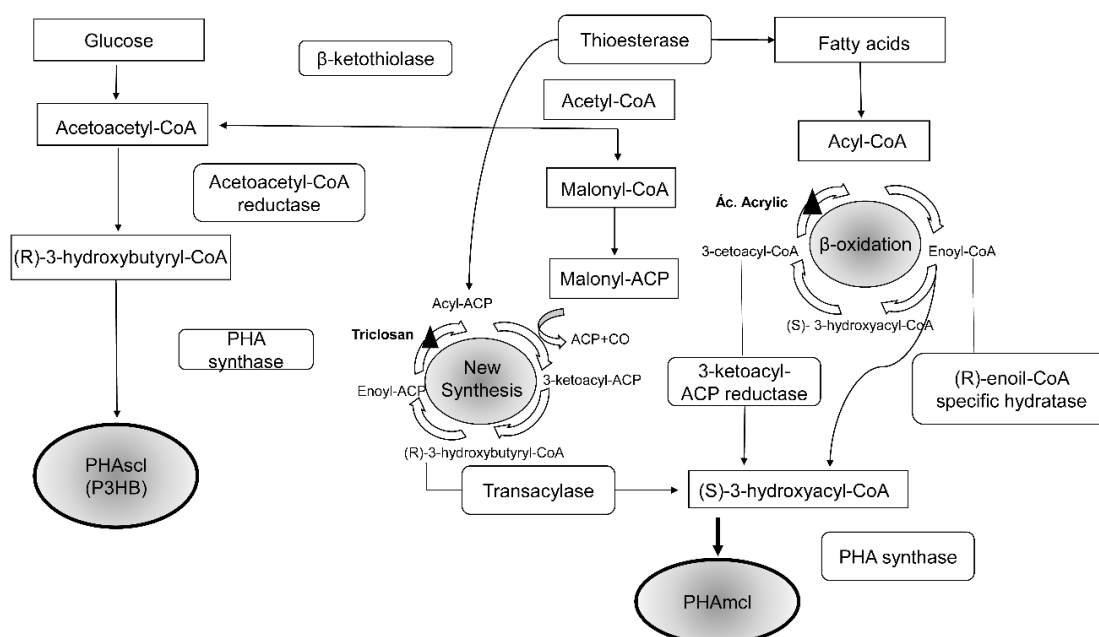


Figure 1. Production process P(3HB) with its phases of production, recovery and applicability

Bacterial Metabolism

Microorganisms are capable of producing PHA from monomers through the use of various carbon sources. Many pathways have been proposed to produce such monomers. The biosynthetic pathways used to obtain PHA can be based on the monomeric composition: The first group is related to the synthesis

- 1 of PHAscl, and the second group is represented by the synthesis of PHAmcl. Fig.
 2 2 shows the metabolic pathways for the synthesis of PHA.



3
 4 **Figure 2. Scheme for metabolic routes synthesis PHA Source.**
 5

6 The synthesis of PHA requires three metabolic phases. In the first phase,
 7 a carbon source enables synthesis via a local transmission system through the
 8 cytoplasmic membrane of the cell or via the diffusion of the compound into the
 9 cell. In the second phase, anabolic or catabolic reactions, or even both, convert
 10 the compound into hydroxyacyl coenzyme A, a thioester, which serves as a
 11 substrate for PHA synthase, also called PHA polymerase. In the third phase, PHA
 12 synthase, which is the key enzyme for PHA synthesis, catalyzes the formation of
 13 ester linkages with the release of coenzyme A.³⁶

14 The metabolism of the microorganisms is directed according to the
 15 medium in which they are grown. With balanced growth, the microorganism uses
 16 the substrate as an energy source and/or for the maintenance/formation of
 17 cellular material; however, when there are both limited essential nutrients and
 18 excess carbon in the medium, the carbon substrate is used to form biopolymers
 19 that can be stored as energy reserves in the cell.³⁷

20 The PHB polymerase is considered the key enzyme for the accumulation
 21 of P(3HB) because it performs catalysis, which is the main step involved in the
 22 pathway; i.e., the polymerization of D(-)-3-hydroxyacyl-CoA to form the polymer.

1 This enzyme has four classifications that differ according to the substrate
2 specificity and composition of the enzymatic subunit.⁹

3 One of the intermediates for the synthesis of P(3HB) is acetyl-CoA, which
4 is required for the synthesis of the monomer (R) -3-hydroxybutyryl coenzyme A
5 (3HB-CoA). However, this molecule is also a key component for cellular
6 metabolism because it is oxidized by tricarboxylic cycle (TCA), also known as the
7 citric acid cycle or Krebs cycle. Acetyl-CoA, which is the central intermediary
8 metabolite of all carbon compounds, can be used to generate biologically useful
9 energy or for growth and multiplication.³⁸ Fig. 3 presents a schematic of the
10 possible metabolic routes by which P(3HB) and the biomass by glycerol or
11 glucose can be obtained. For glucose metabolism, it is possible to use the
12 Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway, also known as glycolysis or the
13 glycolytic pathway, and the Entner-Doudoroff pathway (EDP). Another route that
14 can be utilized is the pentose phosphate pathway.³⁹

15 The synthesis of P(3HB) is favored when there is a high concentration of
16 Acetyl-CoA and NADPH and a low concentration of free Coenzyme A.²⁵ Tyo et
17 al., (2010)³⁹ showed that, for recombinant *E. coli*, the enzyme acetoacetyl-
18 coenzyme A reductase NADPH-dependent (Phab) is responsible for controlling
19 the metabolic pathway that produces P(3HB). The NADPH cofactor that is
20 consumed in the reaction of the condensation of 2 acetyl-CoA needs to be
21 regenerated in some other metabolic pathway for the synthesis of P(3HB) to
22 continue.⁴⁰

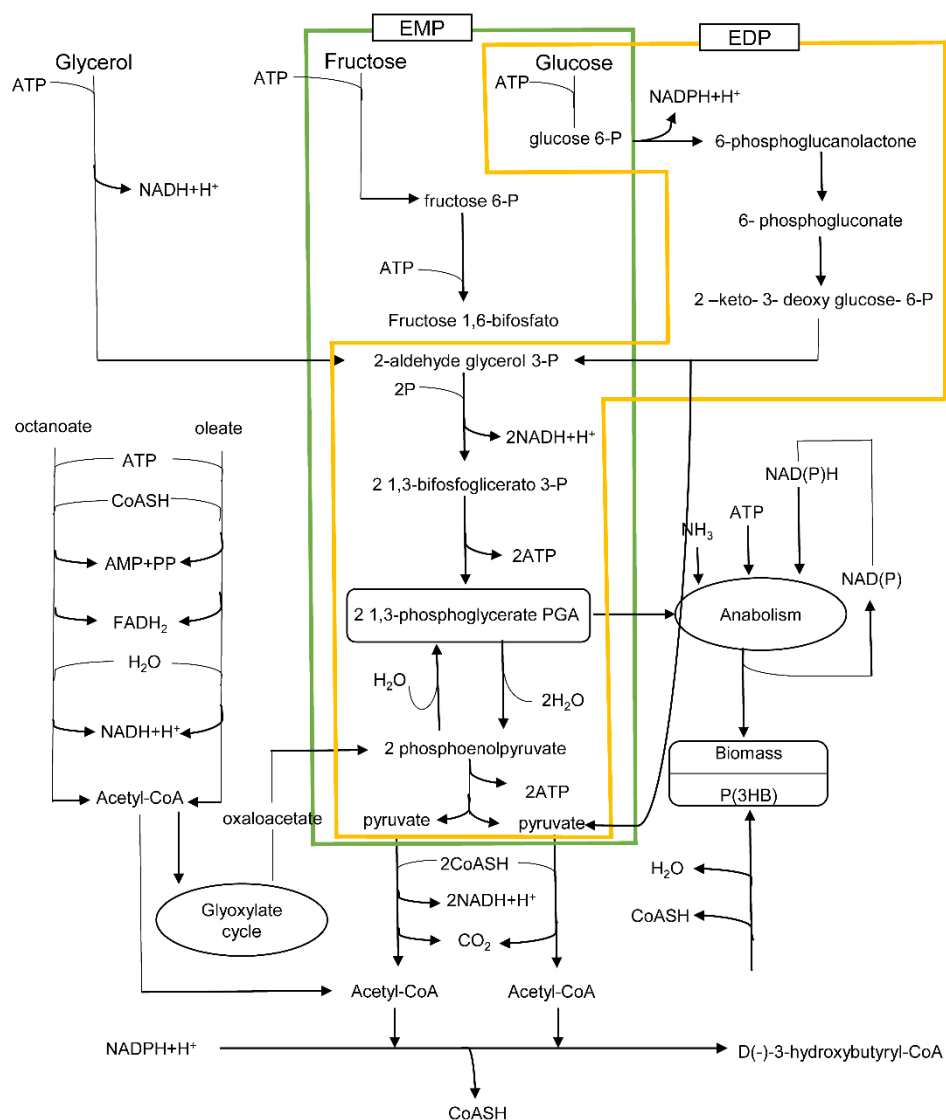


Figure 3. Scheme of the main metabolic pathways of residual biomass synthesis and P (3HB) from different carbon sources. EMP: Embden-Meyerhof- Parns. EDP: Entner- Doudoroff Pathway.

Medium Cultivation

Culture medium containing minerals (mineral resources) is most commonly used when it is intended for the accumulation of P(3HB) in the bacterial cytoplasm. The medium primarily comprises citric acid salts (0.1 to 1.7 g/L), calcium chloride (0.01 to 0.02 g/L) and sodium (0.8 g/L), potassium phosphate (1.5 to 5.5 g/L) and sodium (0.6 to 9.0 g/L), ammonium sulfate (1.0 to 5.0 g/L), and magnesium (0.2 to 1.2 g/L), as well as a solution of trace elements or trace elements. The solution of trace elements may contain boric acid, manganese

chloride and copper sulphates, iron, nickel, and zinc.⁴¹⁻⁴⁷ In addition to these nutrients, a source of carbon and nitrogen, which can widely vary, must be supplied to the microorganism.

The fed-batch fermentation approach is considered the most effective in achieving high-cell-density cultivation.⁴⁸ By using the appropriate substrate feeding technique, the concentrations of key nutrients (generally the carbon source) can be maintained at an optimum level for a high yield and productivity.^{49,50}

The carbon source varies in relation to the microorganism's needs. In terms of the absorption capacity, it can be a simple sugar, such as a monosaccharide, e.g., glucose or fructose,⁴² which can be assimilated by the EDP and EMP pathways, respectively; or disaccharides, such as sucrose,⁴⁵ the assimilation of which depends on the sucrose produced by the microorganism or the prehydrolysis of these complex sugars, such as starch and pectins, as a good source of sugars.

However, many bacteria do not produce the necessary hydrolase decomposition that is commonly required for the hydrolysis step such that simple sugars are released that are readily metabolizable via acidification or enzymatic methods.⁵¹ Certain microorganisms do not produce amylase or are not capable of using starch as the carbon source. Therefore, prior to the biotechnological process, the starch to be hydrolyzed to glucose must be present.⁵² Barbosa et al., (2005)⁴² used fructose (5, 10 and 15 g/L) as a carbon source to obtain a better development and growth of the *Ralstonia eutropha* ATCC 17697 native strain. To do this, different concentrations of fructose were employed in a fed batch bioreactor. When the microorganism depleted the sugar available, the researchers added the sugar equivalent to the initial concentration of the culture medium. For all concentrations tested, 7.5 g of dry biomass/l was obtained; in terms of the accumulation of P(3HB), the best results for the 5 and 15 g/L concentrations were 66 and 57 % respectively; and for 10 g/L, an accumulation of 44 % was reached. Patwardhan and Srivastava (2008)⁵³ conducted a P(3HB) production study using a *Wautersia eutropha strain* using too fructose as the carbon source and obtained a higher DCW of 14 g/L with a polymer yield of only 6 % than Barbosa et al., (2005)⁴² previously cited.

Using a *Halomonas* TD01 strain with glucose as the carbon source, Tan et al., (2011)⁵⁴ obtained a cell biomass of 40 g/L and a polymer yield of 60 %. Pradella and collaborators (2010)⁵⁵ used sucrose (700 g/L) in the production of P(3HB) by *Burkholderia sacchari* TPI 189 and obtained a dry cell biomass of 150 g/L and a polymer yield of 42 %. Borah et al., (2002)⁵⁶ evaluated three types of carbon sources, sucrose, glucose, and fructose, with *Bacillus mycoides* RLJ B-17 and obtained DCW yields of 3.6 g/L, 3.2 g /L, and 2 g/L, and polymer yields of 69.4 %, 56.6 %, and 55 %, respectively.

Nevertheless, different microorganism have different necessity and/or tolerance in relation to sugar concentration. Stockdale et al., (1968)⁵⁷ evaluated the production of P(3HB) by microorganisms from the Azotobacteriaceae family using 1 % glucose. They concluded that the strains with the best production were *A. beijerinckii* NCIB 9067 (70.4 %), *A. agilis* NCIB 8637 (43.3 %), and *A. chroococcum* NCIB 8002 (40.3 %). The same authors also used glucose at a concentration of 2 %, and the best results were obtained with *A. beijerinckii* NCIB 9067 (67.7 %), *A. vinelandii* NCIB 8789 (50.3 %), and *A. agili* NCIB 8637 (48.6 %).

The carbon source may be responsible for 25-45 % of the total production costs.⁵⁸ Thus, there is a need to identify lower-cost sources of carbon to decrease the cost of PHA production. The worldwide abundance of available biomass originating from renewable carbon can be used as raw material for production. Many of the waste and by-products of agricultural and dairy industries represent attractive candidates because they possess the main characteristics desired, such as low cost and high availability.⁵² A wide variety of substrates, such as molasses^{59,60} glycerol^{46,47,61}, whey⁵⁸, rice starch⁶², and vegetable oils,⁶³ have been used to produce PHA from various microorganisms.

Among the agricultural by-products mentioned, molasses have been widely used in various commercial fermentation processes because they contain vitamins and nutrients that help promote growth and microbial metabolism.⁶⁰ Kulprecha and coworkers (2009)⁶⁴ compared the same concentration of molasses (20 g/L) and sucrose as carbon sources for *Bacillus megaterium* BA-019. The dried biomass and yield of P(3HB) were significantly improved when molasses, instead of sucrose, was used as a carbon source, regardless of the nitrogen source. At 24h, values of 7.05 g/L and 55.46 % to DCW and P(3HB)

accumulation, respectively, against 2.83 g/L and 30.20 % when sugar was used in the same concentration. This result is of great significance because molasses represent a less expensive carbon source that can be readily assimilated. Kanjanachumpol et al., (2013)⁶⁵, on the other hand, evaluated the influence of different concentrations of sugar cane molasses (46 °Brix; 20, 40, 60 and 80 g/L) as a carbon source in a 10 L bioreactor with a initial sugar concentration of 60 g/L. The highest result was obtained for the DCW and P(3HB) accumulation, 32.5 and 8.8 g/L respectively, during just 12 hours of production, proving the effectiveness use of molasses sugar cane.

The effect observed in molasses may be caused by the presence of other nutrients in its composition. In addition to glucose, molasses contains fructose and sucrose, organic acids, minerals, and vitamins such as thiamine, riboflavin, and pyridoxine, which function as growth factors and, thereby, stimulate cell growth and the production of P(3HB).⁶⁴

Glycerol, which is an important agricultural by-product, is the main residue of biodiesel production, representing approximately 35 % of such production. Although pure glycerol is an important industrial raw material that has applications in the food, medicine, cosmetics, and tobacco industries, crude glycerol has a relatively low value due to the presence of impurities. For this by-product to be truly recycled, it must undergo several purification steps to remove impurities, and these expensive phases are often not economically viable for small- and medium-sized plants.⁶⁶ Biological conversions offer an opportunity for glycerol to be used in the synthesis of various products with different features. Glycerol may be used as a carbon source instead of sugars in many microbiological processes. PHA production is an attractive alternative for the biological processing of glycerol. Mothes et al., (2007)⁶⁷ obtained a polymer yield of 48 % and DCW of 50 g/L using glycerol at a concentration of 10 g/L in the production of P(3HB) with the microorganism *Cupriavidus necator* JMP 134 DSMZ 4058. Cavaleiro et al., (2009)⁶¹ explored two strategies for improving the production of PHAs: The use of high-density cultures and glycerol residues (GRP) as the primary carbon source for the growth of *Cupriavidus necator* DSM 545 and synthesis polymers. In this study, the authors evaluated the production of P(3HB) from commercial glycerol (PG), a substrate control, and GRP. Using PG, the accumulated P(3HB)

was 62 %, with a DCW yield of 82.5 g/L against 50 % P(3HB) and dried cell mass of 68.8 g/L using GRP.

Naranjo et al., (2013)⁴⁶ compared glucose and glycerol as carbon sources and too found a higher accumulation of P(3HB) in *Bacillus megaterium* when using glycerol (62 %); when using glucose, the accumulation was 59 % under the same growing conditions. Rodriguez-Contreras et al., (2015)⁴⁷ considered the same two carbon sources but switched the power to the bioreactor with glucose and glycerol, obtaining good results, with 65 % and 68 % of P(3HB) concentration and biomass respectively, for *Cupriavidus necator*, DSM 545. The carbon source used in the study for the production of P(3HB) from strain *Zobellella denitrificans* MW1 was glycerol, which resulted in a dry biomass of 81.2 g/L and a polymer accumulation of 66.9 %.⁶⁴ Bormann et al., (1998)⁶⁸ evaluated the production of the polymer using *Ralstonia eutropha* DSM 11348 with glycerol and casein hydrolysates and obtained DCW of 32 g/L and a polymer yield of 15.4 g/L (47 %).

In terms of starch and its derivatives, sources of carbon are available in large quantities in Brazil and are the main components of the biochemical oxygen demand of the textile industry wastewater, fermentation, and processing of food and beverages.⁶⁹ In the food industry, starch may be obtained from grains, such as rice, wheat, and corn, and from tubers such as potatoes and tapioca.⁷⁰ Rusendi and Sheppard (1995)⁷¹ used the residue that was generated from processing industry potatoes for P(3HB) production and, through enzymatic hydrolysis, obtained glucose as a carbon source. Dalcanton et al., (2010)⁶² considered the hydrolyzed rice starch cultivation with nutrients added to the mineral medium. Furthermore, they supplemented the medium with soybean oil. They concluded that the use of hydrolyzed rice starch was a viable alternative to the production of P(3HB). It is also worth noting that the hydrolyzed rice contained satisfactory concentrations of metabolizable carbon sources, comprising approximately 10 to 15 % proteins. When hydrolyzed, this served as a source of nitrogen and phosphorus to the microorganism, as well as providing a small percentage of lipids, fiber, and minerals (approximately 1 %). Supplementation with soy oil, even in small quantities, led to an increase in the production of P(3HB) (43 %) compared to media without supplementation (35 %). Hafuka et al., (2011)⁷² studied the production of P(3HB) from *Cupriavidus necator* H16 (ATCC17699) in continuous fermentation that used liquid food wastes as a

1 carbon source and obtained a polymer yield of 87 %. Pandian et al., (2010)⁷³,
2 also used alternative sources, such as a residue from dairy industrialization (150
3 - 550 mL/L), rice bran (20 - 60 g/L), and seawater (150 - 550 mL/L), to produce
4 the polymer using *Bacillus megaterium* SRKP-3, and obtained a yield as high as
5 11.32 g/L of DCW. Yezza et al., (2007)⁷⁴, produced P(3HB) from *Alcaligenes latus*
6 using maple sap and obtained 4.2 g of dry biomass/L and a 77 % polymer yield.

7 Quillaguaman and coworkers (2005)⁷⁵ compared the production of P(3HB)
8 in an orbital shaker incubator to that in a bioreactor using a *Halomonas boliviensis*
9 strain with a starch hydrolyzate that resulted from the action of bacterial
10 recombinant enzymes, They obtained a better yield of dry cell biomass (56 %) in
11 the shaker than they did in the bioreactor with the highest yield in the fermentor
12 being 35 %. Starch was also used to enhance cell growth with *Azotobacter*
13 *chroococcum* 23 in a shaker batch study by Kim and Chang (1998)⁷⁶ in which
14 they obtained 8.4 g/L of DCW and 3.7 g/L of P(3HB) with a polymer yield of 44
15 %. In the fermentor, they obtained 54 g/L of DCW and 25 g/L of P(3HB) with a
16 polymer yield of 46 %.

17 Ramadas and collaborators (2009)⁴⁴ evaluated various carbon sources
18 (wheat bran, potato starch, sesame oil cake, peanut oil cake, ground tapioca,
19 jackfruit seed powder and corn flour) in the cultivation of *Bacillus sphaericus*
20 5149. The culture medium containing wheat bran as a substrate was more
21 beneficial for cell growth, resulting in 15.5 g/L of biomass; however, for the
22 accumulation of P(3HB), the use of jackfruit seed powder and potato starch
23 resulted in a higher yield of 46 and 47 %, respectively.

24 Crop supplementation studies have found that the addition of oleic and
25 linoleic acids leads to an increase in the production of PHAs.⁷⁷ These fatty acids
26 are part of the composition of many vegetable oils, thus, making them a possible
27 low-cost alternative to supplementation crops. Grigull et al., (2008)⁴³ evaluated
28 various oleic acid concentrations (0 to 3.0 g/L) in the culture medium of minerals,
29 linking glucose and fructose as carbon sources for the *Ralstonia eutropha* strain
30 DSM 545. They concluded that oleic acid was consumed in the exponential phase
31 of growth and that the concentration of this food supplement resulted in an
32 increase in the bacterial growth rate. The yield obtained was 6.96 g/L of biomass
33 with supplementation of 3.0 g/L oleic acid, and a higher accumulation of P(3HB)
34 (16.7 %) was obtained at the same concentration. Ng et al., (2010)⁷⁸ used

jatropha oil from India (20 g/L + 10 g/L) as a carbon source for the production of polymer using *Cupriavidus necator* H16 and varied the nitrogen source [NH_4Cl , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 and $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$]. The best biomass results (8.2 g/L) with a 75.6 % polymer yield were obtained using $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, and a better polymer yield (87.9 %) with a biomass of 3.3 g/L was obtained using $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Sangkharak and coworkers (2007)⁷⁹ used acetate as the carbon source for three strains of *Rhodobacter sphaeroides*, and, with two of these mutants, they obtained a higher yield of polymer of 72.94 and 50.03 % compared to only 22.21 % using the natural strain. Kim et al., (1996)⁸⁰ supplemented the culture medium with methanol to produce bioplastics from *Methylobacterium organophilum* NCIB 11278. They obtained 185 g/L (52 %) in 57 h of production and 130 g/L (56 %) in 70 hours, highlighting the need to determine the optimum time to complete the process, and, thus, avoid self-degradation of the polymer.

Urea is the best source of nitrogen due to the superior assimilating capacity of *B. megaterium* BA-019 compared to other nitrogenous compounds. Urea is a small uncharged polar molecule; in contrast to ammonium sulfate, the urea uptake rate through the cell membrane is less pH-dependent and faster. Indeed, the use of this cheap source of nitrogen can reduce the cost of P(3HB) production because the bacterial strain employed can utilize it efficiently.⁷⁷ Kulprecha et al., (2009)⁶⁴ also assessed urea and ammonia and sulfate (0.8 g/L) as nitrogen sources for *Bacillus megaterium* BA-019. With respect to the nitrogen source, higher biomass yields (7.05 g/L) and P(3HB) (55.46 %) were obtained through the use of urea. They obtained high accumulations of polymer but at a reduced DCW content. The best results were obtained using casamino acids at 3.8 g/L (81.6 %).

Sometimes, however, unsatisfactory results are obtained. Koller et al., (2008)⁸¹ evaluated the production of PHA by *Pseudomonas hydrogenovora* DSM 1749 using a whey milk hydrolyzate (rich in glucose and galactose) as a carbon source and obtained a low DCW of 1.44 g/L, and 1.44 g/L of P(3HB) and 0.3 g/L of P(3HB-co-3-HV), corresponding to a total yield of 12 %.

The results obtained by the above-mentioned studies, in terms of the various carbon and nitrogen sources employed, are presented in Table 3.

Table 3. Dry cell mass yield and accumulation of P (3HB) obtained in cultures of different microorganisms, carbon and nitrogen sources.

Microorganisms	Source of C/N	DCW(g/L)	P(3HB) (%)	References
<i>Bacillus megaterium</i>	Glucose	7.1	59.1	46
	Glycerol	7.7	62.4	
<i>Bacillus megaterium</i> BA-019	Cane molasses (20 g/L)	10.9	2.9	64
	(40 g/L)	23.1	7.4	
	(60 g/L)	32.5	8.8	
	(80 g/L)	29.5	7.8	
<i>Bacillus megaterium</i> BA-019	Saccharose/ Ammonium sulfate	1.96	28.57	65
	Saccharose /Urea	2.83	30.2	
	Molasses / Ammonium sulfate	6.25	49.92	
	Molasses /Urea	7.05	55.46	
<i>Bacillus megaterium</i> SRKP-3	Dairy products (150- 550 mL/L)	11.32	NI*	73
	Rice bran (20- 60 g/L)			
	Sea water (150-550mL/L)			
<i>Bacillus mycoides</i> RLJ B-17	Saccharose	3.6	69.4	56
	Glucose	3.2	56.6	
	Fructose	2	55	
<i>Bacillus sphaericus</i> 5149	Cornflor	1.5	3.3	44
	Wheat bran	15.5	6.8	
	Cassava powder	2.5	6.4	
<i>Cupriavidus necator</i> JMP 134 DSMZ 4058	Glycerol	50	48	67
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Commercial glycerol	82.5	62	61
	Glycerol Residue	68.8	50	

<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Corn starch with soybean oil	11.64	43	58
	Corn starch without soybean oil	12.4	35	
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Glucose + Glycerol	68.5	64.5	47
<i>Burkholderia sacchari</i> DSM 17165		43.8	10.2	
<i>Cupriavidus necator</i> H16 (ATCC17699)	Liquid food waste	NI ^a	87	69
<i>Cupriavidus necator</i> JMP 134 (DSMZ 4058)	Glycerol (10g/L)	50	48	63
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Jatropha oil			78
	NH ₄ Cl			
	NH ₄ H ₂ PO ₄	3.3	87.9	
	NH ₄ NO ₃			
	(NH ₄) ₂ SO ₄			
	NaNO ₃			
	(NH ₂) ₂ CO	8.2	75.6	
<i>Ralstonia eutropha</i> DSM 545	Glucose + Fructose Oleic acid (0 g/L)	1.02	NI ^a	43
	Oleic acid (0.3 g/L)	1.02	NI ^a	
	Oleic acid (0.9 g/L)	2.10	NI ^a	
	Oleic acid (1.5 g/L)	2.64	NI ^a	
	Oleic Acid (3.0 g/L)	6.96	NI ^a	
<i>Rasltonia eutropha</i> ATCC 17697	Fructose (5 g/L)	7.5	66.2	42
	Fructose (10 g/L)	7.5	44.5	
	Fructose (15 g/L)	7.5	57.3	
<i>Ralstonia eutropha</i> DSM 11348	Glycerol and casein hydrolysates	32	47	68
<i>Zobellella denitrificans</i> MW1	Glycerol	81.2	66.9	64
<i>Alcaligenes latus</i>	Maple sap	4.2	77	74
<i>Halomonas boliviensis</i>	Starch hydrolysates	NI ^a	56	75
			35	
<i>Halomonas</i> TD01	Glucose	14	60	54
<i>Azotobacter chroococcum</i> 23	Starch	8.4	44	76
<i>Burkholderia sacchari</i> IPT 189	Sucrose (700g/L)	150	42	55

<i>Azotobacteriaceae</i>	Glucose 1 %	NI ^a	70.4	57	
			43.3		
			40.3		
	Glucose 2%		67.7		
			50.3		
			48.6		
<i>Wautersia eutropha</i>	Fructose	14	6	53	
<i>Halomonas</i> TD01	Glucose	40	60	78	
<i>Pseudomonas hydrogenovora</i> DSM 1749	Hydrolyzed wey	1.44	12	81	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Acetate	NI ^a	72.94	79	
			50.03		
			22.21		
<i>Methylobacterium organophilum</i> NCIB 11278	Methanol	185	52	80	
		130	56		

^aNot included

Growing Conditions: Time, Temperature, pH, and Oxygen

In general, the optimization of fermentation conditions has proven to substantially improve the yield and productivity of many biological processes.⁸⁴ Because the synthesis of P(3HB) is known to be influenced by environmental stresses, such as essential nutrients like nitrogen, phosphate or oxygen,⁷ fermentation optimization has been widely used. In addition, factors that influence the process by which a substrate is converted into a product, such as time, temperature, and pH, have also been optimized.

The main difference between the fermentative processes in a shaker and a bioreactor is that the oxygen supply and the agitation speed of a shaker cannot be used to control the supply or that the oxygen dissolved rate and agitation speeds are lower (OD). Most microbial industrial processes are aerobic and are conducted mainly in media that contain salts and organic substances. In these processes, oxygen is an important nutrient that affects process performance because the microorganisms use it in the growth, maintenance, and production of metabolites. As such, a lack of oxygen affects process performance.⁸²⁻⁸⁴ Therefore, it is important to ensure there is an adequate supply of oxygen from the gas stream into the culture medium. Accordingly, the oxygen transfer rate (OTR) varies according to the operating conditions and plays an important role in predicting the metabolic pathway for the growth and production of any metabolite in the culture. Thus, when the OD supply is so low that it is limited and induced stress is required, for example, in *Bacillus megaterium*, which is strictly aerobic, fermentation is required in the bioreactor to achieve higher P(3HB) production levels by controlling the low OD levels.⁸⁵

Kulpreecha et al., (2009)⁶⁴ evaluated the effect of different values of pH (6.0, 7.0, and 8.0) and dissolved oxygen concentration (DO) (40, 60, and 80 % saturation) in the culture medium on the fermentation of the *Bacillus megaterium* BA-019 batch. For the biomass yield, the best result (9.7 g/L) was obtained in fermentation without pH control and with a saturated DO level of 60 %; however, the results were not significantly different from those obtained via a combination of pH 8.0 and 80 % saturation (9.5 g/L). In contrast to the yield of P(3HB) that accumulated in the cell, a combination of pH 7.0 and 60 % saturation resulted in the accumulation of 61.6 % the DCW. This may be because pH 7.0 is the optimum

value for the key enzymes in the biosynthetic pathway of P(3HB) for that microorganism. Therefore, in the presence of a pH that is higher or lower than the ideal value, the enzymatic activity decreases. It was reported that pH changes can reduce the performance of the culture and that the initial pH can affect the availability of the trace elements in culture medium that are required for bacterial growth.⁸⁶

Borah et al., (2002)⁵⁴ used the three types of sources that were described in Section 6.2 in *Bacillus mycoides* RLJ B-17 cultures for production in a fermenter using a 20 % inoculum, 30 °C at 650 rpm, and 1 vvm for 24 hours, with pH fixed at 7; they obtained polymer yields of 69.4 %, 56.6 %, and 55 %. Ramadas and collaborators (2009)⁴⁴ studied different agro-industrial waste as a source of carbon for the cultivation of the *Bacillus sphaericus* strain 5149 but they tested different pH values (5.0 to 8.0). They found that an initial pH change in the cultivation medium had a strong influence on the production of P(3HB). Even a small difference in pH from the ideal point caused a sharp reduction in the accumulation. In this work, the medium with an initial pH of 7.5 resulted in the maximum yield of P(3HB) of 25 %. The drastic change in production appeared to be due to the effect of the initial pH on the bioavailability of trace elements. Pandian and colleagues (2010)⁷³ used the nutritional sources, described in Section 6.2 to *Bacillus megaterium* SRKP-3 at pH 9 and 30 °C with an agitation of 300 rpm and aeration of 100 % at the beginning of the process in the fermenter. They obtained 11.32 g/L of dry cellular biomass when pH is related to the production of P(3HB) by genera *Bacillus*, it is possible to note that different pH values were used result in different polymer accumulation.

Ibrahim and Steinbüchel (2009)⁸⁷ used glycerol to produce P(3HB) by *Zobellella denitrificans* MW1 at pH 7.3 and 37 °C for 24 h with high aeration and stirring (1.67 vvm and 800 rpm) in the fermenter. They obtained 81.2 ± 2.5 g/L of DCW and a polymer concentration of $66.9\% \pm 7.6\%$. Bormann et al., (1998)⁶⁸, as described in Section 6.2, performed fermentation using *Ralstonia eutropha* DSM 11348 at pH 6.8 - 7.0 and 30 °C and with high agitation (800-1000 rpm) for 48 and 92 h after inoculating the fermenter and following the OD at 420 nm. They obtained 32 g/L of DCW and a polymer yield of 15.4 g /L (47 %).

In terms of the OD, at a saturation level of 40 %, the productivity decreased dramatically due to the insufficient amount of oxygen available in the culture

1 medium to meet the aerobic anabolic requirements. However, higher OD levels
2 (80 %) significantly reduced bacterial growth, probably due to the oxidative stress
3 and shear that resulted from the high stirring speed.⁶¹ Therefore, it would be
4 interesting to maintain a constant stirring rate and adjust the oxygen levels via
5 the addition of pure oxygen-enriched air to prevent stress in the bacterial cell.

6 Faccin et al., (2013)⁴⁵ evaluated oxygen transfer while subjecting the
7 *Bacillus megaterium* DSM 32 culture to different agitation levels (100, 200, 300,
8 400, 500, and 600 rpm). The highest yield of P(3HB), 62 %, was obtained by
9 shaking at 200 rpm to generate an oxygen transfer coefficient (kLa) of 0.006 s⁻¹.
10 The (kL) is an important parameter because it is related to the oxygen transfer
11 rate (OTR) and is commonly used when an increase in the production scale is
12 desired.⁸⁸

13 Martínez et al., (2004)⁴¹ evaluated the effect of pH (6.0, 6.8, and 7.4),
14 agitation (300 and 700 rpm) and aeration (0.25 and 1 vvm) on the microorganism
15 *Azospirillum brasilense* 7 strain, using tomato extract as a carbon source. A
16 maximum biomass yield of 1.67 g/L and a maximum yield of P(3HB) of 0.16 g/L
17 at pH 6.8 were obtained. With the utilization of parameters, such as an agitation
18 of 500 rpm and an aeration value of 0.5 vvm, the best combination yielded a
19 biomass of 1.2 g/L; however, for an increased yield of P(3HB) (4.9 g/L), the
20 culture was maintained at a greater agitation (700 rpm) and lower aeration (0.25
21 vvm).

22 Dalcanton et al., (2010)⁶² evaluated the effect of different temperatures
23 (30, 35, and 40 °C) on the growing culture of *Cupriavidus necator* DSM 545.
24 Holding the growth temperature at 35 °C was advantageous to growth (12.4 g/L)
25 and P(3HB) production (43 %) compared to those performed at the temperatures
26 of 30 °C and 40 °C, the former of which is currently used in the production
27 process. Both the enzymes present in this organism and others show the
28 maximum activity when factors such as temperature are close to optimal, which
29 may lead to an increased specific growth rate and, hence, favorable changes in
30 the conversion factor of the substrate product. This increased cultivation
31 temperature may still have a significant influence on the productivity of the
32 process due to the reduction in cultivation time. However, according to Schimdell
33 et al., (2001)⁸⁸, very high growth temperatures decrease the concentration of
34 oxygen dissolved in the medium, which is an important factor when the P(3HB)

production process is aerobic. In this context, studying the influence of culture temperature on the production of P(3HB) is extremely important because the temperature increase still implies a reduced need for cooling during the process.

Crochemore et al., (2012)³² indicated that the accumulation of lipophilic inclusions is dependent on the cultivation time for the studied microorganism, *Pseudomonas* strain CMM43. The cultivation was performed in flasks incubated on a shaker at 28 °C, at a speed of 150 rpm, over a period of 24, 48, and 72 h. The greatest accumulation of P(3HB) was observed at 48 h (29 %), with a cell mass yield of 5.8 g/L, while the lower accumulation was observed at 24 h of culture. This latter finding was expected because the production process and accumulation of P(3HB) are usually slow processes.⁸⁹ At 72 h of cultivation, the accumulation of the polymer decreased by approximately 4 % compared to that obtained after 48 h; it was also found that the sugar consumption continued after 48 h of culture, which indicated that the bacteria used the polymer as a source of carbon.

Ng et al., (2010)⁷⁸, used the conditions specified in Section 6.2 for the growth of *Cupriavidus necator* H16 at pH 7, 30 °C, 200 rpm and for 6 to 120 hours obtained an amount of biomass that ranged from 3.3 g/L to 8.2 g/L and a polymer yield of 2.9 to 6.5 g/L. Studying the production of P(3HB) using liquid food waste as a nutritional source for *Cupriavidus necator* H16 (ATCC17699) and using two fermentation regimes for 259 h, Hafuka et al., (2011)⁷² obtained a high polymer yield, of 87 %, and a productivity of 5 mg.L⁻¹.h⁻¹ in continuous fermentation. During the production of P(3HB) from *Alcaligenes latus* using maple sap with a 5 % inoculum, pH 7.9 and an aeration of 30 % in the fermenter for 33 h, Yezza et al., (2007)⁷⁴ obtained a low DCW of 4.2 g/L, but a good yield of 77 %.

Quillaguaman et al., (2005)⁷⁵ used the *Halomonas boliviensis* strain in combination with the conditions described in Section 6.2 to study the production of the polymer in 1 L shaker flasks with the pH adjusted to 8.5 at the beginning, with an aeration of 310 mL, and shaking at 160 rpm. They obtained a DCW of 56 %. In a fermenter at pH 8, with an aeration of 0.53 vvm, and an agitation rate of 700 rpm, the percentage obtained was lower, 35 %, probably due to high agitation. At the same time, Tan et al., (2011)⁵⁴ using *Halomonas* TD01, with glucose as the carbon source in a shaker flask under the following conditions: pH

9, 200 rpm, at 37 °C for 48 h, they obtained 40 g/L of DCW and a polymer yield of 60 %. These values are higher than the Quillaguaman et al., (2005)⁷⁵

Using starch to promote the growth of *Azotobacter chroococcum* 23, Kim and Chang (1998)⁷⁶ used shakers in batch mode at a pH of 7.2 in the beginning, at 30 °C with stirring at 300 rpm for 0 – 40 h, and 1 vvm for 12 hours, and obtained 8.4 g/L of DCW, 3.7 g/L of P(3HB), and a polymer yield of 44 %. In a fed-batch fermenter with a stirring rate of 1000 rpm and O₂ limitation for 37 h at 70 h obtained 54 g/L of DCW, 25 g/L of P(3HB) and a polymer yield of 46 % was achieved.

Patwardhana and Srivastava (2008)⁵³ performed a P(3HB) production study in fermenters using the *Wautersia eutropha* strain in combination with fructose as the carbon source at a controlled pH for 60 h with 30 % aeration and obtained 14 g/L of DCW but a very low polymer yield of 6 %. Koller et al., (2008)⁸¹ evaluated the production of PHA by *Pseudomonas hydrogenovora* DSM 1749 with glucose/galactose whey from hydrolyzed milk as a carbon source in the inoculum stage at pH 6.8 to 7 at 30 °C for 48 h, and in the production phase at pH 7 and 30 °C for 48 h and obtained a very low DCW of 1.44 g/L and 1.14 g/L of P(3HB) with a total yield of 12 %.

Using acetate as the carbon source, Sangkharak et al., (2007)⁷⁹ as described in Section 6.2, used three strains of *Rhodobacter sphaeroides*, of which two of them were mutants, for the fermenter production of P(3HB) at pH 7, an agitation rate of 150 rpm for 60 h, which resulted in a polymer yield of 21 % for the natural strain 22, and of 72.94 and 50.03 % for the mutant strains.

Kim et al., (1996)⁷⁶, using the conditions described above (6.2) with *Methylobacterium organophilum* NCIB 11278, and at pH 7, 1400 rpm at 30 °C for both the inoculum phase and for production obtained 185 g/L (52 %) in 57 h of production, and 130 g/L (56 %) in 70 h.

The results obtained in this work and others not mentioned, including the operating conditions, are shown in Table 4.

Table 4. Dry Cell Mass yield (DCW) and accumulation of P(3HB) obtained in cultures of different microorganisms under different conditions in a shaker and a bioreactor.

Microorganisms	Equipment	pH	T (°C)	Rotation (rpm)	Time (h)	Aeration	DCW (g/L)	P(3HB) (%)	References
<i>Azospirillum brasilense</i> cepa 7	Shaker	6	32	70	36	NC ^a	1.42	7.7	41
		6.8					1.67	9.6	
		7.4					1.62	7.4	
<i>Azospirillum brasilense</i> cepa 7	Bioreactor	6.8	32	300	24	0.25 vvm	1.95	1.5	41
				300		0.75 vvm	3.58	2.8	
				500		0.5 vvm	1.95	61.5	
				700		0.25 vvm	4.9	9.2	
				700		0.75 vvm	3.9	1	
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Shaker	7	30	150	24	NC ^a	7.8	39	62
			35				11.64	43	
			40				NC ^a	NC ^a	
<i>Cupriavidus necator</i> H16 (ATCC17699)	Biorreactor	NC ^a	NC*	NC*	259	NC ^a	NC ^a	87	72
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Shaker	7	30	200	6-120	NC ^a	3.3- 8.2	2.9 - 6,5g/L	78
<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32	Bioreactor	NC ^a	7	100	30	0.8 vmm	NC ^a	49	45
				200				62	
				300				49	
				400				40	
				500				39	
				600				39	
<i>Bacillus megaterium</i> BA-019 ⁺	Bioreactor	WC ^b	NC*	NC*	12	60 %	9.8	24.4	64
		6			12	60 %	7.9	52.5	

		7			12	60 %	8.8	61.6	
		7			12	80 %	8.3	58.0	
		7			24	40 %	6.4	47.0	
		8			18	60 %	9.5	28.9	
<i>Bacillus megaterium</i> SRKP-3	Biorreactor	9	30	300	NC ^a	100 %	11.32	NC ^a	73
<i>Bacillus sphaericus</i> 5149	Shaker	7.5	30	200	36	NC ^a	NC ^a	25	44
<i>Bacillus mycoides</i> RLJ B-17	Biorreactor	7	30	650	24	1 vvm	NC ^a	69.4	44
								56.6	
								55	
<i>Pseudomonas</i> CMM43	Shaker	NC ^a	28	150	24	NC ^a	2.14	9	32
					48		5.8	29	
					72		6.3	25	
<i>Pseudomonas hydrogenovora</i> DSM 1749	Biorreactor	7	30	NC ^a	48	NC ^a	1.44; 1.14	12	81
<i>Zobellella denitrificans</i> MW1	Biorreactor	7.3	37	800	24	1.67 vvm	81.2	66.9	87
<i>Ralstonia eutropha</i> DSM 11348	Biorreactor	6.8 – 7.0	30	800-1000	NC ^a	NC ^a	32	15.4	68
<i>Alcaligenes latus</i>	Biorreactor	7.9	NC ^a	NC ^a	33	NC ^a	4.2	77	74
<i>Halomonas boliviensis</i>	Shaker	8.5	NC ^a	160	NC ^a	310 mL	56 %	NC ^a	75
	Biorreactor	8	NC ^a	700	NC ^a	0.53 vvm	35 %	NC ^a	
<i>Azotobacter chroococcum</i> 23	Shaker	7.2	30	300	0- 40	1 vvm	8.4; 3.7	44	53
	Biorreactor	NC ^a	NC ^a	1000	70	Limitation on 37 h	54; 25	46	
<i>Wautersia eutropha</i>	Biorreactor	C ^c	NC ^a	NC ^a	60	30 vvm	14	5	77
<i>Halomonas</i> TD01	Shaker	9	37	200	48	NC ^a	40	60	54
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Biorreactor	7	NC ^a	150	60	NC ^a	NC ^a	22.21	79
								72.94	
								50.03	

<i>Methylobacterium organophilum</i> NCIB 11278	Biorreactor	7	30	1400	57	NC ^a	185	52	76
---	-------------	---	----	------	----	-----------------	-----	----	----

^aNot controled; ^bWithout Control; ^cControl

Conclusions

P(3HB) is a lipophilic bacterial polymer whose applicability puts it in a prominent position among other biodegradable polymers from sustainable sources. Factors that should be considered to obtain a higher accumulation and polymer yield, together with improving its quality, are dependent on the producing microorganism. For economically viable production, the adequacy of the means and process operating parameters, including the use of waste, is crucial. Although Brazil is one of the largest producers of sugar cane and biodiesel and thus generates a large volume of molasses and glycerol, which are excellent sources of carbon in alternative culture media, there is currently no P(3HB) production in the country. In this review, we observed extremely variable polymeric yields; unfortunately, some authors have reported high biomass concentrations associated with low yields of P(3HB). This may be related to the low accumulation of polymer bead consumption by the organism due to unfavorable operating parameters or an inefficient extraction method.

References

1. Rocks JK. Unusual rheological properties and heat, acid, and salt stabilities make glucose-derived hydrocolloid a versatile food additive. *Food Tech*, 1971; (25): 476-484.
2. Carradini E, Marconcini JM, Agnelli JAM, Mattoso LHC. Thermoplastic blends of corn gluten meal/ starch (CGM/ Starch) and corn gluten meal/ polyvinyl alcohol and corn gluten meal/ poly (hydroxybutyrate- co- hydroxyvalerate) (CGM/PHB-V). *Carbohydr Polym*, 2011; 2 (83): 959-965.
3. Reddy CSK, Ghai R, Rashmi T, Kalia VC. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour Technol* 2003; 2 (87): 137-146.
4. Averous L, Boquillon N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviour. *Carbohydr Polym* 2004; 2 (56): 111-122.
5. Graebbling D, Muller R, Palierne JF. Linear viscoelasticity of incompatible polymer blends in the melt relation with interfacial properties. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1993; 7 (3), 15-25.
6. Paoli M A de. *Degradação e Estabilização de Polímeros*, 2ª versão online. Chemkeys. Editado por João Carlos de Andrade, 2005.

7. Braunegg G, Lefebvre G, Genser KF. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *J Biotechnol* 1998; 2-3 (65): 127-161.
8. Nonato RV, Mantelato PE, Rossell CEV. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. *Appl of Microbiol Biotechnol* 2001; 1 (57): 1-5.
9. Madison LL, Huisman GW. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Molec Biol Rev* 1999; 1 (63): 21-53.
10. Byrom D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economies. *Trends Biotechnol* 1987; 9 (5): 246-250.
11. Holmes PA. Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Phys Technol* 1985; 1 (16): 32-36.
12. Anderson, AJ, Dawes, EA. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev* 1990; 4 (54): 450-472.
13. Doi YM, Kitamura S, Abe H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyhexanoate). *Macromol* 1995; 14 (28): 4822-4828.
14. Steinbüchel A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: *Biomaterials from biological sources*. MacMillan Publishers Ltd. Basingstoke. United Kingdom, 1991: 123-213.
15. Lee SY. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol Bioeng* 1996a; 1 (49): 1-14.
16. Lee SY. Plastic bacteria?: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnol* 1996b; 11 (14): 431-438.
17. Lee SY. Poly(3-hydroxybutyrate) extrusion by cells of recombinant *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol* 1996c; 2 (6): 147-149.
18. Steinbüchel A, Fächtenbusch B. Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnol* 1998; 10 (16): 419-427.
19. Jendrossek D, Schirmer A, Schlegel HG. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *App Microbiol Biotchenol* 1996; 5 (46): 451-463.

20. Merrick JM, Steger R, Dombroski D. Hydrolysis of native poly(polyhydroxybutyrate) granules (PHB), crystalline PHB and artificial amorphous PHB granules by intracellular and extracellular depolymerases. *International J Biol Macromol* 1999; 1-3 (25): 129-134.
21. Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci* 2000; 10 (25): 207-215.
22. Amass L, Bickel WK, Crean JP, et al. Alternate-day buprenorphine dosing is preferred to daily dosing by opioid-dependent humans. *Psychopharmacology* 1998; (136): 217-225.
23. Khanna S, Srivastava AK. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem* 2005; 2 (40): 607-619.
24. Tsuge T. Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. *J Biosci Bioeng* 2002; 6 (94): 579-584.
25. Dawes EA, Senior, PJ. The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in micro-organisms. *Adv Microbiol Physiol* 1973; (10):135-266.
26. Gomez, JGC, Fontolan, V, Alli, RCP, et al. (1997). Production of P3HB-co-3HV by soil isolated bacteria able to use sucrose. *Rev. Microbiol* 1997; 1 (28): 43-48.
27. Bloembergen S, Holden, DA, Bluhm, TL, et al. Stereoregularity in synthetic β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate homopolyesters. *Macromolecules* 1989; 4 (22): 1656-1663.
28. Shen L, Haufe J, Patel MK. Product overview and Market projection of emerging bio-based plastics. *PRO-BIT 2009*. Copernicus Institute for Sustainable Development and Innovation Utrecht University 2009.
29. Asrar J, Hill JC. Biosynthetic processes for linear polymers. *J App Polym Sci* 2002; 3 (83): 457-483.
30. Noda I, Satkowski MM, Dowrey, AE, Marcott C. Polymer Alloys of Nodax Copolymers and Poly(lactic acid). *Macromol Biosci* 2004; 3 (4): 269-275.
31. Ojumu TV, Yu, J, Solomon, BO. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *Afr J Biotechnol* 2004; 1 (3): 18-24.

32. Crochemore AG, Mattos, MLT, Vendruscolo, CT, et al. Identification of pesticide-degrading *Pseudomonas* strains as poly- β -hydroxybutyrate producers. *Afr J Biotechnol* 2012; 85 (11): 15144-15149.
33. Chen GQ. Production and Application of Microbial Polyhydroxyalkanoates. In: Chiellini E, Solaro R. Biodegradable Polymers and Plastics. London: Springer. 2003: 155-166.
34. Vandamme P, Holmes PA. Biologically produced (R)-3-hydroxyalkanoate polymers and copolymers. In: *Developments in Crystalline Polymers-2* (edited by D. C. Bassett): Elsevier Applied Science Publishers LTD. 1998.
35. Holmes P A. *Biologically produced (R)-3-hydroxyalkanoate polymers and copolymers*. In: *Developments in Crystalline Polymers-2* (edited by D. C. Bassett): Elsevier Applied Science Publishers LTD 1998.
36. Steinbüchel A, Valentin HE. (1995). Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 3 (128): 219-228.
37. Lee SY, Choi J, Wong HH. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: *minireview*. *Int J Biol Macromol* 1999; 1-3 (25): 31-36.
38. Babel W, Ackermann JU, Breuer U, Steinbüchel A. Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB) Biopolyesters. *Adv Biochem Eng/ Biotechnol* 2001; (71): 125-157.
39. Tyo KEJ, Fischer CR, Simeon F, Stephanopoulos G. Analysis of polyhydroxybutyrate flux limitations by systematic genetic and metabolic perturbations. *Metab Eng* 2010; 3 (12):187-195.
40. Yamane T, Chen XF, Ueda S. Growth associated production of poly(3-hydroxyvalerate) from n-pentanol by a *methylophilic bacterium*, *Paracoccus denitrificans*. *App Environ Microbiol* 1996; 2 (62): 380-384.
41. Martínez J, Rodríguez M, Fernández AI, et al. Producción de polihidroxialcanoatos em bacterias diazotrofas. I. Influencia de la aeración em la síntesis de poli B hidroxibutirato em *Azospirillum brasilense* Cepa 7. *R Biol* 2004; (18): 87-95.
42. Barbosa M, Espinosa HA, Malagón RD, Moreno SN. Producción de Poli-b-hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC17697. *Univ Sci* 2005; 1 (10): 45-54.

43. Grigull VH, Silva DD, Garcia MCF, et al. (2008). Production of Poly(3-hydroxybutyrate) from oleic acid by *Ralstonia eutropha*. *Food Technol Biotechnol* 2008; (46): 223-228.
44. Ramadas NH, Singh SK, Soccol CR, Pandey A. Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. *Brazilian Arch Biol Technol* 2009; 1 (52): 17-23.
45. Faccin D JL, Rech R, Secchi AR, et al. Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. *Process Biochem* 2013; 3 (48): 420-425.
46. Naranjo JM, Posada JA, Higueta JC, Cardona CA. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. *Bioresour Technol* 2013; (133): 38-44.
47. Rodríguez-Contreras A., Koller M., Dias MMS., et al. Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*. *Biochem Eng J* 2015; (94): 50-57.
48. Sun Z., Ramsey JA., Guay M., Ramsey BA. (2006). Automated feeding strategies for high-cell-density fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440. *App Microbiol Biotechnol* 2006; 4 (71): 423-431.
49. Yamane T, Shimizu S. Fed-batch techniques in microbial processes. *Advances in Biochem Eng Biotechnol* 1984; (30): 147-194.
50. Sun Z, Ramsay JA, Guay M, Ramsay BA. Carbon limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by *Pseudomonas putida* KT2440. *App Microbiol Biotechnol* 2007; 1 (74): 69–77.
51. Van-Thuoc D, Quillaguaman J, Mamo G, Mattiasson B. Utilization of agriculture residues for poly (3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. *J Appl Microbiol* 2007; 2 (104): 420-428.
52. Kim, BS. (2000). Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme Microb Technol* 2000; 10 (27): 774-777.
53. Patwardhana P, Srivastana, AK. Fed-batch cultivation of *Waustersia eutropha*. *Bioresour Technol* 2008; 6 (99): 1787-1792
54. Tan D, Xue Y S, Aibaidula G, Chen GQ. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresour Technol* 2011; 17 (102): 8130-8136

55. Pradella JG da C, Taciro MK, Mateus AYP. High- cell- density poly (3-hydroxybutyrate) production from sucrose using *Burkholderia sacchari* culture in airlift bioreactor. *Bioresour Technol* 2010; 21 (101): 8355-8360.
56. Borah B, Thakur PS, Nigam JN. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. *J App Microbiol* 2002; 4 (92): 776–783.
57. Stockdale H, Ribbons DW, Dawes EA. Occurrence of poly- beta-polyhydroxybutyrate in the Azotobacteriaceae. *J Bacteriol* 1968; 5 (95): 1798-1803.
58. Nath A, Dixit M, Bandiya A, Chavda S, Desai AJ. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. *Bioresour Technol* 2008; 13 (99): 5749-5755.
59. Silva L F, Taciro MK, Michelin ME, et al. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *J Ind Microbiol and Biotechnol* 2004; 6 (31): 245–254.
60. Bengtsson S, Pisco AR, Reis MAM, Lemos PC. Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugarcane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms. *J Biotechnol* 2010; 3 (145): 253-263.
61. Cavaleiro JMBT, de Almeida MCMD, Grandfils C, de Fonseca MMR. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochem* 2009; 5 (44): 509-515.
62. Dalcanton F, Ienczak JL, Fiorese ML, Aragão GMF. Produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* em meio hidrolisado de amido de arroz com suplementação de óleo de soja em diferentes temperaturas. *Quím Nova* 2010; 3 (33); 552-556.
63. Lee WH, Loo CY, Nomura CT, Sudesh K. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. *Bioresour Technol* 2008; 15 (99): 6844–6851.
64. Kulprecha S, Boonruangthavorn A, Meksiriporn B, Thongchul N. (2009). Inexpensive fed-batch cultivation for high for poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *J Biosci Bioeng* 2009; 3 (107): 240-245.

65. Kanjanachumpol P, Kulpreecha S, Tolieng V, Thongchul N. Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. *Bioprocess Biosyst Eng* 2013; 10 (36): 1463-1474.
66. Yazdanie SS, Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr Opin Biotechnol* 2007; 3 (18): 213-219.
67. Mothes C, Schnorpfeil, C, Ackermann JU. Production of P3HB from crude glycerol. *Eng Life Sci* 2007; (7): 475-479.
68. Bormann EJ, Leibner M, Beer B. Growth-associated production of polyhydroxybutyric acid by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrate. *App Microbiol Biotechnol* 1998; 1 (49): 84-88.
69. Yu J. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *J Biotechnol* 2001; 2 (86): 105.
70. E, Higasa T, Adachi M, Mikami B. Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. *Process Biochem* 2000; 7 (35): 711-715.
71. Sarikava Rusendi D, Sheppard JD. Hydrolysis of potato processing waste for the production of poly- β -hydroxybutyrate. *Bioresour Technol* 1995; 2 (54): 191.
72. Hafuka A, Sakaida K, Satoh H, et al. Effect of feeding regimes on polyhydroxybutyrate production from food wastes by *Cupriavidus necator*. *Bioresour Technol* 2001; 3 (102): 3551-3553.
73. Pandian SR, Deepak V, Kalishwaralal K, et al. (2010). Optimization and fed-batch production of P3HB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. *Bioresour Technol* 2010; 2 (101): 705-711.
74. Yezza A, Halasz A, Levadoux W, Hawari J. Production of poly- beta-hydroxybutyrate (P3HB) by *Alcaligenes latus* from maple sap. *App Microbiol Biotechnol* 2007; 2 (77): 269-274.
75. Quillaguaman J, Hashim S, Bento F, et al. (2005). Poly(beta-hydroxybutyrate) production by *Halomonas bolivienses* LC1 in batch culture with sucrose as carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 5 (74): 981-986.
76. Kim BS, Chang HN. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*. *Biotechnol Lett* 1998; 2 (20): 109-112.

77. Squio CR, Aragão, GMF de (2004). Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-Hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bactérias. *Quím Nova* 2004; 4 (27): 615-622
78. Ng KS, Ooi WY, Goh LK, et al. Evaluation of jatropha oil to produce poly(3-hydroxybutyrate) single crystal revealed by use of mutant of polyhydroxybutyrate depolymerase. *Biomacromolecules* 2010; (3): 312-317.
79. Sangkharak K, Prasertsan, P (2007). Optimization of polyhydroxybutyrate production from a wild type and two mutant strains of *Rhodobacter sphaeroides* using statistical method. *J Biotechnol* 2007; 3 (132): 331-340.
80. Kim S W, Kim P, Lee HS, Kim JH. High production of poly- beta-hydroxybutyrate (P3HB) from *Methylobacterium organophilum* under potassium limitation. *Biotechnol Lett* 1996; 1 (18): 25-30.
81. Koller M, Bona R, Chiellini E, et al. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. *Bioresour Technol* 2008; 11 (99): 4854-1046.
82. Garcia-Ochoa F, Gomez E, Santos V E. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. *Enzyme Microb Technol* 2000; 9 (27): 680-90.
83. Calik P, Yilgör P, Ayhan P, Demir AS. Oxygen transfer effects on recombinant benzaldehyde lyase production. *Chem Eng Sci* 2004; 22-23 (59): 5075-5083.
84. Garcia-Ochoa F, Gomez E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnol Adv* 2009; 2 (27):153–176
85. Full TD, Jung DO, Madigan MT. Production of poly-hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. *Letters App Microbiol* 2006; (43): 377-384.
86. Grothe E, Moo-Young M, Chisti Y. Fermentation optimization for the production of poly(b-hydroxybutyrate acid) microbial thermoplastic. *Enzyme Microb Technol* 1999; (25): 132-141.
87. Ibrahim MHA, Steinbüchel A. Poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high- cell- density fed- batch , fermentation and simplified solvent extraction. *App Environ Microbiol* 2009; 19 (75): 6222-6231.

- 88.** Schimdell W, Lima UA, Aquarone E. Borzani W. *Em Biotecnologia Industrial*; Edgard Blücher, v. 1, cap. 6, São Paulo, 2001.
- 89.** Jiang Y, Song X, Gong L, et al. (2008). High poly(β - hydroxybutyrate) production by *Pseudomonas fluorescens* A2a5 from inexpensive substrates. *Enzyme Microb Technol* 2008; 2 (42): 167-17.

Capítulo 2- Artigo 2:

Optimization of *Ralstonia solanacearum* cell growth using a central composite rotational design for the P(3HB) production: effect of agitation and aeration

Artigo publicado no periódico- *PlosOne*

DOI: 10.1371/journal.pone.0211211

Qualis 2013-2016 em Ciência dos Alimentos: A1

Fator de impacto: 2.766

INSS: 1932-6203

Optimization of *Ralstonia solanacearum* cell growth using a central composite rotational design for the P(3HB) production: effect of agitation and aeration

Mariane Igansi Alves¹, Karine Laste Macagnan², Camila Rios Piecha², Matheus Marques Torres², Izadora Almeida Perez³, Sônia Maria Kesserlingh⁴, Rosane da Silva Rodrigues³, Patrícia Diaz de Oliveira^{1,3}, Angelita da Silveira Moreira^{1,2,3*}

¹ Department of Food Science and Technology, Eliseu Maciel Faculty of Agronomy, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil;

² Technological Development Center, Biotechnology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil;

³ Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Science, University Federal of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil;

⁴ Company PHB Industrial, 141500-000, Serrana – SP, Brazil.

*Corresponding author:

e-mail: angelitadasilveiramoreira@gmail.com (ASM)

Tel: +(055) 0145332757585

Abstract

The intracellular accumulation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) normally occurs after cell growth, during the second fermentation stage and under nutrient-limited conditions in the presence of a carbon excess. However, some microorganisms are able to accumulate PHAs as poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] during the first fermentation stage, the cell growth phase, without nutrient limitation, once they have been reported to utilize type II metabolism during the polymer accumulation phase. This study evaluated the effect of aeration and agitation on cell growth and P(3HB) accumulation in *Ralstonia solanacearum* RS, performed in a bioreactor for 24h at 32°C. A 2² central composite rotational design (CCRD) was used, with agitation (150 to 250 rpm) and aeration (0.3 to 1 vvm) as independent variables and optical density (OD_{600nm}), dry cell weight (DCW), and P(3HB) yield as dependent variables. A significant polymer accumulation, until 70% of P(3HB), was observed, proving that *R. solanacearum* RS exhibited metabolism type II, regardless of the aeration process. The best results were obtained for 1 vvm and 250 rpm (+1, +1), with values of OD_{600nm} (18.04) and DCW (4.82 g.L⁻¹).

Keywords: Bioprocess; Biopolymer; Poly(3-hydroxybutyrate); Polyhydroxyalkanoates; Bioreactor

Introduction

In the last six decades, 8.3 billion metric tons of plastics have been produced, most of which disposable single-use plastics [1]. It is estimated that 91% of all plastics produced is not recycled, and 6.3 billion metric tons has become plastic waste [1,2]. For years, scientists have been investigated ways to reduce these numbers to prevent the volume of plastics that end up in the world's oceans, causing damage to marine mammals, birds, and fish, among others. By the middle of the century, there will be more plastics in the oceans than fish — a chilling prognosis [2]. In this context, the use biodegradable polymers may be an effective alternative to reduce the excessive amount of plastic waste in the environment, thus leading to a lower environmental impact [3,4].

Studies on the use of polymers have been carried out to offer products with good mechanical properties and a less drastic impact on the environment, including the biodegradable polymers, which can reduce the plastic pollution.

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are among the biodegradable polymers that can be used as substitutes for polymers from petrochemical resources, and the poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] has been highlighted [5]. The great attraction of these biomaterials is that they are fully biodegradable and non-toxic, and can be produced from renewable sources [6,7]. Although P(3HB) has many advantages when compared with plastics made from petroleum, its commercialization is still quite limited due to the high cost of production, thus, studies of cost savings are required. Microbiological processes can substantially reduce the production cost by using more affordable substrates and optimization of the fermentation process [8].

Over 300 microorganisms can synthesize PHAs; however, the production of PHAs is usually limited to *Ralstonia* spp., *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas* spp. and recombinant *Escherichia coli* [6, 9-11]. *Ralstonia* spp. tend to be more amenable to

production on an industrial scale demonstrating high yields and production rates [12] and accumulating approximately 80% of their dry weight in polymers [13].

The strain used in the present study, *R. solanacearum* RS, is a phytopathogenic bacterial P(3HB) producer, which was isolated from a cactus in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil, and characterized by 16S rRNA sequencing [14, 15]. *R. solanacearum* RS was selected for the study, due to the novelty of studying this species for the production of intracellular biopolymers, such as P(3HB)s.

Preliminary studies conducted by our research group using orbital shaker incubators found that *R. solanacearum* RS began its log phase of growth from 6 h of incubation, entering the stationary phase at 22 h. Glucose and sucrose were effective as carbon sources, and sucrose was the most appropriate source for cell growth, and the acidic pH assisted in a higher polymer yield, as a function of the carbon source used (sucrose or glucose). Thus, the microorganism was classified as having type II metabolism, once it did not require nutrient restrictions for the biopolymer accumulation [16].

Although several parameters can be used in the fermentation process, which is usually changed one by one, this strategy does not allow studying the interaction among different parameters, therefore, the process response is given by only one variable. However, the fermentation behavior is influenced by several factors, thus the statistical optimization including the temperature, pH, agitation rate, and aeration should consider the interaction between the variables in the generation of a process response [17] significant role in P(3HB) accumulation in various bacterial strains using inexpensive carbon sources [18].

In this study, the use of a 2^2 central composite rotational design (CCRD) [19, 20] has shown that studying these variables is extremely important to obtain effective results in the production of biopolymers.

The goal of this study was to evaluate the effect of aeration and agitation on cell growth and accumulation of P(3HB) in *R. solanacearum* RS, using a 2^2 central composite rotational design (CCRD). The experiment was performed in a bioreactor, aiming at a greater cell growth used a new concept to monitoring cell growth in the P(3HB) production of combine de methods OD_{600nm} and DCW in the inoculum phase.

Materials and Methods

Microorganism

The *R. solanacearum* RS strain was purchased from the Laboratory of Bacteriology of the Eliseu Maciel Faculty of Agronomy, Federal University of Pelotas, RS, Brazil. The microorganism was freeze-dried and stored at -80°C, and sub-cultured monthly on nutritive yeast agar [21] composed of (in g.L⁻¹) peptone (Kasvi), 5.0; glucose (Synth), 5.0; yeast extract (Kasvi), 1.0; meat extract (Himedia), 3.0; and agar (Kasvi), 15.0, and then stored at 4°C.

Culture media and operating conditions

The pre-inoculum was formed by the suspension of fresh cells, obtained from multiplicative cultures, grown in NYA solid medium plates [21] for 48 h at 32°C, with an initial cellular concentration (OD_{600nm}) of 0.5. The absorbance was determined in a spectrophotometer (Ultrospec10, United Kingdom). Volumes of 200 mL were placed into 500 mL Erlenmeyer flasks. The processes were conducted in an orbital shaker incubator

with a yeast malt [22] culture medium composed of (in g.L⁻¹) yeast extract (Kasvi), 2.7; malt extract (Kasvi), 2.7; peptone (Kasvi), 4.5; sucrose (Synth), 40. The conditions were 32°C, pH 6 and 250 rpm for 24 h.

Growth curves were performed to compare the results of cellular growth (OD_{600nm}) in the inoculum phase from the bioreactor (Biostat B, Germany) and those from the shaker (Certomat BS-1, Germany). The experiment conditions in the shaker were the same of the pre-inoculum phase, while the conditions in the bioreactor were 32°C, 250 rpm, 1 vvm, and pH 6. Samples were collected every two hours for 48 h. DCW yield, P(3HB) accumulation, and sugar and nitrogen residuals throughout the fermentation process were measured only in the bioreactor.

To determine the effect of the agitation and aeration on the inoculum production, a bioreactor with a capacity of 10 L and useable of 7 L, pH 6, with initial cellular concentration (OD_{600nm}) of 0.5, at 32°C for 24 h was used. A complete factorial design 2² with 3 levels (-1, 0, +1) was used, with four treatments at the axial points and three at the central point, totaling 11 treatments (Table 1). The independent variables were aeration (0.3 to 1 vvm) and agitation (150 to 250 rpm).

All experiments were carried out in triplicate. Comparisons were analyzed by ANOVA using the Statistica 7.0 program, considering $p < 0.05$ as significant.

The Response Surface Methodology (RSM) was used to determine the best processing conditions (in terms of aeration and agitation) to increase the cellular multiplication of *R. solanacearum* RS.

Cell growth and P(3HB) accumulation

The optical density (OD_{600nm}) was measured in a spectrophotometer at 600 nm to determine the cell growth.

The dry cell weight concentration (DCW) and P(3HB) accumulation were determined by gravimetry. First, 50 mL of fermented broth was centrifuged ($10.000 \times g$ for 15 min). Then, the cell concentrates were resuspended in 0.89% (w/v) saline solution and centrifuged again. The DCW was obtained by drying the pellets in an oven at 56°C until constant weight [16].

The P(3HB) accumulation was determined by chemical extraction using a method that allows recovery up to 98% of accumulated polymer[23]. To calculate the accumulation yield, the samples were weighed, and the results were expressed as a percentage, according to Eq. 1.

$$\% Y = (P1 \div P2) \times 100 \quad (1)$$

where P1 is total weight of the recovered bioplastics, and P2 is DCW.

The P(3HB) productivity was calculated as the concentration of P(3HB) produced per hour whereas P(3HB). All averages were calculated from triplicate measurements.

Total residual sugars

To evaluate the amount of carbon source consumed, sucrose residuals (a non-reducing sugar) from the cultures were determined by the dinitrosalicylic acid (DNS) method for reducing sugars [24]. Samples from centrifuged fermented broth were hydrolyzed with 2 M HCl and then neutralized with 2 M NaOH. The supernatants were diluted to 1:40 or 1:50 (v.v⁻¹) as needed. The procedures were done in test tubes with 1 mL of sample added to 1 mL of the DNS reagent. The samples were stirred and heated at 100°C for 5 min, and then placed in a cooling bath for 5 min, and 16 mL of sodium and potassium double tartrate solution was added. The absorbance readings were carried out in a spectrophotometer (HITACHI, model: U-1800; Japan) at 540 nm. A standard curve

of glucose ranging from 0 to 1.0 g.L⁻¹ was constructed, and the results were expressed as g.L⁻¹.

Total residual nitrogen

To determine the amount of nitrogen source consumed, a Urea CE (Ref. 27) commercial test (Labtest, Brazil) was used to evaluate the residual nitrogen. The analyses were carried out in accordance with the Labtest instructions. The samples used were supernatants of fermentation broths obtained from determination of P(3HB) accumulation. The results were expressed as g.L⁻¹.

Gel Permeation Chromatography (GPC)

The molar mass of the polymers was estimated by GPC analysis. The assay was developed by analysts at PHB Industrial SA (Serrana, SP, Brazil) and is not commercially available. The following Waters GPC equipment and accessories were used: 1515 isocratic pump, column heater, 717 plus autosampler, 2414 refractive index detector, and Styragel columns (10³, 10⁴, 10⁵, and 10⁶; 7.80 x 300 mm). The samples were solubilized in chloroform, filtered through a 0.45 µm membrane, and spiked with toluene as a peak marker prior to injection. The mobile phase was HPLC analytical grade chloroform.

Results and Discussion

The growth curves in terms of OD_{600nm} of the *R. solanacearum* RS strains developed in both the shaker and the bioreactor are shown in Fig 1 (A, B, and C).

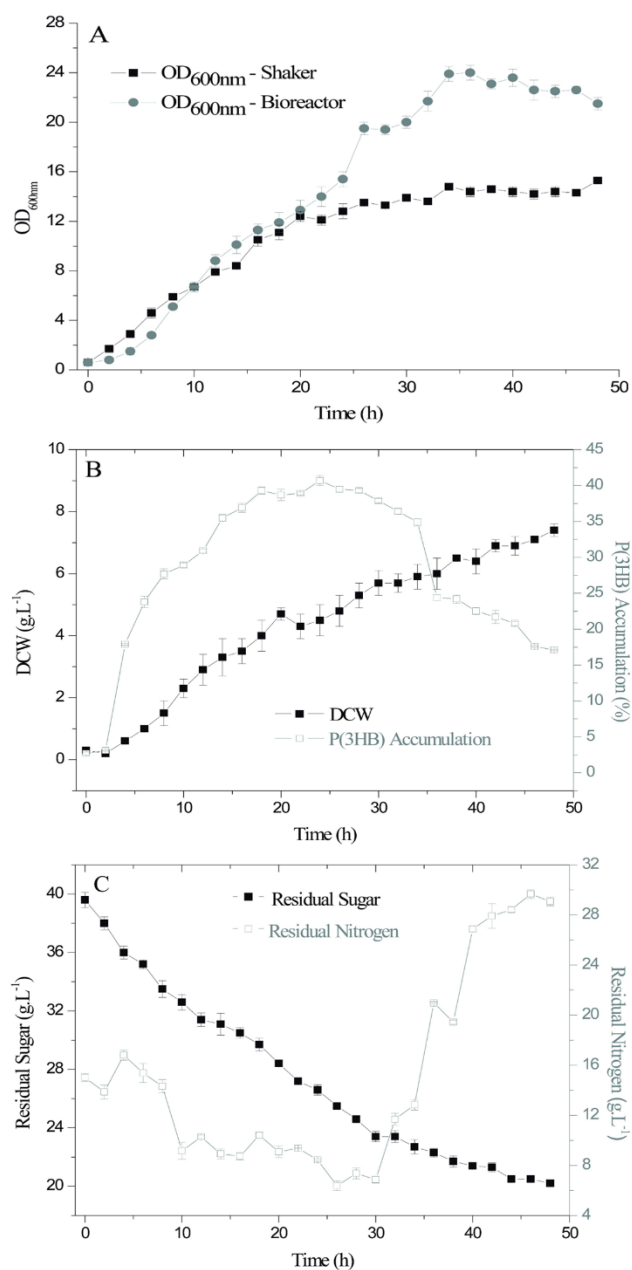


Fig 1. Growth curves of the *R. solanacearum* RS strains, P(3HB) accumulation and sugar and nitrogen residuals. (A) shaker and bioreactor, cellular concentration expressed as OD_{600nm}; (B) bioreactor, dry cellular weight (DCW) and P(3HB) accumulation (g.L⁻¹); (C) bioreactor, sugar and nitrogen residuals during 48 h (g.L⁻¹).

As shown in Fig 1A, the growth curves obtained in both apparatus and expressed as OD_{600nm} were equivalent until 20 h. After 26 h of process, significant differences were observed, with higher results for the fermentation in the bioreactor when compared to the shaker. The highest cell growth values expressed as OD_{600nm} were found at 34 h (23.9 abs) in the bioreactor and (14.8 abs) in the shaker. The P(3HB) productivity was 0.12 g.L⁻¹.h⁻¹ in the bioreactor. Cultures with high cell densities have advantages such as a higher concentration of product, and higher productivity and recovery costs of polymer [25]. These positive results are due to the conditions in the bioreactor, which provides a controlled environment that allows for efficient cell growth and attainment of the product of interest, which is not observed in the shaker, as it is not possible to control the agitation conditions.

Similar behavior was observed for the growth curves, which exhibited a lag phase within 5 h, followed by the log phase up to 34 h, without entering the stationary phase. The decline phase in turn cannot be observed. Macagnan et al. (2017) [16] reported that the stationary phase of the growth curve of *R. solanacearum* RS in YM medium [22], also expressed as OD_{600nm}, was within 22 to 28 h of culturing.

Microbial growth curve is an important parameter in microbial research, and is a complex process, which depends on numerous coordinated anabolic and catabolic reactions. The analysis of cell growth can be performed using both the discontinuous and continuous modes [26], and the discontinuous growth curve was used in the present study. The discontinuous process is characterized by the use of known concentrations of nutrients, with no input or output of any nutrient during the period of analysis. Thereby, the amount of nutrients decreases and the rate of metabolite residues increase [26]. In the continuous growth, the flow of nutrients supplied to the microorganism remains the same,

and despite the cells increase in size, the microbial growth is mainly due to binary division [27,28].

For the bioreactor (other parameters were not analyzed for the shaker), DCW increased over time, with a greater yield of 7.6 g.L^{-1} (48 h). During the bioprocess, the amount of biomass is an important physiological parameter related to cell growth, metabolism, and productivity, along with the $\text{OD}_{600\text{nm}}$ and other parameters offline conventional biomass in this type of process [29,30]. Although the $\text{OD}_{600\text{nm}}$ was practically stabilized within 36–48 h, great changes were observed in DCW and P(3HB) accumulation. When the cell characteristics change during growth, including the intracellular polymer concentration, the relationship between $\text{OD}_{600\text{nm}}$ and DCW also changes. The resulting inaccuracy is sometimes inconsequential, but becomes important when one of the primary variables of interest is the biomass yield itself. Then, the $\text{OD}_{600\text{nm}}$ measurements used alone can transmit little information on cell concentration [31], making it necessary to combine methods for better monitoring of the inoculum phase, such as $\text{OD}_{600\text{nm}}$ and DCW.

In the growth curve, a plateau relative to P(3HB) recovery from 16 h (36.9%) to 28 h (39.3%) (Fig 1B) was verified. Thus, a time of 24 h was established for the realization of the 2^2 CCRD, because a decrease in yield is observed when the DCW values were related to the P(3HB) yield, even at high $\text{OD}_{600\text{nm}}$ and DCW values, with the greatest accumulation within 24 h (41.32%). An increase in DCW with the decrease in P(3HB) is indicative of high cell multiplication and polymer degradation to supply energy and carbon, as the metabolism of the microorganisms is governed by the growth medium. With a balanced growth, the microorganism uses the substrate as an energy source and/or for the maintenance/formation of cellular material [32, 33].

As expected, the sugar concentration decreased during the process, corresponding to half of the initial concentration available at the end of the process (Fig 1C). These results show that the microorganisms began to use the polymer produced for

survival, rather than all sugar available, resulting in the low polymer accumulation at the end of the growth curve. The availability of the carbon source in the medium should also be regarded as a positive factor for the polymer accumulation as the cultures examined for P(3HB) yield contained approximately 50% of the initial sucrose level after 48 h of incubation. However, higher sugar concentrations can hamper cell multiplication and the early P(3HB) accumulation, as reported by Crochemore et al. (2012) [34].

The nitrogen concentration decreased within 30 h (from 0.15 g.L⁻¹ to 0.6 g.L⁻¹), and increased after this period, reaching 0.29 g.L⁻¹ at the end of the process, within 48 h. This increase may be due to the cell degradation, once microbial cells are composed of nitrogenous bases. For the production of P(3HB), it is usually necessary to limit the essential nutrients [35] such as nitrogen, as high values of this micronutrient eventually suppress the polymer formation, which can be noticed by the growth curve. Ramsay et al. (1990) [12] reported that the nitrogen concentrations below 0.2 g.L⁻¹ allowed for the P(3HB) accumulation by *R. eutropha*.

PHA producing microorganisms are divided into two groups, I and II. Group I comprises those microorganisms that accumulate the biopolymer only under special conditions, i.e. with an excess of carbon and the nutrient restriction, such as N, P, Mg, K, S or O. In these microorganisms, the cellular growth and polymer accumulation occur in different phases. On the other hand, group II consists of microorganisms with no nutrient restriction or carbon excess [36]. Although the *Ralstonia* spp. lineage is generally classified as belonging to group I [36-38], Macagnan et al. (2017) [16] reported a P(3HB) production of 46.62% in the inoculum phase, without nutrient restriction, which is a characteristic of group II. Crochemore et al. (2012) [34] described extensive P(3HB) accumulation - up to 70%, by the *Pseudomonas* strain CMM43 in the inoculum phase, suggesting that the accumulation occurred simultaneously with growth.

2² central composite rotational design

Table 1 presents the results of cell growth (OD_{600nm} and DCW) and P(3HB) accumulation as a function of the different aeration and agitation conditions, following a central composite rotational design (2² CCRD).

Table 1. Matrix of the 2² CCRD. Coded and real levels of aeration and agitation and the response variables of the *R. solanacearum* RS inoculum incubated for 24 h at 32°C in YM culture medium, using sucrose as the carbon source.

Treataments	Independent variables		pH	Dependent variables			
	Aeration (vvm)	Agitation (rpm)		OD_{600nm}	DCW (g.L ⁻¹)	P(3HB) (%)	Productivity from the DCW (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
1	-1 (0.3)	-1 (150)	6.3	8.61	2.13	26.5	0.08
2	+1 (1)	-1 (150)	5.7	15.31	4.0	39.65	0.15
3	-1 (0.3)	+1 (250)	5.8	15.37	4.81	36.62	0.19
4	+1 (1)	+1 (250)	5.9	18.04	4.82	42.87	0.19
5	-1.41 (0.25)	0 (200)	6.3	11.73	2.00	23.11	0.07
6	+1.41 (1.05)	0 (200)	6.5	13.24	1.93	45.06	0.06
7	0 (0.65)	-1.41 (143)	6.3	10.82	2.85	43.98	0.10
8	0 (0.65)	+1.41 (257)	5.8	13.99	4.33	39.94	0.17
9	0 (0.65)	0 (200)	5.7	16.09	4.51	31.76	0.17
10	0 (0.65)	0 (200)	5.7	16.40	4.50	31.17	0.17
11	0 (0.65)	0 (200)	5.7	15.44	4.57	31.28	0.18

pH, potential of hydrogen; OD_{600nm} , optical density; DCW, dry cell weight; P(3HB), poly(3-hydroxybutyrate).

Table 2 presents the results of analysis the variance (ANOVA) of the P(3HB) yield according to the central composite rotational design (2^2 CCRD).

Table 2. Analysis of variance (ANOVA) for the quadratic polynomial model fitted for the maximum P(3HB) yield.. Analysis of variance (ANOVA) of aeration and agitation of the response variables of the *R. solanacearum* RS inoculum incubated for 24 h at 32°C in YM culture medium using sucrose as the carbon source.

Source of variation	FD	Sum of squares	Mean square	F	Pr > F
Model ^a	5	472.5702	94.51404	5.5	5.05
Error	5	68.1097	13.62194	-	-
Lack of fit	3	67.9128	22.6376	19.164	19.164
Pure Error	2	0.1969	0.09845	-	-
Total	10	540.6799	-	-	-

FD: Freedom degree; ^a $R^2=R^2=0.87403$, $R^2_{adjusted}= 0.87403$

Table 3 presents polydispersity data and the average Mm for recovered P(3HB) from treatments as a function of different aeration conditions and agitation of the culture medium, generated by the application of the Central Composite Rotational Design (CCRD 2^2).

Table 3. Polydispersity index and average Mm for the recovered P(3HB). Gel Permeation Chromatography (GPC) of the aeration and agitation treatment for the *R. solanacearum* RS inoculum incubated for 24 h at 32°C in YM culture medium using sucrose as the carbon source.

Treatments	Polydispersity (Mm/Mn)	Average Molar Mass (Da)	
		Mn	Mm
1	2.14	3.5×10^5	7.5×10^5
2	4.03	8.7×10^4	3.5×10^5
3	4.17	3.7×10^4	1.5×10^5
4	2.98	1.1×10^5	3.4×10^5
5	2.07	2.8×10^5	5.8×10^5
6	3.84	1.4×10^5	5.4×10^5
7	4.32	1.1×10^5	5.0×10^5
8	5.30	7.5×10^4	3.9×10^5
9	5.38	6.8×10^4	3.6×10^5
10	5.67	3.9×10^4	2.2×10^5
11	6.00	5.2×10^4	3.1×10^5

Mn, Number average molecular weight; Mm, Weight average molecular weight

The initial pH of the medium was 6.0, which was not adjusted during the process. It was observed that lower pH reductions were associated with lower DCW values. In the treatment 6 (+1.41; 0) the final pH (6.5) was associated with the highest P(3HB) accumulation.

The highest cell growth estimated by OD_{600nm} (18.04) and DCW (4.82 g.L⁻¹) was observed in the treatment 4, which combined +1; +1, and reproduced the growth curve conditions. The results showed that greater agitation, even with lower aeration, can result

in a satisfactory density and cell mass at the maximum value, but when related to the low supply of oxygen in the minimum values, it ends up having a lower production of the polymer. In the mathematical model tested, the dependent variables OD_{600nm} and DCW did not have predictive and significant results, thus it was not possible to generate response surfaces. Macagnan et al. (2017) [16] evaluated the pH conditions in the inoculum phase to optimize the production process of P(3HB) by *R. solanacearum* RS, and found that a more acidic pH may indicate higher cell growth.

The treatments 5 (-1.41; 0), 6 (+1.41; 0), and 7 (0; -1.41), with OD_{600nm} values of 11.73, 13.24 and 10.82, obtained lower DCW values of 2 g.L⁻¹, 1.93 g.L⁻¹, and 2.85 g.L⁻¹, respectively. Among these treatments, the treatment 6 presented the highest OD_{600nm} and the lowest DCW. Therefore, it is important to study other parameter, such as DCW, in association with the optical density to obtain a satisfactory and real process characterization.

Significant P(3HB) accumulation was verified in all treatments, confirming that *R. solanacearum* RS should be classified as type II in relation to the polymer accumulation phase. As observed for the DCW, the P(3HB) yield was remarkable in the treatment 4 (42.87%), which combined +1; +1. On the other hand, the treatment 6, with aeration and agitation at levels +1.41; 0, respectively, had lower OD_{600nm} and DCW values, and the highest P(3HB) yield (45.06%). The productivity values varied from 0.08 g.L⁻¹.h⁻¹ to 0.19 g.L⁻¹.h⁻¹, corresponding to the treatments 1 and 4, respectively. A predictive mathematical model with 95% confidence and determination coefficients (R^2) of 0.87 (Table 2) for the dependent variable of P(3HB) was generated. The coefficient of determination (R^2) measures the proportion of the total response variation that is explained by the model. Models with $R^2 < 0.60$ should be used only as trend indicators and never for predictive purposes [39-41].

The statistical analysis showed that 95% of significant regression coefficients were considered in the mathematical models (Eq. 2) proposed to represent P(3HB) accumulation as a function of the aeration and agitation processes.

$$P(3HB) = 31.41 + 6.31 \times Ae + 0.93 \times Ae^2 + 0.96 \times Ag + 4.89 \times Ag^2 - 1.73 \times Ae \times Ag \quad (2)$$

where, Ae is the variable aeration and Ag is agitation.

The response and boundary surface for the aeration and agitation, based on the model generated by Eq. 2, are shown in Fig 2.

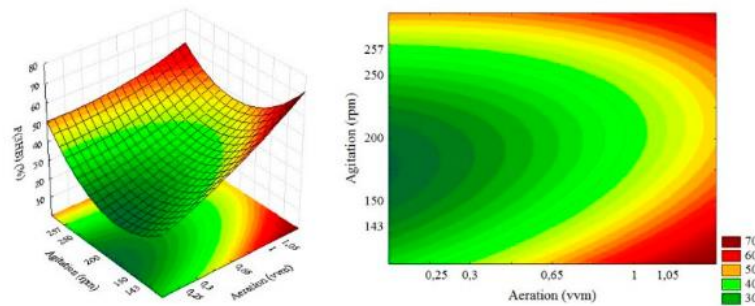


Fig 2. (A) Response and contour surfaces as a function of P(3HB) accumulation for the variables aeration and agitation.

The results of the response surface in relation to the P(3HB) production shows that higher biopolymer production (about 70% higher) tends to occur with a greater availability of oxygen.

Eq. 2 was used to perform the validation of the response surface generated by the P(3HB) production, replacing the variables Ae (aeration) and Ag (agitation) by the coded variables +1 for both aeration and agitation, which should produce 42.77% P(3HB) yield, similar to the 41.32 % obtained experimentally, indicating that the model proposed can be reproduced.

In relation to the polydispersity index (M_n/M_w), the highest values were observed for the treatments 8 (5.30), 9 (5.38), and 11 (6.0), with aeration and agitation at the levels 0; +1.41; and 0; 0, respectively, with values ranging from 1.5×10^5 Da (T3) to 7.5×10^5 Da (T1). The average molar mass (M_w) of P(3HB) produced by *R. solanacearum* RS strain was 2.9×10^5 Da [23]. This property is extremely important because it directly affects the mechanical strength of the bioplastics as well as the expansion capacity, the hydrolysis, and consequently, the biodegradation rate [42].

Kemavongse et al. (2008) [43] investigated the poly- β -hydroxyalkanoate production by halotolerant *Rhodobacter sphaeroides* U7, using aeration values from 0 to 1.5 vvm and agitation values from 0 to 200 rpm. The two best results, DCW of 5.08 g.L^{-1} and P(3HB) yield of 57.84%, were obtained by medium aeration and high agitation (1 vvm and 200 rpm) and high aeration and agitation (1.5 vvm and 200 rpm) respectively.

Chakraborty et al (2012) [44] studied the PHA production and yield of *R. eutropha* fed intermittently with short chain fatty acids, using a mean $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 1.04 abs for inoculum conditions, and a culture medium described as CCS (solubilized corn), which is a low cost industry medium, for 24 h at 30°C and 250 rpm. The PHA productivity ($0.0697 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), PHA (8.37 g.L^{-1}), and PHA content (39.52%) were high when ARF (artificial rumen fluid) was fed every 3 h for 61 h. However, the productivity varied by $0.19 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ in 24 h, which was lower than that observed in the present study.

Zafar et al. (2012) [45] investigated the modeling and optimization of the poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) production from cane molasses using a bioreactor, and the effect of agitation and aeration regime on *Azohydromonas lata* MTCC 2311 inoculum, at 180 rpm and 30°C for 24 h. The authors reported a higher P(3HB-co-3HV) productivity of $0.163 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, which is similar to the findings of the present study.

However, only the inoculum production conditions can be compared with the current study.

Macagnan et al (2017) [16] used a central composite rotational design (2^2 CCRD) aimed at adjusting the pH and sugar concentration in the inoculum phase of *R. solanacearum* RS in a shaker. In the optimized range, the authors found DCW and P(3HB) accumulation of 5.35 g.L^{-1} and 45.62%, respectively. When compared with the present results, it is evident that the biopolymer accumulation can exhibit the highest yield above the maximum aeration conditions, regardless of agitation in the bioreactor.

The factorial design is a continuous practice and has become an important tool, capable of determining better the processing conditions, with advantages when compared to the conventional methods using only one parameter per test. A number of researchers have used the factorial technique to optimize the culture conditions [46,47] and to determine the optimum processing parameters [48,49].

Conclusion

In growth curves, $\text{OD}_{600\text{nm}}$ exhibited similar values at 20 h in both the shaker and bioreactor, with the highest $\text{OD}_{600\text{nm}}$ observed in the bioreactor. Higher DCW values (7.6 g.L^{-1}) and lower P(3HB) yield were observed over time. The sugar residuals decreased during the process, and nitrogen also decreased within 30 h, increasing afterwards. According to the present results, the best aeration and agitation conditions in the inoculum phase was 1 vvm and 250 rpm (pH 5.9, $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 18.04, DCW 4.82 g.L^{-1} , and 42.87% yield P(3HB)). In relation to the P(3HB) accumulation by *R. solanacearum* RS in the initial phase, it can be said that the microorganism belongs to group II, once it has no metabolic requirements for the biopolymer production. Further studies should be performed to evaluate whether the growth and P(3HB) accumulation in the microorganism studied can be improved by a continuous approach.

Acknowledgements

We thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel- CAPES, A. B. Moura, Bacteriology Laboratory, FAEM, UFPel for providing the *R. solanacearum* RS strain. We also thank S. M. Kesserlingh, PHB Industrial, for carrying out the molar mass analysis.

References

1. National Geographic, A Whopping 91% of Plastic isn't Recycled, <https://news.nationalgeographic.com/2017/07/plastic-produced-recycling-waste-ocean-trash-debris-environment/> (accessed, 30 October 2017).
2. Geyer R, Jambeck JR, Law KL. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*. 2017;3(7): e1700782.
3. Franchetti SM, Marconato, JC. Polímeros biodegradáveis- uma solução parcial para diminuir a quantidade de resíduos plásticos. *Química Nova*. 2006;29(4): 811-816.
4. Brito GF, Agrawal P, Araújo EM, Melo TJA. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. 2011;6(2): 127-139.
5. Mozumder MSI, Garcia-Gonzalez L, De Wever H, Volcke EIP. Effect of sodium accumulation on heterotrophic growth and polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*. 2015;191: 213–218.
6. Chanprateep S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2010;110(6): 621-632.

7. Park SJ, Kim TW, Kim MK, Lee SY, Lim SC. Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: Towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. *Biotechnology Advances*. 2012;30(6): 1196–1206.
8. Ramadas NV, Soccol, CR, Pandey A. A statistical approach for optimization of polyhydroxybutyrate production by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149 under submerged fermentation using central composite design. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 2010;162(4): 996–1007.
9. Rodríguez-Contreras A, Koller M, Dias MMS, Calafell-Monfort M, Braunegg G, Marqués-Calvo MS. Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*. *Biochemical Engineering Journal*. 2015;94(15): 50-57.
10. Rodríguez-Contreras A, Koller M, Dias MMS, Calafell-Monfort M, Braunegg G, Marqués-Calvo MS. High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain. *Journal of Applied Microbiology*. 2013;114(5): 1378-1387.
11. Sathish A, Glaittli K, Sims RC, Miller CD. Algae Biomass Based Media for Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Production by *Escherichia coli*. *Journal of Polymer and the Environment*. 2014;22(2): 272-277.
12. Ramsay JA, Berger E, Voyer R, Chavrie C, Ramsay BA. Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment, *Biotechnology Techniques*. 1990;4(4): 221-226.
13. Byrom D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Tibtech*. 1987;5: 246-250.

14. Pereira DD, Moura AB, Silva EG, Kunzler DP. Cacto (*Cereus pemvianus monstruosus*), um novo hospedeiro para *Ralstonia solanacearum*. Revista da Ciência Rural. 2001;6(1): 22-26.
15. Rodrigues AA, Macagnan KL, Santos BC, Alves MI, Moura AB, Peralba MCR, et al. Seleção e identificação de linhagens bacterianas produtoras do bioplástico poli(3-hidroxibutirato), Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. 2015;9: 1771-1785.
16. Macagnan KL, Alves MI, Rodrigues AA, Furlan L, Rodrigues RS da, de Oliveira PD, et al. Complete factorial design to adjust pH and sugar concentrations in the inoculum phase of *Ralstonia solanacearum* to optimize P(3HB) production. Plos One. 2017;12(7): e0180563.
17. Haaland PD. Experimental design in biotechnology. New York: Dekker, 1989.
18. Almeida A, Giordano AM, Nikel PI, Pettinari MJ. Effects of aeration on the synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) from glycerol and glucose in recombinant *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 2010;76(6): 2036e40.
19. Tripathi AD, Srivastava SK, Singh RP. Statistical optimization of physical process variables for bio-plastic (PHB) production by *Alcaligenes* sp. Biomass and Bioenergy. 2013; 55: 243-250.
20. Alves-Gautério FG, Moreira AdaS, Vendruscolo CT. Investigação por planejamento experimental da influência da aeração e agitação no processo produtivo de xantana por *Xanthomonas arborícola* pv pruni. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. 2015;9(2): 1821-1835.

21. Schaad NW, Jones JB, Chun W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press. 2001; 3 373.
22. Jeanes A. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. Food Technology. 1974;28: 34-40.
23. Macagnan KL, Rodrigues AA, Alves MI, Furlan L, Kesserlingh SM, Moura AB, et al. Simplified recovery process of *Ralstonia solanacearum*-synthesized polyhydroxyalkanoates via chemical extraction complemented by liquid-liquid phase separation. Química Nova. 2017;40(2): 125-130.
24. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chemistry. 1959;31(3): 426–428.
25. Squio CR, Aragão GMF de. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bactérias. Química Nova. 2004;27(4): 615-622.
26. Åkerlund T, Nordström K, Bernander R. Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 1995;177(23): 6791-6797.
27. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiologie (seconde édition française). Bruxelles. Belgium: De Boeck 2003.
28. Richmond A, Abieliovich A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, Oxford, UK: Blackwell Science 2004.
29. Carvell JP, Dowd JE. On-line measurements and control of viable cell density in cell culture manufacturing process using radio-frequency impedance. Cytotechnology. 2006;50(1-3): 35-48.
30. Xiong ZQ, Guo YX, Chu J, Zhuang YP, Zhang SL. Real-time viable-cell mass monitoring in high-cell-density fed-batch glutathione fermentation by

- Saccharomyces cerevisiae* T65 in industrial complex medium. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2008;105(4): 409-413.
31. Chioccioli M, Hankamer B, Ross IL. Flow cytometry pulse width data enables rapid and sensitive estimation of biomass dry weight in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chorella vulgaris*. Plos One. 2014;9(5): e97269.
 32. Lee SY, Choi J, Wong HH. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: *minireview*. International Journal of Biological and Macromolecules. 1999;25(1-3): 31-36.
 33. Alves MI, Macagnan KL, Rodrigues AA, Assis DA de, Torres MM, de Oliveira PD, et al. Poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB): Review of production process Techniques. Industrial Biotechnology. 2017;13(4): 192-208.
 34. Crochemore AG, Mattos MLT, Vendruscolo CT, de Castro LAS, Moreira AS da, Identification of pesticide-degrading *Pseudomonas* strains as poly- β -hydroxybutyrate producers. African Journal of Biotechnology. 2012;11(85): 15144-15149.
 35. Wu Q, Huang H, Hu GH, Chen J, Ho KP, Chen GQ. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. Antonie van Leeuwenhoek. 2001;80(2): 111–118.
 36. Lee SY. Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnology Bioengineering. 1996;49(1): 1-14.
 37. Du G, Chen J, Yu JNB, Lun S. Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. Journal of Biotechnology. 2001;88(1): 59–65.
 38. El-Sayed AA, Abdelhady HM, Hafez AMA, Khodair TA. Batch Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Ralstonia Eutropha* and *Alcaligenes Latus* Using

- Bioreactor Different Culture Strategies. Journal of Applied Sciences Research. 2009;5(5): 556-564.
39. Barros NB, Scarminio IS, Bruns RE. Planejamento e otimização de experimentos, Campinas: Ed.UNICAMP. 1995.
 40. Khuri AI, Cornell JA. Response surface: design and analyses. New York: Marcel Dekker Inc.1996.
 41. Barros BN, Scarminio IS, Bruns RE. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, Campinas: Emd. UNICAMP. 2001.
 42. Montoro SR, Shigue CY, Sordi MLT, Santos AM, Ré MI. Estudo Cinético da Redução da Massa Molar do Poli (3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxivalerato) (PHBHV). Polímeros: Ciência e Tecnologia. 2010;20(1): 19-24.
 43. Kemagongse K, Prasertan P, Uapichit A, Mathacanon P. Poly- β -hydroxyalkanoate production by halotolerant *Rhodobacter sphaeroides* U7. World Journal Microbiology and Biotechnology. 2008; 24: 2073-2085.
 44. Chakraborty P, Muthukumarappan K, Gibbons W. PHA productivity and yield of *Ralstonia eutropha* when intermittently or continuously fed a mixture of short chain fatty acids. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012; ID 506153.
 45. Zafar M, Kumar S, Kumar S. Modeling and optimization of poly(3hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate) production from cane molasses by *Azohydromonas lata* MTCC 2311 in a stirred-tank reactor: effect of agitation and aeration regimes. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2012;39: 987-1001.
 46. Kalil SJ, Maugeri F, Rodrigues MI. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. Process Biochemistry. 2000;35(6): 539–550.

47. Rosa CFC, Michelon M, Burkert JFM, Kalil SJ, Burkert CAV. Effect of medium composition on changes of surface tension during cultivation of *Pseudomonas aeruginosa* LBM10 growing on glycerol. *International Journal of Engineering Research Applied*. 2015;5(4): 41-46.
48. Burkert JFM, Maldonado RR, Filho FM, Silva-Santisteban MIR. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2005;80: 61–67.
49. Alves FG, Filho FM, Burkert JFM, Kalil SJ. Maximization of β -galactosidase production: a simultaneous investigation of agitation and aeration effects. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010;160(5): 1528–1539.

Capítulo 3- Manuscrito 1:

Efeito do pH e fonte de carbono iniciais no acúmulo de P(3HB) por *Bacillus megaterium* CN3

Manuscrito elaborado para o periódico- *Polímeros Ciência e Tecnologia*

Qualis 2013-2016 em Ciência dos Alimentos: B1

Fator de impacto: 0.632

INSS: 1678-5169 (online)

Efeito do pH e fonte de carbono iniciais no acúmulo de P(3HB) por *Bacillus megaterium* CN3

Mariane Igansi Alves^{1*}, Karine Laste Macagnan², Camila Rios Piecha², Matheus Marques Torres², Rosane da Silva Rodrigues³, Patrícia Diaz de Oliveira^{1,2}, Angelita da Silveira Moreira^{1,2,3*}

*marianeigansialves@hotmail.com; angelitadasilveiramoreira@gmail.com

¹ Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil;

² Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil;

³ Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

Resumo

A ampla utilização dos plásticos petroquímicos aliada à lenta degradação os torna um grave problema ambiental. Assim, cresce o interesse por materiais substitutos. Uma alternativa é o poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)], biopolímero microbiano biodegradável produzido usando fontes de carbono renováveis. Objetivou-se avaliar, por meio de delineamento composto central rotacional os efeitos do pH e fonte de carbono iniciais na fase de crescimento celular e comparar, na fase de produção, dois meios de cultivos quimicamente definidos, F4 (padrão) e MM, que utilizam fontes de nitrogênio diferentes - ureia e sulfato de amônio, respectivamente, em diferentes tempos (24 a 72h), visando aumentar o acúmulo de P(3HB) por *Bacillus megaterium* CN3. O uso de sacarose resultou em faixas de variação mais ampla de densidade óptica (DO_{600nm}) e de massa celular seca (MCS), bem como nos maiores valores dessas variáveis. Os valores de DO_{600nm} foi de 8,8 e 8,6 usando sacarose e glicose, respectivamente; a MCS foi de 2,8 g L⁻¹ e 2 g L⁻¹, usando sacarose e glicose, respectivamente. O inóculo obtido com a melhor combinação - sacarose (47,1 g L⁻¹) e pH 7,2 - foi usado na fase de produção. A produção com os melhores resultados – MSC 1,7 g L⁻¹ e 45,1 % de acúmulo de P(3HB) – foi obtida com o meio MM no menor tempo, 24 h. Portanto, o estudo permitiu a seleção de fonte de carbono mais econômica e associação mais vantajosa das variáveis concentração de açúcar e pH iniciais, gerando um inóculo que permitiu acúmulo posterior do biopolímero

na fase de produção; adicionalmente, selecionou-se uma combinação meio e tempo de incubação mais propícia ao acúmulo do biopolímero, com redução do tempo de incubação tradicionalmente utilizado para a bactéria.

Palavras Chave: Biopolímero microbiano; Bioprocesso; Delineamento Composto Central rotacional; Glicose; Sacarose; polihidroxialcanoatos; poli(3-hidroxiбутирато)

1. Introdução

Produtos de origem petroquímica estão entre os maiores causadores de poluição ambiental (CAMPOS et al., 2014). Devido a esse sério problema, medidas de conscientização global estão sendo encorajadas para que o processo de obtenção e os produtos sejam mais sustentáveis e ambientalmente corretos. Com isso, alguns países iniciaram investimentos para reduzir o uso de plásticos à base de petróleo, como foi o caso da França em 2016, que proibiu os materiais plásticos que não continham no mínimo 50 % da sua composição biodegradável (FRANÇA, 2016); e o Brasil que recentemente através do projeto de lei nº 92 de 2018, que tem como objetivo a completa eliminação do plástico não biodegradável da composição de pratos, copos, bandejas, talheres, canudos e outros utensílios destinados ao acondicionamento e ao manejo de alimentos prontos para o consumo (BRASIL, 2018).

Entre os biopolímeros estudados ao longo dos anos, o poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)], poliéster microbiano intracelular utilizado como reserva de energia e produzido usando fontes de carbono renováveis, vêm recebendo destaque por ser bom substituto dos plásticos de origem petroquímica, juntamente com outros polihidroxialcanoatos (PHA's) (KULPREETCHA et al., 2009; PADIAN et al., 2010), porque além de serem biodegradáveis, possuem características mecânicas similares aos inúmeros termoplásticos utilizados atualmente (FACCIN et al., 2013; ALVES et al., 2017).

Em geral, os bioprocessos requerem condições controladas para o estudo dos parâmetros operacionais como aeração, agitação, pH, oxigênio dissolvido, tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, além da suplementação de micronutrientes, já que os mesmos são fundamentais para o metabolismo do microrganismo para que haja a produção satisfatória do produto de interesse, sendo, por

isso, de extrema importância (CALIK et al., 2003; MANPREET et al., 2005). Delineamentos Compostos Centrais Rotacionais (DCCR) podem auxiliar na melhoria de bioprocessos, como os de produção de biopolímeros, pois permitem testar um maior número de variáveis em menor tempo, aumento a eficiência dos experimentos.

O estudo da fonte de carbono é importante, pois se verifica a capacidade de absorção deste nutriente pelo microrganismo que pode variar de monossacarídeos (glicose) até polissacarídeos (amido) (RODRIGUEZ- CONTRERAS et al., 2015; FACCIN et al., 2013); porém, os dissacarídeos (sacarose, por exemplo), normalmente, fornecem os melhores resultados, sendo responsáveis por 25-45 % dos custos totais de produção (NATH et al., 2008).

Bacillus megaterium foi o primeiro microrganismo onde verificou-se a presença de corpos de inclusão constituídos de PHA'S, mais especificamente de P(3HB). Além disso, o microrganismo se torna interessante para a produção do biopolímero por apresentar tolerância as altas temperaturas e pressões osmóticas, resultando em um processo estável e com rápido crescimento celular (FACCIN et al., 2013).

A bactéria *B. megaterium* é capaz de crescer e acumular PHAs a partir de diversas fontes de carbono como frutose, glicose, xilose, lactose, sacarose, maltose, gluconato de sódio, melaço de cana entre outras fontes (GOUDA et al., 2001; FULL et al., 2006). Estudos realizados pelo laboratório de Biopolímeros do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, indicaram que a cepa *B. megaterium* CN3 possui potencial para produção de P(3HB) em quantidades expressivas na temperatura de 36 °C. Com isso, o objetivo do trabalho foi melhorar produção do P(3HB) utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR 2²) avaliando o efeito do pH e fonte de carbono iniciais na fase de crescimento

celular, além da aplicabilidade do inóculo assim obtido na fase de produção, em meios com diferentes fontes de nitrogênio.

2. Material e Métodos

2.1 Microrganismo

Bacillus megaterium CN3, isolada de solo, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Biopolímeros da unidade de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico-CDTec da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. A bactéria tem sido preservada por dois métodos: liofilização e congelamento a -80 °C em crioprotetora composto (g L^{-1}) por: 0,93 peptona; 0,93 manitol, 0,46 glutamato sódico, 0,46 gelatina, 0,38 fosfato monobásico de sódio e 0,228 fosfato dibásico de sódio (ELLNER, 1978), na proporção de 60 (inóculo): 40 (v.v⁻¹).

a. Meios de cultivo e condições operacionais

Na fase de crescimento celular, inicialmente produziu-se o pré-inóculo, com 0,5 abs ($\text{DO}_{600\text{nm}}$), a partir da suspensão, em *Yest Malt* (YM) (JEANES, 1974) variado em relação as concentrações de extrato de levedura, extrato de malte, peptona sem a adição da fonte de carbono (glicose) (Tab. 1) (JEANES, 1974), de células frescas, crescidas por 72 h à 36 °C no meio de cultivo *Nutritive Yest Agar* (NYA) (SCHAAD et al., 2001). Foram utilizadas variações do meio de cultivo *Yest Malt* (YM) modificado, em relação ao tipo (sacarose ou glicose) e concentração de açúcar utilizado; todas variações foram adicionadas de $1,0 \text{ mL.L}^{-1}$ de óleo de arroz (Carreteiro®) como antiespumante. O meio de cultivo inicial foi autoclavado a 121 °C por 15 min, e as soluções de açúcares foram esterilizadas separadamente e adicionadas ao meio de cultivo segundo os delineamentos a seguir.

Foram realizados dois DCCR 2², com quatro pontos axiais e três pontos centrais, totalizando 11 tratamentos (Tabela 2 e 3) para cada tipo de fonte de carbono: glicose ou sacarose. Para cada fonte de carbono variou-se o pH inicial do meio com adição de soluções de HCl ou NaOH 2 M, sendo pH 5,8 a 7,2 quando a fonte de carbono era sacarose (de 15 a 45 g L⁻¹) e pH 5,5 a 9,5 quando a fonte de carbono era glicose (de 10 a 50 g L⁻¹); em todas as variações o teor de nitrogênio inicial foi 0,15 g L⁻¹ (MACAGNAN et al., 2017). O processo foi conduzido em frascos *Erlenmeyers* de 250 mL com um volume total de meio de cultivo de 100 mL. As condições operacionais foram 36 °C a 150 rpm por 24 h em agitador incubador orbital (Certomat® BS-1, Alemanha).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e suas comparações foram analisadas estatisticamente com o teste de ANOVA usando o programa *Statistica* 7.0. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. Foram observados os efeitos das diferentes combinações de pH e fonte de carbono iniciais sobre a multiplicação celular do *B. megaterium* CN3, analisada em função dos valores finais de DO_{600nm} e MSC. A combinação da fonte de carbono com o pH que proporcionou o maior crescimento celular foi selecionada para obtenção de inóculos utilizados na fase de produção do P(3HB).

Na fase de produção, dois meios quimicamente definidos foram estudados: meio mineral fosfatado F4 (meio de cultivo utilizado como controle) (OLIVERIA, 2010; MACAGNAN, et al., 2019); e MM (ATLIĆ et al., 2001), com a adição de 1,0 mL.L⁻¹ elementos traço composto por (em g L⁻¹): MgSO₄ 0,2, CaCl₂ 0,01, Na₂MoO₄ 0,005, ZnSO₄ 0,1, FeCl₃ 0,05), e com 1,0 mL.L⁻¹ de óleo de arroz. As composições básicas dos meios encontram-se na Tabela 1.

O cultivo foi realizado em agitador orbital (Certomat, BS1, Alemanha) a 36 °C, 200 rpm por 72 h. Amostras do caldo fermentado foram coletadas em 24, 48 e 72h, onde

em cada tempo realizou-se as análises de pH final, DO_{600nm} , MCS, consumo de açúcar e nitrogênio e acúmulo de P(3HB).

Tabela 1. Composição dos meios de cultivo, em g L⁻¹, utilizados na fase de crescimento celular e produção do P(3HB) por *B. megaterium* CN3.

Meio de cultivo	NYA**	YM**	F4**	MM**
Ácido cítrico	-	-	0,2	-
Citrato de sódio	-	-	4,0	-
Cloreto de cálcio	-	-	-	0,02
Extrato de levedura	1,0	2,7	-	-
Extrato de malte	-	2,7	-	-
Extrato de carne	3,0	-	-	-
Fosfato de potássio dibásico	-	-	-	-
Fosfato de potássio monobásico	-	-	-	1,5
Fosfato de sódio	-	-	-	4,5
Glicose*	5,0	10 a 50	-	-
Peptona	5,0	4,5	-	-
Sacarose*	-	15 a 45	40	40
Sulfato de amônia	-	-	-	1,5
Sulfato de magnésio	-	-	-	0,2
Ureia	-	-	3,0	-

*Concentração de glicose ou sacarose definidas conforme DCCR2², Tabelas 2 e 3, respectivamente.

** NYA: *Nutritive Yest Agar* (SCHAAD et al., 2001); YM: *Yest Malt* (JEANES, 1974); F4: Meio mineral F4 (OLIVEIRA, 2010); MM: Meio mineral MM (ATLIĆ et al., 2001).

b. Determinação do crescimento celular e acúmulo de P(3HB)

A densidade óptica (DO_{600nm}) dos caldos fermentados, indicativo do crescimento celular, foi determinada em espectrofotômetro (Biochrom®, Ultrospec10, Reino Unido).

A MCS e o acúmulo de P(3HB) foram determinados por gravimetria. Para cada amostra, 50 mL do caldo fermentado foi submetido à centrifugação ($10.000 \times g$ for 15 min) em centrífuga refrigerada (Eppendorf®, 5810-R, Alemanha). O sobrenadante foi utilizado para determinação do consumo total de açúcar (2.4) e de nitrogênio (2.5). As células frescas foram ressuspensas em solução salina a 0.89% (m/v) e centrifugadas

novamente. A MCS foi obtida através da secagem dos pellets a 56°C até que o peso constante fosse alcançado; os valores foram expressos em g L⁻¹ (MACAGNAN et al., 2017).

O acúmulo de P(3HB) foi determinado por extração química a partir da MCS, utilizando um método que recupera até 98% do polímero acumulado (MACAGNAN et al., 2017). Após a recuperação, o material foi seco em capela de exaustão para lenta evaporação e realizado o cálculo de rendimento, sendo os resultados expressos em porcentagem. A Eq. 1 foi usada para determinar o acúmulo.

$$\% P(3HB) = (P1 \div P2) \times 100 \quad (1)$$

onde P1 é o peso total do biopolímero recuperado e P2 é a MCS.

c. Determinação do consumo total de açúcares

A determinação da quantidade da fonte de carbono que foi consumida do meio de cultivo foi pelo método que utiliza o ácido dinitrossalicílico (DNS), adequado para açúcares redutores (MILLER, 1959). Amostras do caldo fermentado foram previamente hidrolisadas com 2 M de HCl e neutralizadas com 2 M de NaOH. Os sobrenadantes (obtidos conforme o item 2.3) foram diluídos para 1:40 ou 1:50 (v.v⁻¹), quando necessário. Os procedimentos foram realizados em tubos de ensaio com 1 mL de amostra adicionados de 1 mL do reagente DNS e aquecidos até 100°C por 5 min; após, foram transferidos para banho de gelo por 5 min, e 16 mL da solução de tartarato de sódio e potássio foi adicionada. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (HITACHI®, U-1800; Japão) a 540 nm. A curva analítica foi feita com glicose nas concentrações de 0 a 1,0 g L⁻¹. Os resultados foram expressos em g L⁻¹.

d. Determinação do consumo total de nitrogênio

A determinação do consumo de nitrogênio foi obtida pelo método de Ureia CE (Ref. 27), com kit comercializado pela Labtest®, Brasil, conforme instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em g L⁻¹.

3. Resultados e Discussão

3.1 Delineamento Composto Central Rotacional 2²

A Tabela 2 apresenta os resultados do crescimento celular (DO_{600nm}, pH, MCS, consumo de açúcar e nitrogênio) obtidos para o primeiro DCCR 2² com pH (5,7 e 7,3) e fonte de carbono sacarose (15 e 45 g L⁻¹) inicialmente.

Tabela 2. Matriz do planejamento experimental DCCR 2² usando sacarose. Níveis codificados e reais de pH e concentração de sacarose iniciais e valores das variáveis resposta obtidas na fase de crescimento celular de *B. megaterium* CN3 durante 24 h a 36°C com diferentes variações no meio de cultivo YM modificado.

Tratamentos	Variáveis independentes			Variáveis dependentes			
	pH inicial	[Sacarose] (g L ⁻¹)	pH final	DO _{600nm}	MCS (g L ⁻¹)	Consumo de açúcar (g L ⁻¹)	Consumo de nitrogênio (g L ⁻¹)
1	-1 (5,8)	-1 (15)	4,5	4,4	0,15	8,9	0,11
2	+ 1 (7,2)	-1 (15)	4,7	6,7	1,2	8,46	0,13
3	-1 (5,8)	+1 (45)	4,4	5,0	1,2	12,4	0,11
4	+1 (7,2)	+1 (45)	4,7	8,2	2,2	13,2	0,09
5	-1.41 (5,7)	0 (30)	4,5	5,4	0,9	11,5	0,10
6	+1.41 (7,3)	0 (30)	4,7	6,7	1,3	9,4	0,09
7	0 (6,5)	-1.41 (12,9)	4,7	3,6	1,0	8,5	0,11
8	0 (6,5)	+ 1.41 (47,1)	4,9	8,8	2,8	13,4	0,13
9	0 (6,5)	0 (30)	5,0	6,4	2,5	12,1	0,10
10	0 (6,5)	0 (30)	5,0	6,7	2,6	12,1	0,09
11	0 (6,5)	0 (30)	4,7	6,5	2,5	11,5	0,10

pH, potencial de hidrogênio; DO_{600nm}, densidade óptica em 600nm; MCS, massa celular seca.

De acordo com a Tabela 2, quando o pH inicial encontrava-se mais perto da neutralidade foram obtidos valores de DO_{600nm} mais elevados, sendo que os tratamentos 4 (+1, +1) e 8 (0, +1,41) tiveram as maiores absorvâncias, 8,2 e 8,8 abs, respectivamente. A MCS variou de 0,15 g L⁻¹, no tratamento 1 (-1,-1), a 2,8 g L⁻¹, no tratamento 8 (0, + 1.41). De modo geral, os níveis -1.41 e -1 de pH e/ou sacarose foram desfavoráveis à

MCS, e houve uma correlação direta entre DO_{600nm} e MCS. Pode-se observar que em todos os tratamentos houve uma redução do pH ao final do processo comparativamente ao pH inicial, com pequena variação entre os valores finais (4,4 a 5,0). O consumo de açúcar ao final das 24 h variou entre $8,46 \text{ g L}^{-1}$ (+1,-1) e $13,4 \text{ g L}^{-1}$ (0, +1,41), sendo favorecido por uma maior concentração inicial. Os maiores consumos de açúcar foram observados nos tratamentos que resultaram em maiores DO_{600nm} . O consumo de nitrogênio foi baixo, variando entre 0,09 g Le $0,13 \text{ g L}^{-1}$, sem aparente relação com as variáveis concentração de açúcar e pH iniciais.

Ao utilizarem o *Dry Sea Mix* da CSMRI® como um novo meio de crescimento para a produção de PHA por *B. megaterium* JK4h, isolado do oceano, Dhanghatiya et al. (2015), utilizando o DCCR 2³, obtiveram, em 24 h, uma produção de 55, 97 % otimizando as combinações de peptona ($0,3 \text{ g L}^{-1}$), extrato de levedura ($0,075 \text{ g L}^{-1}$ e glicose (3 g L^{-1}).

A concentração do substrato (sacarose) foi o fator determinante ($p \leq 0,05$) da DO_{600nm} , MCS e consumo de açúcar, influenciando positivamente essas respostas; apenas as variáveis dependentes pH final e consumo de nitrogênio não foram afetadas de forma significativa pelas variáveis de pH e concentração de sacarose iniciais, nem sua combinação, com base nos modelos linear e quadrático, não ultrapassando a linha de significância (Figura 1).

Em países como o Brasil, onde a cana-de-açúcar é abundante, a sacarose, o melaço e o açúcar invertido são substratos de baixo custo e sua utilização como fonte de carbono na produção de PHAs significa economia nos custos de produção. A produção de P(3HB) e copolímeros, integrada à produção de açúcar e álcool em usinas de processamento de cana-de-açúcar, pode representar uma grande oportunidade de produzir polímero a baixo

custo e expandir a indústria de cana (SQUIO e ARAGÃO, 2004), o que torna interessantes os resultados utilizando a sacarose como fonte de carbono na fase de multiplicação celular.

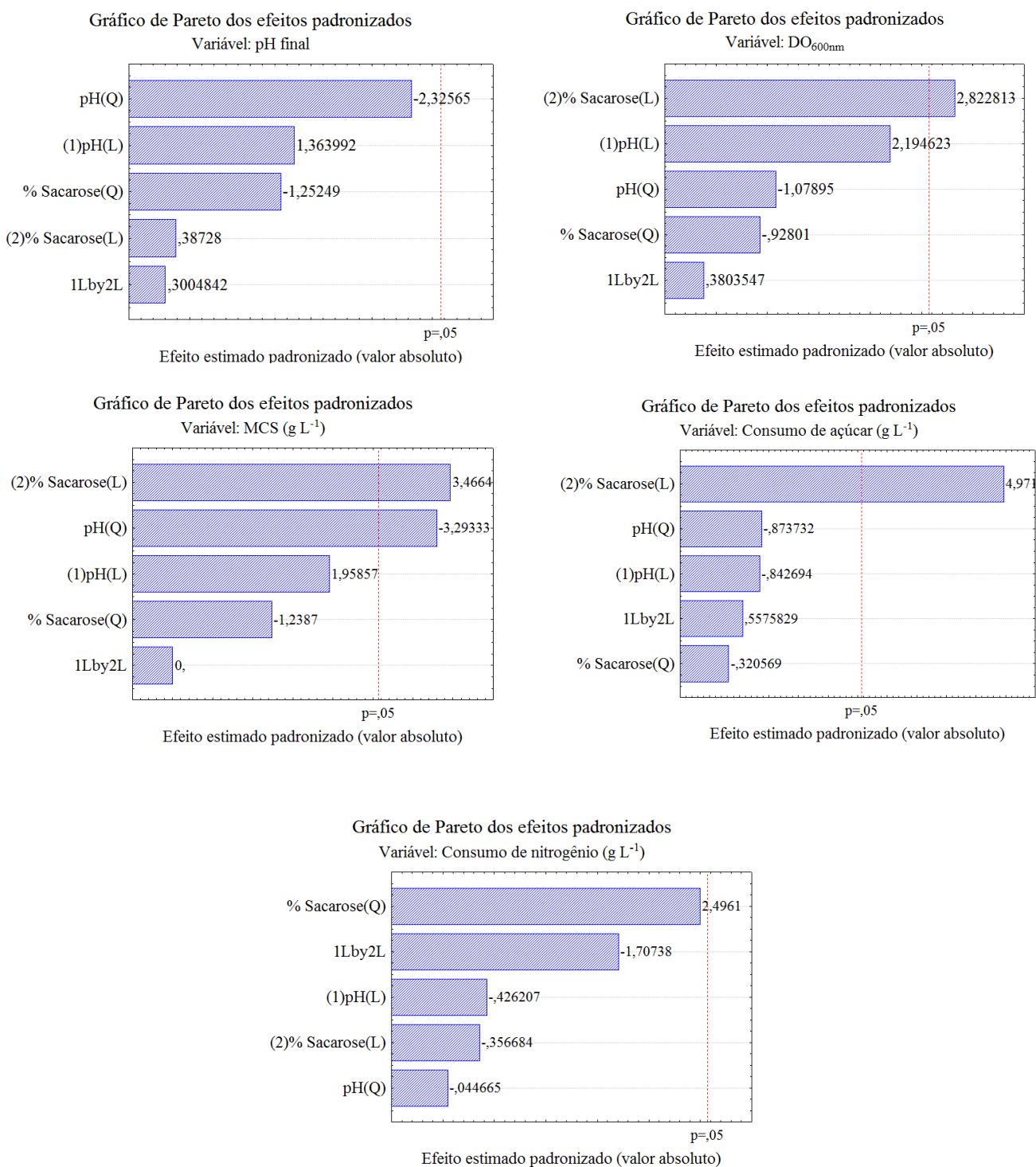


Figura 1. Gráfico de Pareto para pH final, DO_{600nm}, MCS, consumo de açúcar e nitrogênio em função das variáveis independentes pH e concentração de sacarose iniciais.

O Gráfico de Pareto é uma técnica utilizada para registrar e analisar informações que permitem a priorização da tomada de decisão. Sua utilização é muito interessante

porque sugere em quais erros, atividades ou recursos devem ser prioritariamente concentradas as ações de melhoria (BONDUELLE, 2007).

Na Tabela 3 podem ser vistos os resultados do crescimento celular (pH, DO_{600nm} , MCS, consumo de açúcar e nitrogênio) obtidos para o segundo DCCR 2², utilizando pH inicial entre 5,2 e 9,8 e glicose como fonte de carbono entre 10 e 50 g L⁻¹ inicialmente.

Tabela 3. Matriz do segundo planejamento experimental DCCR 2² usando glicose.

Níveis codificados e reais de pH e concentração de glicose iniciais e valores das variáveis resposta obtidas na fase de crescimento celular de *B. megaterium* CN3 durante 24 h a 36°C com diferentes variações do meio de cultivo YM modificado.

Tratamentos	Variáveis independentes			Variáveis dependentes			
	pH inicial	[Glicose] (g L ⁻¹)	pH final	DO _{600nm}	MCS (g L ⁻¹)	Consumo de açúcar (g L ⁻¹)	Consumo de nitrogênio (g L ⁻¹)
1	-1 (5,5)	-1 (10)	4,3	7,0	0,75	9,8	0,005
2	+1 (9,5)	-1 (10)	6,7	4,6	1,1	9,8	0,013
3	-1 (5,5)	+1 (50)	4,0	5,7	1,7	13,2	0,005
4	+1 (9,5)	+1 (50)	4,3	6,1	0,4	10,7	0,002
5	-1.41 (5,2)	0 (30)	4,3	2,1	0,4	10,0	0,004
6	+ 1.41 (9,8)	0 (30)	5,2	8,6	2,5	10,5	0,003
7	0 (7,5)	-1.41 (7,2)	4,7	4,7	0,9	6,0	0,006
8	0 (7,5)	+1.41 (52,8)	4,1	7,9	2,0	11,0	0,005
9	0 (7,5)	0 (30)	4,5	4,0	1,3	8,8	0,004
10	0 (7,5)	0 (30)	4,3	4,1	1,0	12,0	0,004
11	0 (7,5)	0 (30)	4,5	4,5	1,5	11,8	0,005

pH, potencial de hidrogênio; DO_{600nm}, densidade óptica em 600nm; MCS, massa celular seca

De acordo com a Tabela 3, a redução do pH final foi observada em todos os tratamentos. O consumo de açúcar ao final das 24 h variou entre 6 g L⁻¹ (0, -1,41) e 13,2 g L⁻¹ (-1,+1). O consumo de nitrogênio foi menor utilizando glicose como fonte de carbono, e variou de 0,002 g L⁻¹ (+1, +1) a 0,013 g L⁻¹ (+1, -1). Não constatou-se relação

entre o consumo de açúcar e nitrogênio e os indicadores de produção celular - DO_{600nm} e MCS. O tratamento 6, com as combinações (+1.41; 0), proporcionou os melhores resultados de DO_{600nm} (8,6 abs) e MCS ($2,5 \text{ g L}^{-1}$), seguido do tratamento 8. Esses resultados foram inferiores aos obtidos usando sacarose como fonte de carbono (Tabela 1).

Verifica-se na Figura 2 que quanto maior o pH inicial do meio, maior o pH resultante ao final do processo; enquanto que quanto maior a concentração de glicose, menor o pH final. As demais respostas não foram afetadas ($p \leq 0,05$) ou não puderam ser correlacionadas às condições do meio de cultivo estabelecidas em função do pH e concentração iniciais do substrato glicose.

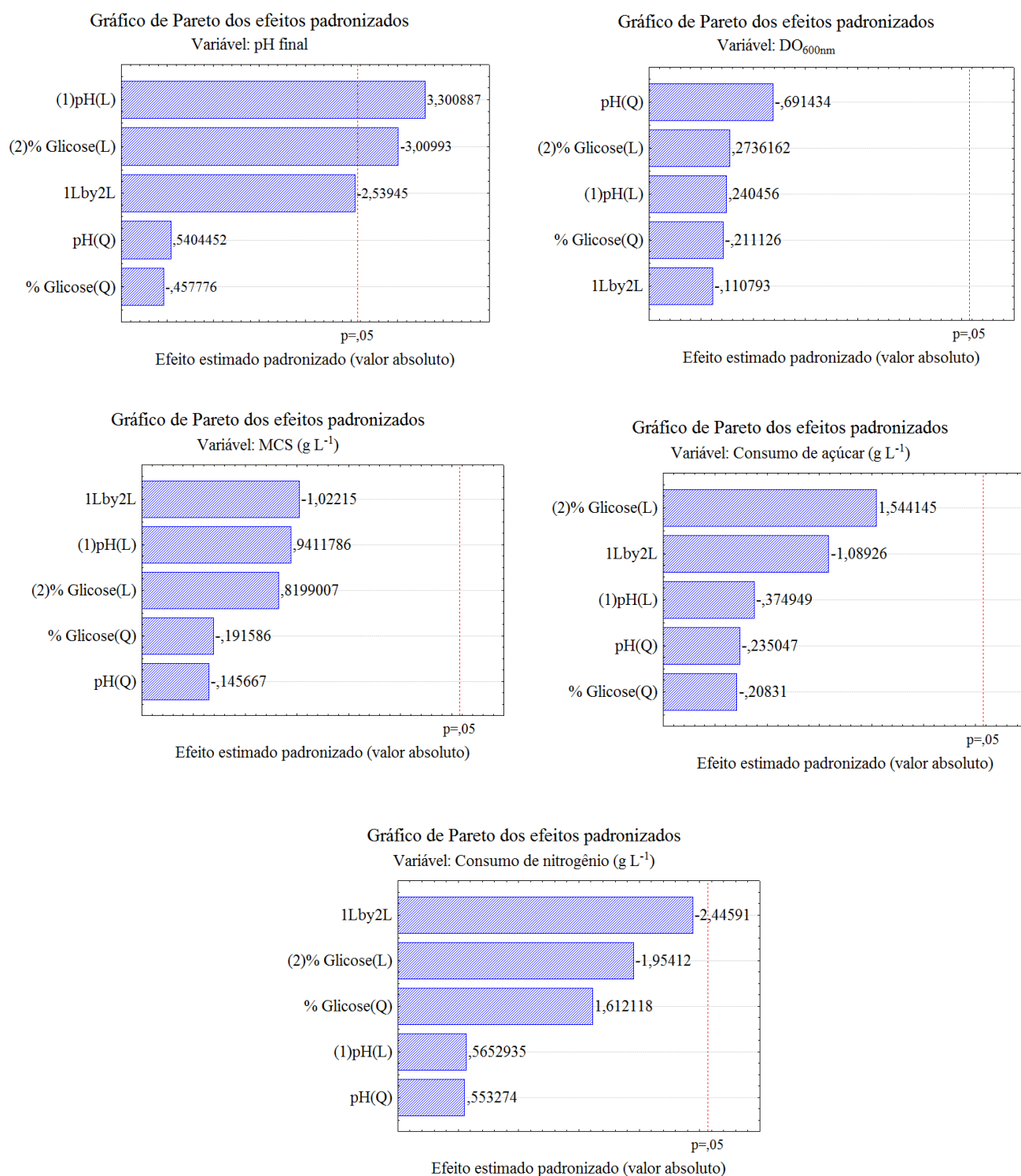


Figura 2. Gráfico de Pareto para pH final, DO_{600nm}, MCS, consumo de açúcar e nitrogênio em função das variáveis independentes pH e concentração de glicose iniciais.

a. Crescimento celular e acúmulo de polímero na fase de produção

A combinação sacarose 47,1 g L⁻¹ e pH 7,2 foi escolhida para a obtenção do inóculo utilizado na fase de produção de P(3HB) por *B. megaterium* CN3, pois resultou nos maiores resultados de DO_{600nm} (8,8 abs) e MCS (2,8 g L⁻¹).

Os meios minerais F4 (OLIVEIRA, 2010; MACAGNAN et al., 2019) e MM (ATLIĆ et al., 2001), ambos com pH inicial de 7, e que não possuem restrição de nutrientes essenciais foram os escolhidos para a fase de produção do biopolímero, já que o *B. megaterium* pertence ao grupo tipo I, que possui a característica de produzir o polímero quando em excesso de carbono e o seu crescimento é interrompido ou reduzido pela carência de nutrientes essenciais como N, P, Mg, K, S ou mesmo O (LEE, 1996, ALVES et al., 2017).

A Figura 3 apresenta os resultados de DO_{600nm} (A) e pH (B) nos caldos fermentados em diferentes tempos, na fase de acúmulo de P(3HB).

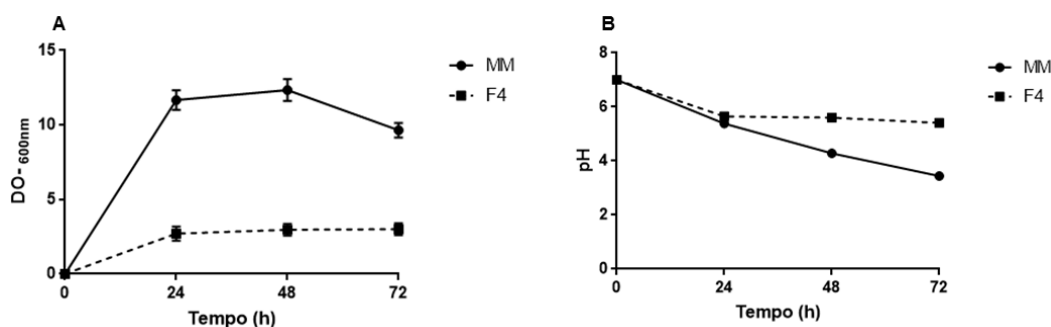


Figura 3. Densidade óptica (DO_{600nm}) (A) e pH (B) em 24, 48 e 72h nos meios de cultivo F4 e MM inoculados com células crescidas de *B. megaterium* CN3 na condição selecionada segundo o DCCR2² usando sacarose.

Em cultivos de microrganismos acumuladores de grânulos lipofílicos, como os produtores de P(3HB), a DO_{600nm} está diretamente relacionada ao crescimento celular e ao acúmulo de grânulos, sendo ambos desejáveis (ALVES et al., 2019). De acordo com

a Figura 3, a DO_{600nm} foi maior no meio MM, nos tempos 24h (11,68 abs) e 48h (12,34 abs), que não diferiram significativamente, havendo decréscimo em 72 h (9 abs). Com o meio F4, a DO_{600nm} manteve-se estável (3 abs) entre 24 e 72h, tendo como DO_{600nm} inicial de 0,5 abs. Sendo o nitrogênio um nutriente essencial à multiplicação celular, pode-se inferir que a ureia, fonte utilizada no meio F4, não foi adequada. Nem todas bactérias assimilam fontes orgânicas de nitrogênio. As fontes inorgânicas, como a utilizado no meio MM, por outro lado, são normalmente melhor utilizadas (BORMANN et al., 1988).

Em relação ao pH, em ambos os meios houve decréscimo mais acentuado até 24h; a partir desse momento observou-se comportamento diferenciado entre os meios. No meio F4 o valor permaneceu estável em aproximadamente 5,8 até o final, enquanto que no meio MM, o valor atingiu pH 4 ao final do processo.

A relação entre a DO_{600nm} e pH é importante porque os microrganismos apresentam respostas às mudanças externas (estresse) de parâmetros como temperatura, pH, pressão, força iônica e disponibilidade de oxigênio que podem levar a alterações resultando na síntese de diferentes metabólitos secundários, afetando o metabolismo celular, causando maior ou menor rendimento do produto desejado (FURUKAWA e OHSUYE, 1998; KAUFMANN et al., 1999; HU et al., 2006; COSTA e BADINO, 2012).

Valappil et al. (2007), avaliando o rendimento de bioprocessos com *Bacillus cereus* SPV cultivados em pH livre, afirmaram que a redução do pH no caldo para valores próximos a 5,0 inibe o consumo do polímero pelos microrganismos, o que, no presente estudo, pode ter influenciado no maior acúmulo do polímero no meio de cultivo MM.

A Figura 4 contém os resultados de MCS (g L^{-1}) (A) e P(3HB) (%) (B) na fase de produção ou acúmulo de P(3HB) usando os meios de cultivo F4 e MM.

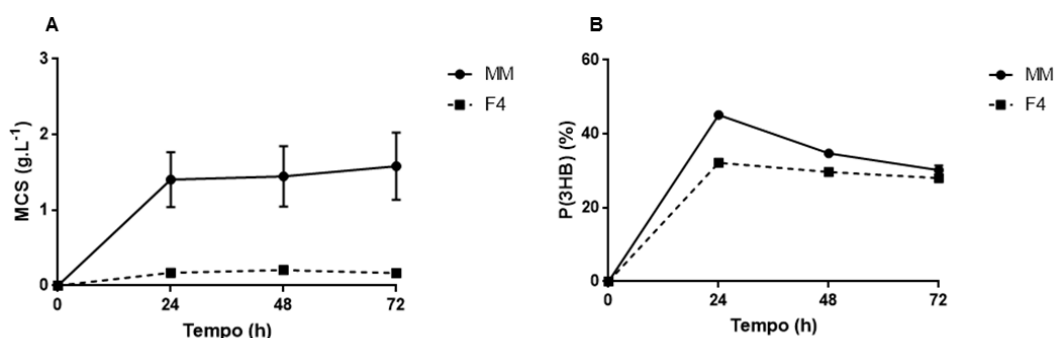


Figura 4. Massa celular seca (g L^{-1}) (A) a acúmulo de P(3HB) (%) (B) em 24, 48 e 72 h nos meios de cultivo F4 e MM inoculados com células crescidas de *B. megaterium* CN3 na condição selecionada segundo o DCCR2² usando sacarose.

Em relação à MCS, o meio de cultivo MM também resultou os maiores valores em todos os tempos de produção, variando de $1,36 \text{ g L}^{-1}$ em 24 h a $1,44 \text{ g L}^{-1}$ em 72h, contra $0,175 \text{ g L}^{-1}$ em 24h e $0,205 \text{ g L}^{-1}$ em 48 h no meio F4.

O P(3HB) é o principal representante de uma classe de poliésteres, os PHAs, que são acumulados intracelularmente em muitos microrganismos como grânulos lipofílicos para a reserva de energia, podendo chegar a até 80 % da massa celular seca (BYROM, 1987; MADISON e HUISMAN, 1999). O *B. megaterium* pode armazenar uma quantidade expressiva de grânulos de P(3HB), tendo sido reportado acúmulos de 20 % (MIRTHA et al., 1995); 46,2 % (GOUDA et al., 2001); 61,6% (KULPREECHA et al., 2009); 62,4 % e 59,1 % (NARANJO et al., 2013). No presente trabalho, o maior acúmulo de polímero foi observado no meio MM nas primeiras 24 h de produção, com 45,1% P(3HB) (Fig. 4).

A Figura 5 apresenta os resultados gerados pelo consumo de açúcar (g L^{-1}) (A) e de nitrogênio (g L^{-1}) (B) na fase de acúmulo de P(3HB) usando os meios de cultivo F4 e MM.

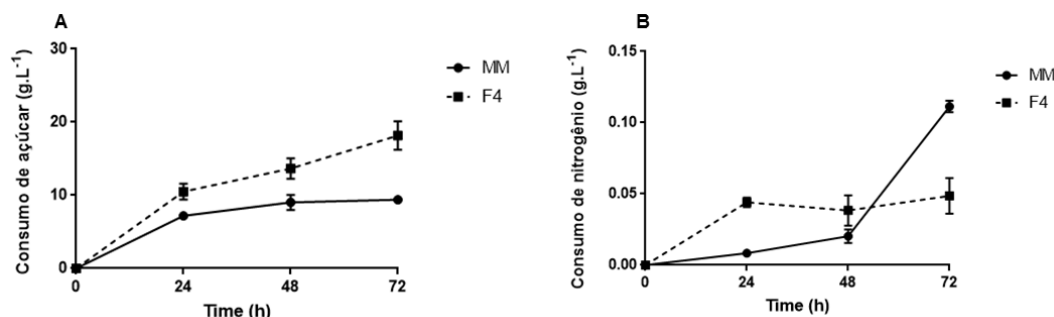


Figura 5. Consumo de açúcar (A) e de nitrogênio (g L^{-1}) (B) em 24, 48 e 72 h nos meios de cultivo F4 e MM inoculados com células crescidas de *B. megaterium* CN3 na condição selecionada segundo o DCCR2² usando sacarose.

O consumo de açúcar foi maior no cultivo do meio mineral F4, chegando a $18,5 \text{ g L}^{-1}$ em 72 h; em contrapartida, no meio MM, onde ocorreu as maiores produções celulares e de polímero, o consumo manteve-se estável em cerca de 9 g L^{-1} a partir de 48h. O consumo de nitrogênio teve valores e perfis bastante diferenciados em função do meio utilizado. Com o meio F4, o valor foi inicialmente maior mas praticamente se estabilizou em cerca de $0,05 \text{ g L}^{-1}$ a partir de 24 h, enquanto que com o meio MM, inicialmente menor em 24 h, continuou em elevação até o final, atingindo $0,111 \text{ g L}^{-1}$ em 72 h.

Borah e colaboradores (2002) estudaram a influência das condições nutricionais e do ambiente para o acúmulo de P(3HB) em *Bacillus mycoides* RLI B-017 e verificaram que a sacarose, extrato de carne e sulfato de amônio são elementos importantes para o crescimento celular e o acúmulo de polímero, obtendo rendimento de 69,4% do polímero em relação à MCS. No presente trabalho, apesar de ambos meios de produção testados utilizarem sacarose como fonte de carbono, também foi observado maiores crescimento

celular e acúmulo polimérico no meio MM, que utiliza sulfato de amônia como fonte de nitrogênio. O rendimento de P(3HB) foi 0,61 g L⁻¹.

Kulpreecha et al. (2009) avaliaram a fonte de carbono e nitrogênio para *B. megaterium* BA-019, tendo como resultados 1,96 g L⁻¹ de MCS e 28,57 % de P(3HB) (equivalentes a 0,56g L⁻¹) para a combinação de sacarose com sulfato de amônia, e 2,83 g L⁻¹ de MCS e 30,2 % de P(3HB) (equivalentes a 0,85 g L⁻¹) para sacarose e ureia, sendo observada a maior influência da fonte de nitrogênio para a MCS também no tempo de 24 h. Ao comparar esses resultados com os obtidos no presente estudo, pode-se notar que os rendimentos de P(3HB) foram semelhantes, mas as diferentes cepas de *B. megaterium* utilizadas tiveram, aparentemente, preferências distintas quanto à natureza da fonte de nitrogênio.

Singh et al. (2013) estudaram diferentes fontes de nitrogênio para a produção de P(3HB) por *Bacillus subtilis* NG220. Eles concluíram que a melhor fonte foi o sulfato de amônia, resultando em 5,29 g L⁻¹ de P(3HB) comparado com 5 g L⁻¹ para triptose e 4,93 g L⁻¹ com ureia. Esse resultado confere com o presente estudo, pois em ambos, a presença do sulfato de amônia proporcionou os melhores resultados.

Na fase de produção em agitador incubador orbital utilizando a água da parboilização do arroz (APA) ou o meio mineral F4 como meios de cultivos tanto em pH 6,0 ou 7,0, Rodrigues (2016) não observou acúmulo de P(3HB) pelo *B. megaterium* CN3 na APA, já em meio mineral F4, o acúmulo foi de aproximadamente 42 % (sacarose e pH 6,0) e 44 % (sacarose e pH 7,0) em 72 h de produção. Isso indica que a utilização do meio MM é mais eficaz no acúmulo do P(3HB), pois sua porcentagem de acúmulo foi maior.

4. Conclusão

Na fase de multiplicação celular, o meio de cultivo com a combinação sacarose 47,1 g L⁻¹ e pH 7,2 proporcionou os melhores resultados, DO_{600nm} (8,8 abs) e MCS (2,8 g L⁻¹). Já na fase de produção, o meio de cultivo MM, com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio se mostrou mais adequado à produção de P(3HB) por *B. megaterium* CN3 que o meio F4, usado como controle, pois favoreceu, em menor tempo (24 h), um acúmulo maior (45,1 %) de P(3HB).

5. Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

6. Referências

- ALVES, M. I.; MACAGNAN, K. L.; PIECHA, C. R.; TORRES, M. M.; PEREZ, I. A.; KERSSERLING, S. M.; RODRIGUES, R. da S.; OLIVERIA, P. D. de.; MOREIRA, A. da S.; Optimization of *Ralstonia solanacearum* cell growth using a central composite rotational design for the P(3HB) production: Effect of agitation and aeration. **PlosOne**, v. 14, n. 1, p. e0211211, 2019.
- ALVES, M. I.; MACAGNAN, K. L.; RODRIGUES, A. A.; ASSIS, D. A. de, TORRES, M. M.; de OLIVEIRA, P.D.; FURLAN, L.; VENDRUSCOLO, C.T.; MOREIRA, A da S. Poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB): Review of production process Techniques. **Industrial Biotechnology**, v.13, n. 4, p.192-208, 2017.
- ATLIĆ, A.; KOLLER, M.; SCHERZER, D.; KUTSCHERA, C.; GRILLO-9 FERNANDES, E.; HORVAT, P.; CHIELLINI, E.; BRAUNEGG, G. Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 295– 304, 2011.

BONDUELLE, G. **Qualidade total na gestão florestal. Material didático do curso de especialização à distância em gestão florestal.** Universidade Federal do Paraná, PECCA, Curitiba, p. 205, 2007.

BORAH, B.; THAKUR, P. S.; NIGAM, J.N. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-betahydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. **Journal of Applied Microbiology**, n. 92, p. 776–783, 2002.

BORMANN, E.J.; LEIBNER, M.; BEER, B. Growth-associated production of polyhydroxybutyric acid by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 84–88, 1998.

BRASIL. Decreto nº 92 de 07 de março de 2018. Dispõe sobre a obrigatoriedade da utilização de materiais biodegradáveis na composição de utensílios descartáveis destinados ao acondicionamento e ao manejo de alimentos prontos para o consumo. Disponível em: <<https://legis.senado.leg.br/sdleg-getter/documento?dm=7642998&ts=1548944486331&disposition=inline>>, acesso em 11/01/2019.

BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economies. **Trends in Biotechnology**, v. 5, p. 246-250, 1987.

CALIK, P.; YILGÖR, P.; AYHAN, P.; DEMIR, A. S. Oxygen transfer effects on 10 recombinant benzaldehyde lyase production. **Chemical Engineering Science**, v. 11 59, p. 5075–83, 2004.

CAMPOS, M. I.; FIGUEIREDO, T. V. B.; SOUSA, L. S.; DRUZIAN, J. I. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations. **Industrial crops and products**, v, 52, p. 338-346, 2014.

COSTA, C.L.L.; BADINO, A.C. Production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in batch cultures and with glycerol pulses under different temperature conditions. **Biochemistry Engineering of Journal**, v.69, p.1-7, 2012.

DHANGDHARIYA, J. H.; DUBEY S.; TRIVEDI, H.; PANCH, I.; BHATT, K. J.; DAVE, B. P.; MISHRA, S. Polyhydroxialkanoate from marine *Bacillus megaterium* using CSMCRI's dry sea mix as novel growth medium. **Internation Journal of Biological and Macromolecules**, v. 76, p. 254-261, 2015.

ELLNER, P. D. **Current Procedures in Clinical Bacteriology**. 1 ed. Springfield: Charles Thomas, p. 223, 1978.

FACCIN, D. J. L.; RECH, R.; SECCHI, A. R.; CARDOZO, N. S. M.; AYUB, M. A. Z.; Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 420–425, 2013.

FRANÇA. Decreto nº 2016-1170 de 30 de agosto de 2016. Dispõe sobre as modalidades de implementação da limitação de taças, copos e pratos descartáveis de plástico. Disponível em: <<https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2016/8/30/DEVP1604757D/jo/texte>>, acesso em 11/01/2019.

FULL, T.; JUNG, D.O.; MADIGAN, M. T. Production of poly- β -hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. **Letters in Applied Microbiology**, n. 43, p. 377-384, 2006.

FURUKAWA, K.; OHSUYE, K. Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C- terminal α - amidanting enzyme. **Cytotechnology**, v. 26, n. 2, p. 153-164, 1998.

GOUDA, M.K.; SWELLAM, A. E.; OMAR, S. H. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. **Microbiological Research**, n. 3, v. 156, p. 201-207, 2001.

HU, Z.C.; ZHENG, Y.G.; WANG, Z.; SHEN, Y.C. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.39, p.586-590, 2006.

JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides- New hydrocolloids of 19 interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, pp. 34-40, 1975.

KAUFMANN, H.; MAZUR, X.; FUSSENEGGER, M.; BAILEY, J.E. Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells, **Biotechnology Bioengineering**, v.63, p.573-579, 1999.

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

LEE, S. Y. Plastic bacteria?: Progress and prospect for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 147-149, 1996.

MACAGNAN, K. L.; ALVES, M. I.; PIECHA, C. R.; TORRES, M. M.; KESSERLINGH, S.M.; OLIVEIRA, P. D. de.; VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. da S. Production and Physiochemical Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate) Bioplastic by Brazilian Bacterium *Ralstonia solanacearum* Under Different Production Media and Saline Stress Conditions. **Industrial Biotechnology**, 2019.

MACAGNAN, K. L.; ALVES, M. I.; RODRIGUES, A. A.; FURLAN, L.; RODRIGUES, R. S. da.; OLIVEIRA, P. D. de.; VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S. da. Complete factorial design to adjust pH and sugar concentrations in the inoculum phase of

Ralstonia solanacearum to optimize P(3HB) production, **Plos One**, v. 12, p. e0180563, 2017.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W.; Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 21-53, 1999.

MANPREET, S.; SAWRAJ, S.; SACHIN, D.; PANKAJ, S.; BANERJEE, U.C. Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. **Malalaysian Journal of Microbiology**, v.1, n.2, p.1-9, 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing 3 sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.

MIRTHA, E.F.; LOPEZ, N. I.; MENDEZ, B. S.; FURST, U. P.; STEINBÜCHEL, A. Isolation and partial characterization of *Bacillus megaterium* mutants deficient in poly(3-hydroxybutyrate) synthesis. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 41, v. 1, p. 77–79, 1995.

NARANJO, J. M.; POSADA, J. A.; HIGUITA, J. C.; CARDONA, C. A. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. **Bioresource Technology**, v, 133, p. 38-44, 2013.

NATH, A.; DIXIT, M.; BANDIYA, A.; CHAVDA, S.; DESAI, A.J. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5749–5755, 33 2008.

OLIVEIRA, C. Produção de polihidroxibutirato: Bioprospecção de *Beijerinckia* sp. da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CDTec - UFPel. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas-UFPel-96f.-, Pelotas, 2010.

- RODRIGUES, A. A. Produção e caracterização de Poli(3-hidroxibutiratos) obtidos com o uso de efluente industrial e meio mineral por *Ralstonia solanacearum* RS e *Bacillus megaterium* CN3. **Tese** (Doutorado em Ciências). Programa de Pós- Graduação em Ciências. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas- RS, 155f., 2016.
- ROYA, I. Large-scale production and efficient recovery of P(3HB) with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. **Journal of Biotechnology**, v. 132, p. 251-258, 2007.
- SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. **APS Press**, p. 373, 2001.
- SINGH, G.; KUMARI, A.; ARPANA, M.; YADAV, A.; AGGARWAL, N. K. Poli β -hydroxybutyrate production by *Bacillus subtilis* NG220 using sugar industry waste water, **BioMed Research International**, p. 1-10, 2013.
- SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M. F. Cultivation strategies for production of the biodegradable plastics poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by bacteria. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 615-622, 2004.
- VALAPPIL, S.P.; MISRA, S.K.; BOCCACCINI, A.R.; KESHAVARZ, T.; BUCKE, C.;

13. Conclusão Geral

Uma das grandes importâncias do P(3HB) está no fato que pode ser utilizado na produção de muitos produtos, tendo um tempo de degradação de em média de 6 a 12 meses contra 40 a 50 anos ou até mesmo até 200 anos no caso de polímeros de fonte petroquímica, porém, apesar de apresentar a vantagem no âmbito ambiental, a produção desses biopolímeros é mais cara, limitando sua aplicação. Pesquisas continuam sendo realizadas para aprimorar os processos de produção, principalmente em relação os meios de cultivo, como uma tentativa de diminuir o preço da produção.

As bactérias nativas estudadas indicam a possibilidade de obter-se resultados satisfatórios de produção e acúmulo de p(3HB) mesmo sem modificações genéticas. E o DCCR pode ser considerado uma ferramenta de grande valia na adequação dos parâmetros operacionais e meios de cultivo utilizados nesses bioprocessos.

Para *R. solanacearum* RS, a utilização da metodologia de delineamento experimental DCCR 2² permitiu a maximização dos rendimentos de densidade óptica, massa celular seca e polímero na fase de crescimento celular (inóculo). Para maximizar o crescimento celular, a melhor combinação dos valores de aeração e agitação em biorreator é a de 1 vvm e 250 rpm, com a qual os melhores resultados (DO_{600nm} 18,04 abs e MCS 4,82 g L⁻¹) foram obtidos. Porém, aeração de 1,05 vvm e agitação de 200 rpm permite o maior rendimento polimérico (45,06 %) em 24h de cultivo. Os P(3HB) obtidos possuem características adequadas à utilização em produtos diferenciados, de maior valor agregado, como os da área médica. Devido ao acúmulo P(3HB) enquanto as células ainda estavam na fase de crescimento celular, o metabolismo da bactéria *R. solanacearum* RS deve ser classificado como tipo II em relação à fase de acumulação do bioplástico.

Para o *B. megaterium* CN3, a sacarose em concentrações mais elevadas (47,1 g L⁻¹) bem como um pH mais básico 7,2, fornece ao microrganismo as condições necessárias para o seu desenvolvimento e posterior produção do biopolímero. O meio de cultivo MM, com o sulfato de amônia como fonte de nitrogênio, é mais adequado, proporcionando acúmulo de 45,1 % em apenas 24 h de produção, o que torna o bioprocessos mais econômico.

14. Referências Bibliográficas

- ABIPLAST 2017. Disponível em: <<http://www.abiplast.org.br/>>, acesso em 01/11/2018.
- AGNELLI, J. A. M. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, n. 4, v. 9, 1996.
- AIBA, S.; OKABE, M.; OKADA, M. Modified complex method as applied to an optimization of aeration and agitation in fermentation. **Journal Fermentation Technology**, v. 51, n. 8; p. 594-605, 1973.
- ALVES, F.G.; FILHO, F. M.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. Maximization of β -galactosidase production: a simultaneous investigation of agitation and aeration effects. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 5, p. 1528–1539, 2010.
- ALVES, M. I.; MACAGNAN, K. L.; PIECHA, C. R.; TORRES, M. M.; PEREZ, I. A.; KERSSERLING, S. M.; RODRIGUES, R. da S.; OLIVERIA, P. D. de.; MOREIRA, A. da S.; Optimization of *Ralstonia solanacearum* cell growth using a central composite rotational design for the P(3HB) production: Effect of agitation and aeration. **PlosOne**, v. 14, n. 1, p. e0211211, 2019.
- ALVES, M.I.; MACAGNAN, K. L.; RODRIGUES, A. A.; ASSIS, D. A. de, TORRES, M. M.; de OLIVEIRA, P.D.; FURLAN, L.; VENDRUSCOLO, C.T.; MOREIRA, A da S. Poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB): Review of production process Techniques. **Industrial Biotechnology**, v.13, n. 4, p.192-208, 2017.
- AMASS, L.; BICKEL, W. K.; CREAN, J. P.; BLAKE, J.; HIGGINS, S. T. Alternate-day buprenorphine dosing is preferred to daily dosing by opioid-dependent humans. **Psychopharmacology**, v. 3, n. 136, p. 217-225. 1998.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**, v. 4, n. 54, p. 450-472, 1990.
- ANDRIETTA, S. R. **Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação alcoólica contínua em escala industrial**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP-178f.-, Campinas/ SP, 1994.
- ASRAR, J.; HILL, J. C. Biosynthetic processes for linear polymers. **Journal of Applied Polymer Science** v. 3, n. 83, p. 457-483, 2002.

- ATLIĆ, A.; KOLLER, M.; SCHERZER, D.; KUTSCHERA, C.; GRILLO-FERNANDES, E.; HORVAT, P.; CHIELLINI, E.; BRAUNEGG, G. Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2011;91: 295–304.
- AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviour. **Carbohydrate Polymer**, v. 2, n.56, p. 111-122, 2004.
- BABEL, W.; ACKERMANN, J. U.; BREUER, U.; STEINBÜCHEL A. Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB) Biopolyesters. *Advances Biochemistry Engineering/ Biotechnology*, n. 71, p. 125-157, 2001.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering**. New York: McGraw Hill, p. 984, 1986.
- BARBA, A. J.; PORCAR, V. B.; MINGARRO, C. F.; TEM, F. J. G.; GINÉS, F.; VILCHES, E. J. S.; SOLANA, V. S. **Materias primas para La fabricación de soportes de baldosas cerâmicas**. Castellón. Instituto de Tecnología Cerámica – AICE, 1997.
- BARBOSA, M.; ESPINOSA, H.A, MALAGÓN, R.D.; MORENO, S. N. Produção de Poli-b-hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC17697. **Universe of Science**, v.1, n.10, p. 45-54, 2005.
- BARROS, N. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos, Campinas: Ed.UNICAMP. 1995.
- BARROS, N. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, Campinas: Emd. UNICAMP. 2001.
- BASTOS, R. G. **Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos**. São Carlos, EdUFSCar, p. 162, 2010.
- BENGTSSON, S.; PISCO, A. R.; REIS, M. A. M.; LEMOS, P. C. Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugarcane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms. **Journal of Biotechnology**, v. 145, p. 253–263, 2010.
- BLOEMBERGEN, S.; HOLDEN, D. A.; BLUHM, T. L.; HAMER, G. K.; MARCHESSAULT, R. H. Stereoregularity in synthetic β - hydroxybutirate and β -

hydroxyvalerate homopolyesters. **Macromolecules**, v.4, n. 22, p.1656-1663, 1989.

BONDUELLE, G. **Qualidade total na gestão florestal. Material didático do curso de especialização à distância em gestão florestal**. Universidade Federal do Paraná, PECCA, Curitiba, p. 205, 2007.

BORGES, C. D.; MOREIRA, A. N.; MOREIRA, A. S.; DEL PINO, F. A. B.; VENDRUSCOLO, C. T. Caracterização de biopolímeros produzidos por *Beijerinckia* sp. 7070 em diferentes tempos de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 24, v. 3, p. 327-332, 2004.

BORAH, B.; THAKUR, P. S.; NIGAM, J.N. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-betahydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. **Journal of Applied Microbiology**, n. 92, p. 776–783, 2002

BORMANN, E. J.; LEIBNER, M.; BEER, B. Growth-associated production of polyhydroxybutyric acid by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 1, n.49, p. 84-88, 1998.

BORZANI, W. **Fermentação semicontínua**. In: Biotecnologia Industrial, Editora Edgard Blücher Ltda, vol. 2, São Paulo, 2001.

BOZA, Y.; NETO, L. P.; COSTA, F. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Exopolysacharide production by encapsulad *Beijerinckia* cultures. **Process Biochemistry**, v. 39, p.1201-1209, 2004.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, n. 65, p. 127-161, 1998.

BRASIL. BNDES. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. Disponível em:

<http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3804.pdf>, acesso em 18/1/2018.

BRASIL. Decreto nº 92 de 07 de março de 2018. Dispõe sobre a obrigatoriedade da utilização de materiais biodegradáveis na composição de utensílios descartáveis destinados ao acondicionamento e ao manejo de alimentos prontos para o consumo. Disponível em: <<https://legis.senado.leg.br/sdleg-getter/documento?dm=7642998&ts=1548944486331&disposition=inline>>, acesso em 11/01/2019.

BRITO, G.F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, n. 2, p.127-139, 2011.

BURKERT, J. F. M.; MALDONADO, R. R.; FILHO, F. M.; SILVA-SANTISTEBAN, M. I. R. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 61–67, 2005.

BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economies. **Trends in Biotechnology**, v. 5, p. 246-250, 1987.

CALIK, P.; YILGÖR, P.; AYHAN, P.; DEMIR, A. S. Oxygen transfer effects on recombinantbenzaldehyde lyase production. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 5075–83,2004.

CALVÃO, P. S. **Obtenção e caracterização de misturas do polímero degradável P[3HB] e seu copolímero P[3HB-co-3HV] com elastômeros**. Tese (Doutorado em Engenharia). Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo-150f-, São Paulo, 2009.

CAMPOS, M. I.; FIGUEIREDO, T. V. B.; SOUSA, L. S.; DRUZIAN, J. I. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations. **Industrial crops and products**, v, 52, p. 338-346, 2014.

CANTO, E. L. do. **Plástico: Bem supérfluo ou mal necessário?** 8. ed. Moderna, São Paulo, 2001.

CARRADINI, E.; MARCONCINI, J. M.; AGNELLI J. A. M.; MATTOSO, L. H. C. Thermoplastic blends of corn gluten meal/ strach (CGm/ Starch) and corn gluten meal/ polyvinyl alcohol and corn gluten meal/ poly (hydroxybutyrate- co- hydroxyvalerate) (CGM/PHB-V). **Carbohydrate Polymers**, v.2, n. 83, p. 959-965, 2011.

CARMIGNAN, F. **Desenvolvimento de microesferas de ibuprofeno a partir dos biopolímeros polihidroxialcanoatos. Estudo da influência das características físico-químicas das microesferas sobre o perfil de liberação do fármaco e degradação das partículas**. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Programa de Pós-Graduação em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC- 151f.-, Santa Catarina, 2006.

- CARVALHO, J. C. M de; SATO, S. **Fermentação descontínua**. In: Biotecnologia Industrial, Editora Edgard Blücher Ltda, vol. 2, São Paulo, 2001.
- CASTRO, F. P.; CUNHA, T. M.; BARRETO, P. L. M.; AMBONI, R. D. de M. C.; PRUDÊNCIO, E. S. Effect of oligofructose incorporation on the properties of fermented probiotic lactic beverages. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, p. 68-74, 2008.
- CAVALHEIRO, J. M. B. T.; de ALMEIDA, M. C. M. D.; GRANDFELS, C.; da FONSECA, M.M.R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 509–515, 2009.
- CHAKRABORTY, P.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; GIBBONS W. PHA productivity and yield of *Ralstonia eutropha* when intermittently or continuously fed a mixture of short chain fatty acids. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1110-7243, 2012.
- CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.110, p. 621-632, 2010.
- CHEN, G. Q. **Production and Application of Microbial Polyhydroxyalkanoates**. In: Chiellini E, Solaro R. Biodegradable Polymers and Plastics. London: Springer. p. 155-166, 2003.
- COLBORN, T. How research has succeeded and failed to translate science into policy: endocrinological effects on wildlife. **Environ Health Perspect.**, v.103 p.81-5, 1995.
- CONNELL, D. W. **Basic concepts of environmental chemistry**. Boca Raton: Lewis, 1997.
- COSTA, C.L.L.; BADINO, A.C. Production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in batch cultures and with glycerol pulses under different temperature conditions. **Biochemistry Engineering of Journal**, v.69, p.1-7, 2012.
- CROCHEMORE, A. G.; MATTOS, M. L. T.; VENDRUSCOLO, C. T.; CASTRO, L. A. S.; MOREIRA, A. S. Identification of pesticide-degrading *Pseudomonas* strains as poly- β -hydroxybutyrate producers. **African Journal of Biotechnology**. v. 11, n. 85, p. 15144-15149, 2012.
- DALCANTON, F.; IENCZAK, J. L.; FIORESE, M. L.; ARAGÃO, G. M. F. Produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* em meio hidrolisado de amido

de arroz com suplementação de óleo de soja em diferentes temperaturas. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 552-556, 2010.

DAWES, E. A.; SENIOR, P. J. The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in micro-organisms. **Advances Microbiology and Physiology**, v. 10, p. 135-266, 1973.

DHANGDHARIYA, J. H.; DUBEY S.; TRIVEDI, H.; PANCH, I.; BHATT, K. J.; DAVE, B. P.; MISHRA, S. Polyhydroxialkanoate from marine *Bacillus megaterium* using CSMCRI's dry sea mix as novel growth medium **International Journal of Biological and Macromolecules**, v. 76, p. 254-261, 2015.

DOES, A. L.; BISSON, L. F. Comparison of glucose uptake kinetics in different yeasts. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 3, p. 1303-1308, 1989.

DOI, Y. M.; KITAMURA, S.; ABE, H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyhexanoate). **Macromolecules**, v.14, n. 28, p. 4822-4828, 1995.

DUDMAN, W. F. Growth and extracellular polysaccharide production by *Rhizobium meliloti* in defined medium. **Journal of Bacteriology**, v. 88, n. 3, p. 640-645, 1964.

ELLNER, P. D. **Current Procedures in Clinical Bacteriology**. 1 ed. Springfield: Charles Thomas, p. 223, 1978.

EL-SAYED, A. A.; ABDELHADY, H. M.; HAFEZ, A. M. A.; KHODAIR, T. A. Batch Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Ralstonia Eutropha* and *Alcaligenes Latus* Using Bioreactor Different Culture Strategies. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 5, n. 5, p. 556-564, 2009.

EUZÉBY, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>>. Acesso em: 19/10/2017.

FACCIN, D. J. L. **Avaliação de condições de cultivo para aumento de produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* e modelagem do bioprocesso**. Tese (Doutorado em Engenharia). Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, - 160f-Porto Alegre, 2012.

FACCIN, D. J. L.; RECH, R.; SECCHI, A. R.; CARDOZO, N. S. M.; AYUB, M. A. Z.; Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-

hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 420–425, 2013.

FERREIRA, E. **Contribuição para o estudo da otimização da fermentação alcoólica operando em batelada-alimentada**. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, Campinas/ SP, 2005.

FRANCHETTI, S. M.; MARCONATO, J. C. Biodegradable polymers - A partial way for decreasing the amount of plastic waste. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

FRANÇA. Decreto nº 2016-1170 de 30 de agosto de 2016. Dispõe sobre as modalidades de implementação da limitação de taças, copos e pratos descartáveis de plástico. Disponível em: <<https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2016/8/30/DEVP1604757D/jo/texte>>, acesso em 11/01/2019.

FULL, T. D.; JUNG D. O.; MADIGAN, M. T. Production of poly--hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. **Letters Applied Microbiology**, v. 43, p. 377–84, 2006.

FURUKAWA, K.; OHSUYE, K. Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C- terminal α - amidanting enzyme. **Cytotechnology**, v. 26, n. 2, p. 153-164, 1998.

GANCEDO, J. M. Carbon catabolite repression in yeast. **Europe Journal of Biochemistry**, v. 206, p. 297-313, 1992.

GANDHI, H. P.; RAY, R. M.; PATEL, R. M. Exopolymer production by *Bacillus* species. **Carbohydrate Polymer**, v.34, p.323-327, 1997.

GARCIA, M. C. F. **Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* e seu efeito sobre as características do polímero**.Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC- 161f.-, Santa Catarina, 2006.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E.; SANTOS, V. E. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. **Enzyme Microbiol Technology**, v. 27, p. 680–90, 2000.

GEYER, R.; JAMBECK, J.R.; LAW, K.L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, 2017; (3) e1700782.

GOPFERICH, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. **Biomaterials**, v. 17, p. 103-114, 1996.

GOMEZ, J. G. C.; FONTOLAN, V.; ALLI, R. C. P.; RODRIGUES, M. F.A.; BUENO NETTO, C. L.; SILVA, L. F.; SIMÕES, D. A. Production of P3HB-co-3HV by soil isolated bacteria able to use sucrose. **Reviews Microbiology**, v.1, n. 28, p. 43-48, 1997.

GOUDA, M.K.; SWELLAM, A. E.; OMAR, S. H. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. **Microbiological Research**, n. 3, v. 156, p. 201-207, 2001.

GRAEBLING, D.; MULLER, R.; PALIERNE, J. F. Linear viscoelasticity of incompatible polymer blends in the melt relation with interfacial properties. **American Journal Physical Anthropology**, v. 7, n. 3, p. 15-25, 1993.

GRIGULL, V. H.; SILVA, D. D.; GARCIA, M. C. F.; FURLAN, S. A.; PEZZIN, A. P.T.; SCHENEIDER, A. L. S.; AGRAGÃO, G. F. Production of Poly(3-hydroxybutyrate) from oleic acid by *Ralstonia eutropha*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 2, p. 223-228, 2008.

GROTHER, E.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Fermentation optimization for the production of poly(b-hydroxybutyrate acid) microbial thermoplastic. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 132-141, 1999.

GURIEFF, N.; LANT, P. Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3393–3403, 2007.

HAFUKA, A.; SAKAIDA, K.; SATOH, H.; TAKAHASHI, M.; WATANABE, Y.; OKABE, S. Effect of feeding regimes on polyhydroxybutyrate production from food wastes by *Cupriavidus necator*. **Bioresource Technology**, v. 3, n. 102, p. 3551-3553, 2001.

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

HOLMES, P. A. **Biologically produced (R)-3-hidroxyalcanoate polymers and copolymers**. In: Developments in Cristalline Polymers-2 (edited by D. C. Basset): Elsevier Applied Science Publishers LTD, 1998.

HU, Z.C.; ZHENG, Y.G.; WANG, Z.; SHEN, Y.C. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.39, p.586-590, 2006.

IBRAHIM, M. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high- cell- density fed- batch , fermentation and simplified solvent extraction. **Applied Environmetal Microbiology**, v. 19, n. 75, p. 6222-6231, 2009.

IMEBI. Instituto de Medicina Biomolecular. Disponível em: <<http://www.imebi.com.br/hormonio.php>>. Acesso em: 18/2/2018.

JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides- New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, pp. 34-40, 1975.

JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H. G. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. **Appl Microbiology Biotchenology**, n. 46, p. 451-463, 1996.

JIANG, Y.; SONG, X.; GONG, L.; LI, P.; DAI, C.; SHAO, W. High poly(β -hydroxybutyrate) production by *Pseudomonas fluorescens* A2a5 from inexpensive substrates. **Enzyme Microbial Technology**, v. 2, n. 42, p. 167-17, 2008.

KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 6, p.539–550, 2000.

KANJANACHUMPOL, P.; KULPREECHA, S.; TOLIENG, V.; THONGCHYUL, N. Enhacing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 6, n. 10, p. 1463-1467, 2013.

KAUFMANN, H.; MAZUR, X.; FUSSENEGGER, M.; BAILEY, J.E. Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells, **Biotechnology Bioengineering**, v.63, p.573-579, 1999.

KEMAGONGSE, K.; PRASERTAN, P.; UAPICHIT, A.; MATHACANON P. Poly- β -hydroxyalkanote production by halotolerant *Rhodobacter sphaeroides* U7. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2073-2085, 2008.

KESSLER, B.; WEUSTHUIS, R.; WITHOLT, B.; EGGINK, G. Production of Microbial Polyesters: Fermentation and Downstream Process. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**, v. 71, p. 159-182, 2001.

- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A.K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607-619, 2005.
- KHURI, A. I.; CORNELL, J. A. Response surface: design and analyses. New York: Marcel Dekker Inc. 1996.
- KIM, B. S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 27, p. 774–777, 2000.
- KIM, B. S.; CHANG, H. N. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*. **Biotechnology Letters**, v. 2, n. 20, p. 109-112, 1998.
- KIM, S. W.; KIM, P.; LEE, H. S.; KIM, J. H. High production of poly- beta-hydroxybutyrate (P3HB) from *Methylobacterium organophilum* under potassium limitation. **Biotechnology Letters**, v. 1, n. 18, p.25-30, 1996.
- KOLLER, M.; BONA, R.; CHIELLINI, E.; FERNANDES, E. G.; HORVAT, P.; KUTSCHERA, C.; HESSE, P.; BRAUNEGG, G. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. **Bioresource Technology**, v. 11, n. 99, p. 4854-1046, 2008.
- KULPREETCHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N.; Inexpensive fed-batch cultivation for high for poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 3, p. 240-245, 2009.
- KUNASUNDARI, B.; SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Express Polymer Letters**, v. 5, n. 7, p. 620–634, 2011.
- LAW, K. H.; CHENG, Y. C.; LEUNG, Y. C.; LO, W.H.; CHUA, H.; YU, H.F. Construction of recombinant *Bacillus subtilis* strains for polyhydroxyalkanoates synthesis. **Biochemical Engineering Journal**, v.16, p. 203-208, 2003.
- LEE, S. Y.; CHOI, J. L. Production and degradation of polyhydroxyalkanoate in waste environment. **Waste Management**, v. 19, p. 133-139, 1999.
- LEE, J.; LEE, S. Y.; PARK, S.; MIDDELBERG, A. P. J. Control of fed- batch fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 29-48, 1999.
- LEE, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 1-14, 1996
- LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 1-14, 1996a.
- LEE, S. Y. Plastic bacteria?: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends Biotechnology**, v. 11, n. 14, p. 431-438, 1996b;

- LEE, S. Y. Poly(3-hydroxybutyrate) extrusion by cells of recombinant *Escherichia coli*. **Journal Microbiology Biotechnology**, v.2, n. 6, p. 147-149, 1996c.
- LEE, S. Y.; CHOI, J.; WONG, H. H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: *minireview*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.1-3, n. 25, p. 31-36, 1999.
- LEE, W. H.; LOO, C. Y.; NOMURA, C. T.; SUDESH, K. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6844–6851, 2008.
- LILLY, M. D. **Production of intracellular Microbial Enzymes**. In: Lemuel B. Wingard, Ichiro Chibata eds. Applied Biochemistry and Bioengineering. New York: Academic Press, v. 2, 1979.
- LOPES, L.; ANDRADE, C. T. Polímeros de origem microbiana: polissacarídeos bacterianos. **Revista de Química Industrial**. Rio de Janeiro, v. 703, p. 19-23, 1995.
- LÓPEZ, J.; NARANJO, J.; HIGUITA, J.; CUBITTO, M.; CARDONA, C.; VILLAR, M. Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 2, p. 250-258, 2012.
- LU, J. N.; TAPPEL, R. C.; NOMURA, C. T. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). **Polymer Reviews**. v.49, n. 3. p. 226-248, 2009.
- LUCAS, E. F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Ed.: e-papers. Rio de Janeiro/ RJ, 2001.
- LUENGO, J. M.; GARCÍA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARROY, G.; OLIVEIRA, E. R. Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 251–260, 2003.
- LUVIZETTO, D. J. **Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero Poli(3-hidroxibutirato) e modelagem matemática do bioprocesso**. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS-119f.-, Porto Alegre, 2007.
- MACAGNAN, K. L.; ALVES, M. I.; PIECHA, C. R.; TORRES, M. M.; KESSERLINGH, S.M.; OLIVEIRA, P. D. de.; VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA,

A. da S. Production and Physiochemical Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate) Bioplastic by Brazilian Bacterium *Ralstonia solanacearum* Under Different Production Media and Saline Stress Conditions. **Industrial Biotechnology**, 2019.

MACAGNAN, K. L.; ALVES, M. I.; RODRIGUES, A. A.; FURLAN, L.; RODRIGUES, R. S. da.; OLIVEIRA, P. D. de.; VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S. da. Complete factorial design to adjust pH and sugar concentrations in the inoculum phase of *Ralstonia solanacearum* to optimize P(3HB) production, **Plos One**, v. 12, p. e0180563, 2017.

MACAGNAN, K. L., RODRIGUES, A. A.; ALVES, M. I., FURLAN, L., KESSERLINGH, S. M., MOURA, A. B., OLIVEIRA, P. D., MCBRIDE, A. J. A., MOREIRA, A. S. and VENDRUSCOLO, C. T. Simplified recovery process of *Ralstonia solanacearum*-synthesized polyhydroxyalkanoates via chemical extraction complemented by liquid-liquid phase separation. **Química Nova**, v. 40, n. 2, p. 125-130, 2017

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W.; Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 21-53, 1999.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a polímeros**. 2ªEd. Edgar Blücher Ltda. São Paulo, 1999.

MANPREET, S.; SAWRAJ, S.; SACHIN, D.; PANKAJ, S.; BANERJEE, U.C. Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. **Malaysian Journal of Microbiology**, v.1, n.2, p.1-9, 2005.

MARTIN, D. P.; WILLIAMS, S. F.; Medical applications of 4-polyhydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 2, p. 97-105, 2003.

MARTÍNEZ, J.; RODRÍGUEZ, M.; FERNÁNDEZ, A. L.; VILLAVERDE, M. J.; LÓPEZ, A.; MARÍN, D.; NÚÑEZ, R.; GALEGO, N.; CARBALLO, E. M. **Producción de polihidroxialcanoatos em bacterias diazotrofas**. I. Influencia de la aeración em la síntesis de poli B hidroxibutirato em *Azospirillum brasilense* Cepa 7. *R Biol* 2004; (18): 87-95.

MEHAN, V. K.; LIAO, B. S.; TAN, Y. J.; ROBINSON-SMITH, A.; McDONALD, D.; HAYWARD, A. C. Bacterial wilt of Groundnut. Patancheru: Internacional Crops

Research Institute for the Semi-Arid Tropics. **Information Bulletin**. 35. p. 28, 1994.

MENDONÇA, L. A. Desempenho do delineamento compost central em experimentos com alto coeficiente de variação. **Dissertação** (*Magister Scientiae*). Programa de Pós- Graduação em Estatística Aplicada e Biometria, Universidade Federal de Viçosa- Minas Gerais/ MG, 2012.

MERRICK, J. M.; STEGER, R.; DOMBROSKI, D. Hydrolysis of native poly(polyhydroxybutyrate) granules (PHB), crystalline PHB and artificial amorphous PHB granules by intracellular and extracellular depolymerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 25, p. 129-134, 1999.

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

MIRTHA, E.F.; LOPEZ, N. I.; MENDEZ, B. S.; FURST, U. P.; STEINBÜCHEL, A. Isolation and partial characterization of *Bacillus megaterium* mutants deficient in poly(3-hydroxybutyrate) synthesis. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 41, v. 1, p. 77–79, 1995.

MONTORO, S. R.; SHIGUE, C.Y.; SORDI, M. L. T.; SANTOS, A. M.; RÉ, M. I. Estudo Cinético da Redução da Massa Molar do Poli (3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxivalerato) (PHBHV). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 19-24, 2010.

MOZUMDER, M. S.I.; GARCIA-GONZALEZ, L.; DE WEVER, H.; VOLCKE, E. I.P. Effect of sodium accumulation on heterotrophic growth and polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator*. **Bioresource Technology**, v.191, p. 213–218, 2015.

MOTHES, C.; SCHNORPFEIL, C.; ACKERMANN, J. U. Production of P3HB from crude glycerol. **Engineering in Life Science**, n. 7, p. 475-479, 2007.

MUCELIN, C. A.; BELLINI, M. Lixo e impactos ambientais perceptíveis no ecossistema urbano. **Sociedade & Natureza**, v. 20; n. 1, p. 111-124, 2008.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. New York: John Wiley & Sons, p. 700, 1995.

NATIONAL GEOGRAPHIC, A Whopping 91% of Plastic isn't Recycled, disponível em: <https://news.nationalgeographic.com/2017/07/plastic-produced-recycling-waste-ocean-trash-debris-environment/>, acesso em 30/10/2017.

NARANJO, J. M.; POSADA, J. A.; HIGUITA, J. C.; CARDONA, C. A. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. **Bioresource Technolog**, v, 133, p. 38-44, 2013.

NATH, A.; DIXIT, M.; BANDIYA, A.; CHAVDA, S.; DESAI, A.J. Enhanced PHBproduction and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5749–5755, 2008.

NEVES, L. C. M. das. Obtenção da Enzima Glicose- 6- Fosfato Desidrogenase utilizando *Saccharomyces crevisiae* W303-181. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós- Graduação em Tecnologia Bioquímico- Farmacêutico) Universidade de São Paulo/ USP- SP. 206p. 2003.

NG, K. S.; OOI, W. Y.; GOH, L. K.; SHENBAGARATHAI, R.; SUDESH, K. Evaluation of jatropha oil to produce poly(3-hydroxybutyrate) single crystal revealed by use of mutant of polyhydroxybutyrate depolymerase. **Biomacromolecules**, n. 3, p.312-317, 2010.

NODA, I.; SATKOWSKI, M. M.; DOWREY, A. E.; MARCOTT, C. Polymer Alloys of Nodax Copolymers and Poly(lactic acid). **Macromolecular Bioscience**, v. 3, n. 4, p. 269-275, 2004.

NONATO, R. V.; MANTELATO, P. E.; ROSSELL, C. E. V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Applied Microbiology Biotechnhology**, v. 57, n. 9, p. 1-5, 2001.

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

OKABE, E.; NAKAJIMA, M.; MUROOKA, H.; ISIZAWA, K. Investigation of carbon and phosphorus sources in cultural media of a selected strain of alginate-producing *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Fermentation Tecnology**, v. 59, n. 1, p.1-7, 1981.

OLIVEIRA, C. Produção de polihidroxibutirato: Bioprospecção de *Beijerinckia* sp. da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CDTec - UFPel. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas-UFPel-96f.-, Pelotas, 2010

PADILHA, F. F. **Estudo da compartimentalização das enzimas para a produção de biopolímeros por *Beijerinckia* sp. 7070**. Dissertação (Mestrado

em Ciência e Tecnologia em Alimentos) - Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, Universidade Federal de Pelotas- UFPel-95f.- Pelotas, 1997.

PANDIAN, S. R.; DEEPAK, V.; KALISHWARALAL, K.; RAMESHKUMAR, N.; JEYAREAI, M.; GURUNATHAN, S. (2010). Optimization and fed-batch production of P3HB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. **Bioresource Technology**, v. 2, n. 101, p. 705-711, 2010.

PATWARDHANA, P.; SRIVASTANA, A. K. Fed-batch cultivation of *Waustersia eutropha*. **Bioresource Technology**, v. 6, n. 99, p. 1787-1792, 2008.

PAOLI, M. A. de. **Degradação e Estabilização de Polímeros**, 2ª versão online. Chemkeys. Editado por João Carlos de Andrade, 2005.

PARK, S. J.; KIM, T. W.; KIM, M.K.; LEE, S.Y.; LIM, S. C. Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: Towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1196–1206, 2012.

PEREIRA, N. J.; BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A. Tecnologia de bioprocessos. **Séries em Biotecnologia**, v. 1, 2008.

PIATI, T. M.; RODRIGUES, R. A. F. **Plásticos: Características, usos, produção e impacto ambiental**. p. 505. EDUFAL- Maceió/ Alagoas, 2005.

PIEMOLINI, L. T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *C. violaceum* para estudos de mutação sítio-dirigida**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC-91f.-, Santa Catarina, 2004.

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

POSADA, J. A.; NARANJO, J. M.; LÓPEZ, J. A.; HIGUITA, J. C.; CARDONA, C. A. Design and analysis of poly-3-polyhydroxybutyrate production process from crude glycerol. **Process Biochemistry**, v. 97, n.1, p. 41-50, 2010

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

POUTON, C. W.; AKHTAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potencial in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, p. 133 –162, 1996.

PRADELLA, J. G. da C.; TACIRO, M. K.; MATEUS, A. Y. P. High- cell- density poly (3- hydroxybutyrate) production from sucrose using *Burkholderia sacchari* culture in airlift bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 21, n.101, p. 8355-8360, 2010.

PRADO, M. R. V.; MATTOS, V. M. de. Diagnóstico da Gestão de resíduos sólidos urbanos gerados na cidade de Poxoréu- MT, Brasil. **Uniciências**, v. 18, n. 1, p. 5-10, 2014.

PREETHA, R.; JAYAPRAKASH, N. S.; PHILIP, R.; SINGH, I. S. B. Optimization of carbon and nitrogen sources and growth factors for the production of an aquaculture probiotic (*Pseudomonas* MCCB 103) using response surface methodology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1043-1051, 2007.

QUILLAGUAMAN, J.; HASHIM, S.; BENTO, F.; Poly(beta-hydroxybutyrate) production by *Halomonas bolivienses* LC1 in batch culture with sucrose as carbon source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 5, n. 74, p. 981-986, 2005.

RAMADAS, N. H.; SINGH, S. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Polyhydrixybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. **Brazilian Archives Biology Technology**, v. 52, n. 1, p. 17-23, 2009.

RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBE, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J. A. Production of Poly-(Beta-Hydroxybutyric-Co-Beta-Hydroxyvaleric) Acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 2093-2098, 1990

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

REDDY, S.; THIRUMALA, M.; MAHMOOD, S. A novel *Bacillus* sp. Accumulating poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from a single carbon substrate. **Journal of Indusdrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 837-843, 2009.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI, T.; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 137-146, 2003.

REIFENBERGER, E.; BOLES, E.; CIRIACY, M. Kinetic characterization of individual hexose transportes of *Saccharomyces crevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. **European Journal of Biochemistry**, v. 245, n. 2, p. 324-333, 1997.

REHM, B. H.; Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochemistry Journal**, v. 376, p. 15-33, 2003.

ROCKS, J.K. Unusual rheological properties and heat, acid, and salt stabilities make glucose-derived hydrocolloid a versatile food additive. **Food Technology**, v. 25, p. 476-484, 1971.

RODRIGUES, A. A. Produção e caracterização de Poli(3-hidroxibutiratos) obtidos com o uso de efluente industrial e meio mineral por *Ralstonia solanacearum* RS e *Bacillus megaterium* CN3. **Tese** (Doutorado em Ciências). Programa de Pós- Graduação em Ciências. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas- RS, 155f., 2016.

RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A.; KOLLER, M.; DIAS, M. M. S.; CALAFELL-MONFORTE M.; BRAUNEGG G.; MARQUÉS-CALVOA, M. S. Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 94, p. 50-57, 2015.

ROSA, C. F. C.; MICHELON, M.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Effect of medium composition on changes of surface tension during cultivation of *Pseudomonas aeruginosa* LBM10 growing on glycerol. **International Journal of Engineering Research Applied**, v. 5, n. 4, p. 41-46, 2015.

ROYA, I. Large-scale production and efficient recovery of P(3HB) with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. **Journal of Biotechnology**, v. 132, p. 251-258, 2007.

SANGKHARAK, K.; PRASERTSAN, P. Optimization of polyhydroxybutyrate production from a wild type and two mutant strains of *Rhodobacter sphaeroides* using statistical method. **Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 132, p. 331-340, 2007.

SARIKAVA RUSENDI, D.; SHEPPARD, J. D. Hydrolysis of potato processing waste for the production of poly- β -hydroxybutyrate. **Bioresource Technology**, v.2, n. 54, p. 191, 1995.

SATHISH, A.; Glaittli, K.; Sims, R. C.; Miller, C. D. Algae Biomass Based Media for Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Production by *Escherichia coli*. *Journal of Polymer and the Environment*. 2014; 22 (2) 272-277.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. **APS Press**, pp. 373, 2001.

SCHIMDELL, W. **Em Biotecnologia Industrial**; Edgard Blücher, v. 1, cap. 6, São Paulo, 2001.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Em Biotecnologia Industrial**; Edgard Blücher, v. 1, cap. 6, São Paulo, 2001.

SCOTT, G. Green Polymers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 68, p. 1-7, 2000.

SHEN, L.; HAUFE, J.; PATEL, M. K. Product overview and Market projection of emerging bio- based plastics. *PRO-BIT 2009*. Copernicus Institute for Sustainable Development and Innovation Utrecht University 2009.

SILVA, L. F.; TACIRO, M. K.; MICHELIN, M. E.; CARTER, J. M.; PRADELLA, J. G. C.; GOMEZ, J. G. C. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 245–254, 2004.

SINGH, G.; KUMARI, A.; ARPANA, M.; YADAV, A.; AGGARWAL, N. K. Poli β -hydroxybutyrate production by *Bacillus subtilis* NG220 using sugar industry waste water, **BioMed Research International**, p. 1-10, 2013.

SOARES, V. Disponível em: <https://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/ciencia-e-saude/2017/07/22/interna_ciencia_saude,611649/plastico-mundo-produziu-8-3-bi-de-toneladas-em-65-anos-e-reciclou-so.shtml>, acesso em 08/01/2019.

SOLAIMAN, D. K.; ASHBY, R. D.; LICCIARDELLO, G.; CATARA, V. Genetic organization of pha gene locus affects phaC expression, poly(hydroxyalkanoates) composition and granule morphology in *Pseudomonas corrugate*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 111-120, 2008.

SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potential perspectives of bionanocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 84-95, 2007.

SQUIO, C. R.; ARAGAO, G. M. F. de. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-Hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bactérias. **Química Nova**, v. 27, n. 4, 2004.

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

STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends in Biotechnology**. v. 16, n.10, p. 419-427, 1998.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 219-228, 1995.

STEINBÜCHEL, A. **Polyhydroxyalkanoic acids**. In: *Biomaterials from biological sources*. MacMillan Publishers Ltd. Basingstoke. United Kingdom, 1991: 123-213.

STOCKDALE, H.; RIBBONS, D. W.; DAWES, E. A. Occurrence of poly- beta-polyhydroxybutyrate in the Azotobacteriaceae. **Journal of Bacteriology**, v. 5, n. 95, p. 1798-1803, 1968.

STUBBE, J.; TIAN, J.; HE, A.; SINSKEY, A. J.; LAWRENCE, A. G.; LIU, P. Nontemplate- Dependent Polymerization Process: Polyhydroxyalkanoate Synthases as a, p. Paradigm. **Annual Review Biochemistry**, v. 74, p. 433-480, 2005.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis structure and propriets of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 207-215, 2000.

SUN, Z; RAMSEY, J. A.; GUAY, M.; RAMSEY, B. A. Automated feeding strategies for high-cell-density fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 423-43, 2006.

SUN, Z; RAMSEY, J. A.; GUAY, M.; RAMSEY, B. A. Carbon limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by *Pseudomonas putida* KT2440. **Applied Microbiology and Biotechnology**., v. 74, p. 69-77, 2007.

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms na plants. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 148-175, 2007.

TACIRO, M. K. **Estudo da influência de diferentes condições de transferência de oxigênio no cultivo de *Azospirillum brasilense* sp 245**. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) Escola Politécnica da Universidade de São Paulo/ SP, -209p.-, 1992.

TAN, L.K. P.; KUMAR, K. S.; THEANMALAR, M.; GAN, S. N.; GORDON III, B. Saponified palm kernel oil and its major free fatty acids as carbon substrates for the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* PGA1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 47, p. 207– 211,1997.

TIAN, P. Y.; SHANG, L. A.; REN, H.; MI, Y.; FAN, D. D.; JIANG, M. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Current research and development. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.5, p. 709-714,2009.

TONG, G. E.; INLOES, D. S. Making more. **Chemtech**, v. 1, n. 9, p. 567-573, 1990.

TSUGE, T. Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 6, n. 94, p. 579-584. 2002.

TYO, K. E. J.; FISCHER, C. R.; SIMEON, F.; STEPHANOPOULOS, G. Analysis of polyhydroxybutyrate flux limitations by systematic genetic and metabolic perturbations. **Metabolic Engineering**, v. 3, n. 12, p.187-195, 2010.

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

VANDAMME, P.; HOLMES, P. A. **Biologically produced (R)-3-hidroxyalcanoate polymers and copolymers**. In: *Developments in Cristalline Polymers-2* (edited by D. C. Basset): Elsevier Applied Science Publishers LTD. 1998.

VAN-THOUC, D.; QUILLAGUAMAN, J.; MAMO, G.; MATTIASSON, B. Utilization of agriculture residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. **Applied and Microbiology**, v. 104, p. 420-428, 2007.

- VARY, P. S. Prime time for *Bacillus megaterium*. **Microbiology**, v. 140, n. 5, p. 1001-1013, 1994.
- WANG, D. I. C.; COONEY, C. L.; DEMAION, A.L.; DUNNILL, P.; HUMPHREY, A. E.; LILLY, M. D. Fermentation and Enzyme Technology. New York: John Wiley & Sons, p. 374, 1979.
- WILLIAMS, S. F.; MARTIN, D. P.; HOROWITZ, D. M.; PEOPLES, O. PHA applications: addressing the price performance issue. I. Tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 111-121, 1999.
- WU, Q.; HUANG, H.; HU, G. H.; CHEN, J.; HO, K. P.; CHEN, G. Q. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 80, p. 111–118, 2001.
- WONG, H. H.; LEE, S. Y. Poly(3-hydroxybutyrate) production from whwy by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 30-33, 1998.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. **Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.:** proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff, 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology Immunology*. 39(11). p. 897-904, 1995.
- YABUUCHI, E.; KOSARO, Y.; OYIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. **Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia*** (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. *Microbiology and Immunology*. 36(12). p. 1251-1275, 1992.
- YAMANE, T.; CHEN, X. F.; UEDA, S. Growth associated production of poly(3-hydroxyvalerate) from n-pentanol by a *methylotrophicbacterium*, *Paracoccus denitrificans*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 2, n. 62, p. 380-384, 1996.
- YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Fed-batch techniques in microbial process. **Advances in Biochemistry Engineering and Biotechnology**, v. 30, 148-194, 1984.

YAZDANIE, S. S.; GANZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 213-219, 2007.

YEZZA, A.; HALASZ, A.; LEVADOUX, W.; HAWARI, J. Production of poly- beta-hydroxyburate (P3HB) by *Alcaligenes latus* from maple sap. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 2, n. 77, p. 269-274, 2007.

YU, J. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 105, 2001.

ZAFAR, M.; KUMAR, S.; KUMAR, S. Modeling and optimization of poly(3hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate) production from cane molasses by *Azohydromonas lata* MTCC 2311 in a stirred-tank reactor: effect of agitation and aeration regimes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 987-1001, 2012.

ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 53, n.1, p. 5-11, 2001.