

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS

**Produção de P(3HB) por *Bacillus  
megaterium* Utilizando Permeado de Soro  
de Leite**

Dissertação de Mestrado

Guilherme de Souza Hassemer

Porto Alegre

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS

Produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* Utilizando  
Permeado de Soro de Leite

Guilherme de Souza Hassemer

Dissertação de mestrado apresentada  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Ciência e Tecnologia  
de Alimentos

Área de concentração: Bioprocessos em  
Alimentos

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Rech

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora Jung  
Luvizetto Faccin

Porto Alegre

2016

### CIP - Catalogação na Publicação

Hassemer, Guilherme de Souza  
Produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium*  
Utilizando Permeado de Soro de Leite / Guilherme de  
Souza Hassemer. -- 2016.  
80 f.

Orientador: Rosane Rech.  
Coorientador: Débora Jung Luvizetto Faccin.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. biopolímero. 2. polihidroxibutirato. 3.  
permeado de soro. 4. *Bacillus*. I. Rech, Rosane,  
orient. II. Faccin, Débora Jung Luvizetto, coorient.  
III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Produção de P(3HB) por Bacillus megaterium Utilizando Permeado de Soro de Leite*, elaborada por Guilherme de Souza Hassemer, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comissão Examinadora:

Dr. Sabrina Gabardo

Prof. Dr. Nilo Sérgio Cardozo  
DEQUI/UFRGS

Prof. Dr. Florencia Cladera Olivera  
ICTA/UFRGS



## RESUMO

O uso de fontes de carbono de baixo custo para a obtenção de produtos de alto valor agregado vem recebendo grande interesse atualmente. O permeado de soro de leite é um resíduo oriundo do processo de ultrafiltração do soro de leite. Este composto é rico em carboidratos (lactose), o que faz com que seu tratamento possa se tornar problemático, considerando o volume de efluente gerado bem como a alta demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO, respectivamente). A lactose presente no permeado de soro pode ser empregada no processo de obtenção do polihidroxibutirato (P(3HB)), reduzindo os custos de tratamento do permeado de soro bem como os impactos ambientais causados pelo descarte do mesmo e ainda auxiliando na redução do custo de obtenção do P(3HB).

Um microrganismo capaz de utilizar lactose para produzir P(3HB) é o *Bacillus megaterium*, uma bactéria gram-positiva que apresenta boa tolerância a temperatura e resistência a altas pressões osmóticas, o que encoraja sua utilização no processo biotecnológico do P(3HB).

No presente estudo, diferentes fontes de carbono foram testadas (sacarose, lactose P.A. e permeado de soro de leite). As culturas contendo permeado de soro foram ainda avaliadas quanto a necessidade de suplementação de micronutrientes e fonte de nitrogênio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Foram realizados testes em estufa rotatória ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 180 rpm, 36 h), que indicaram que existe sim a necessidade de suplementar o permeado de soro tanto com micronutrientes quanto com fonte de nitrogênio. Foi possível perceber ainda que *B. megaterium* apresentou certa dificuldade em metabolizar a lactose, assim sendo testou-se então permeado de soro hidrolisado com ambas as suplementações.

O meio de cultivo que apresentou o melhor desempenho, foi então utilizado em cultivos em biorreator buscando otimizar o processo. Nos cultivos em biorreator, avaliou-se a influência da velocidade de agitação e pH no acúmulo de P(3HB). Os melhores resultados encontrados foram obtidos utilizando  $4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  de ar, 300 rpm ( $k_L a$  de  $0,016 \text{ s}^{-1}$ ) e pH livre, onde após 24 h se obteve  $4,42 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de biomassa total contendo 50,4 % ( $2,23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de P (3HB).





## ABSTRACT

The use of low-cost carbon sources to obtain high value products has received great interest nowadays. Whey permeate is a residue derived from the ultrafiltration process of whey and is usually discarded as wastewater. It is high in carbohydrates (lactose), which can cause issues with its disposal, mainly due to its sheer volume and high biochemical and chemical oxygen demands (BOD and COD respectively).

The lactose present in whey permeate can be used in to obtain polyhydroxybutyrate (P(3HB)), reducing costs related to whey permeate treatment as well as lessening possible environmental impacts caused by its disposal and even assisting in reducing the costs to obtain P(3HB).

*Bacillus megaterium* is a microorganism capable of utilizing lactose to produce P(3HB). It is a gram-positive bacteria, with good tolerance to temperature and high resistance to osmotic pressure, which encourages their use in biotechnological process of P(3HB) production.

In this study, different carbon sources were tested (sucrose, P.A. lactose and whey permeate). The cultures containing whey permeate were also evaluated regarding the need of micronutrient and nitrogen source ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.0 g · L<sup>-1</sup>) supplementation.

Initial shake flask tests (30 °C, 180 rpm, 36 h) indicated that there is indeed a need to supplement whey permeate with micronutrients and with a nitrogen source. It was also possible to notice that *B. megaterium* displayed some difficulty in metabolizing lactose, therefore hydrolysed whey permeate was then tested using both supplementations.

The culture medium with the best performance was then used in bioreactor batch cultures in order to optimize the process. In these cultures the influence of stirring speed and pH in the accumulation of P(3HB) was tested. The best results found were obtained using 4 L·min<sup>-1</sup> of O<sub>2</sub>, 300 rpm ( $k_La$  of 0.016 s<sup>-1</sup>) and uncontrolled pH. After 24 h in these conditions 4.42 g · L<sup>-1</sup> of total biomass containing 50.4 % (2.23 g · L<sup>-1</sup>) of P (3HB) was obtained.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação de polímeros quanto à biodegradabilidade e forma obtenção. (SHEN; HAUFE; PATEL, 2009).....	6
Figura 2 – Morfologia do grânulo de P(3HB) (ZINN; WITHOLT; EGLI, 2001). .	10
Figura 3 – Esquema de rotas metabólicas para a produção de PHAs de cadeia curta (ARAI, 2002).....	11
Figura 4 – Esquema do metabolismo para produção de PHAs de cadeia média (ZHANG; CARLSON; SRIENC, 2006).....	11
Figura 5 – Estrutura química do polihidroxibutirato (MEKONNEN <i>et al.</i> , 2013). .....	13
Figura 6 – Grânulos de P(3HB) em <i>B. megaterium</i> após 4 h (a), 12 h (b) e 21 h (c) (RODRÍGUEZ-CONTRERAS <i>et al.</i> , 2013).....	13
Figura 7 – Comparação morfológica entre células de <i>B. megaterium</i> (amarelas) e <i>E. coli</i> (vermelhas) (BUNK <i>et al.</i> , 2010).....	18
Figura 8 – Relação entre variáveis de bioprocessos que afetam a taxa de transferência de oxigênio (Adaptado de KANE, 2012).....	23
Figura 9 – Processo de hidrólise do permeado de soro. ....	29
Figura 10 – Biorreator BIOSTAT B™, com eletrodos de pH, oxigênio dissolvido e rotor acoplados à unidade de controle .....	31
Figura 11 – Evolução do cultivo em batelada de 4 L em 0 h (A), 12 h (B) e 24 h (C) .....	31
Figura 12 – Amostras de biomassa após extração de P(3HB).....	33
Figure 13 – Time course of <i>B. megaterium</i> DSMZ 32T growing in HWMN (▲), SMN (■), and WMN(●) media. Dry cell weight (A), P(3HB) production (B), nitrogen source consumption (C), and pH variation (D). ....	44
Figure 14 – Time course of <i>B. megaterium</i> culture for a $k_La$ value of $0.011\text{ s}^{-1}$ , $30\text{ }^\circ\text{C}$ and without pH control.....	46
Figure 15 – Time course of <i>B. megaterium</i> culture for a $k_La$ value of $0.016\text{ s}^{-1}$ , $30\text{ }^\circ\text{C}$ and without pH control.....	46
Figure 16 – Time course of <i>B. megaterium</i> culture for a $k_La$ value of $0.022\text{ s}^{-1}$ , $30\text{ }^\circ\text{C}$ and without pH control.....	47
Figure 17 – Time course of <i>B. megaterium</i> culture for a $k_La$ value of $0.016\text{ s}^{-1}$ , $30\text{ }^\circ\text{C}$ and pH controlled at 7.0. ....	49
Figure 18 – Time course of <i>B. megaterium</i> culture for a $k_La$ value of $0.016\text{ s}^{-1}$ , $30\text{ }^\circ\text{C}$ and pH varying from 7.0 to 6.3. ....	49



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção Mundial de PHAs (Adaptado de SHEN, HAUFE & PATEL, 2009).....	15
Tabela 2 – Composição média (%) de permeado de leite (desnatado e integral), soro de leite e permeado de soro em base seca (ZADOW J. G., 1984) .....	21
Tabela 3 – Composição do meio mineral .....	27
Tabela 4 – Composição da solução de micronutrientes .....	27
Tabela 5 – Composição dos meios de cultura.....	28
Tabela 6 – Composição da solução 1 (Spinreact).....	30
Tabela 7 – Parâmetros de controle dos cultivos em biorreator. ....	32
Table 8 – Media composition tested in this research.....	40
Table 9 – Total biomass (X) formed and P(3HB) percentage of cell mass fraction at 36 h of cultivation as a function of the medium used.....	42
Table 10 – Total biomass (X), P(3HB) concentration and P(3HB) percentage of cell mass fraction at 36 h of cultivation as a function of the medium used. ....	43
Table 11 – The effect of $k_L a$ on total biomass, P(3HB) concentration at the end of the culture, and P(3HB) productivity ( $P_{P(3HB)}$ ) at 21 h of culture.....	45
Table 12 – The effect of pH on total biomass, P(3HB) concentration at the end of the culture, and P(3HB) productivity ( $P_{P(3HB)}$ ) at 21 h of culture.....	48



## LISTA DE ABREVIações

3-HP	Ácido hidroxipropiônico
3HA-CoAs	3-hidroxiacil-CoAs
3HB-CoA	(R)-3-hidroxi butiril coenzima A
<i>a</i>	Área da interface líquido-gás
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
<i>C</i>	Concentração de O <sub>2</sub> no meio de cultura
<i>C*</i>	Solubilidade de O <sub>2</sub> no meio de cultura
Co-A	Coenzima A
$\frac{dC}{dt}$	Taxa de acúmulo de oxigênio na fase líquida
DO	Oxigênio dissolvido
HA-CoAs	Hidroxiacil-CoAs
<i>k<sub>L</sub></i>	Coeficiente de transferência de massa na fase líquida
<i>k<sub>L</sub>, s<sup>-1</sup></i>	Transferência de massa da fase líquida
<i>k<sub>La</sub></i>	Coeficiente volumétrico de transferência de massa
P(3HB)-co-P(3HV)	Polihidroxi butirato-co-valerato
P(3HV)	Polihidroxi valerato
PGA	Ácido poliglicólico
PhaC	PHA sintase
PLA	Ácido polilático
TTO	Taxa de transferência de oxigênio





## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>5</b>
3.1	<i>Polímeros Naturais</i> .....	5
3.2	<i>Polímeros Derivados de Fontes Naturais</i> .....	5
3.3	<i>Polímeros Biodegradáveis</i> .....	7
3.4	<i>Polihidroxialcanoatos</i> .....	9
3.5	<i>P(3HB)</i> .....	13
3.6	<i>Microrganismos produtores de P(3HB)</i> .....	16
3.7	<i>Bacillus megaterium na produção de P(3HB)</i> .....	17
3.8	<i>Permeado de soro como meio de cultivo</i> .....	20
3.9	<i>Efeitos da taxa de transferência de O<sub>2</sub></i> .....	22
3.10	<i>Principais formas de extração e separação</i> .....	25
<b>4</b>	<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>27</b>
4.1	<i>Microrganismo utilizado</i> .....	27
4.2	<i>Meio de cultivo</i> .....	27
4.3	<i>Experimentos em estufa rotatória</i> .....	28
4.4	<i>Hidrólise do permeado de soro</i> .....	29
4.5	<i>Experimentos em biorreator</i> .....	30
4.6	<i>Determinação de biomassa</i> .....	32
4.7	<i>Determinação de P(3HB)</i> .....	32
4.8	<i>Medida de açúcares totais</i> .....	33
4.9	<i>Medida de nitrogênio amoniacal</i> .....	34
4.10	<i>Quantificação de proteínas totais</i> .....	34
4.11	<i>Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k<sub>La</sub>)</i> .....	35
4.12	<i>Análise estatística</i> .....	35
<b>5</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>37</b>
5.1	<i>Abstract</i> .....	37
5.2	<i>Introduction</i> .....	38
5.3	<i>Materials and methods</i> .....	39
5.3.1	<b><i>Microorganism and pre-cultures</i></b> .....	<b>39</b>
5.3.2	<b><i>Shake-flask cultivation</i></b> .....	<b>40</b>
5.3.3	<b><i>Bioreactor cultivation</i></b> .....	<b>40</b>

<b>5.3.4</b>	<b>Analytical procedures .....</b>	<b>41</b>
5.4	<i>Results and discussion .....</i>	<i>42</i>
<b>5.4.1</b>	<b>Definition of best culture medium for P(3HB) production.....</b>	<b>42</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Effect of <math>k_La</math> and pH on P(3HB) production.....</b>	<b>44</b>
5.5	<i>Conclusions .....</i>	<i>50</i>
<b>6</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Sugestões para trabalhos futuros .....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Referências.....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Produtos derivados de plásticos petroquímicos se tornaram parte fundamental da sociedade moderna, substituindo vidro e papel, principalmente na indústria de alimentos. A grande utilização de artefatos plásticos se dá por sua resistência e durabilidade. Estas características, no entanto, tornam-se problemáticas após o descarte destes produtos (LEE, SANG YUP, 1996).

Uma alternativa é utilização de plásticos biodegradáveis como os polihidroxicanoatos (PHAs). Os PHAs são uma classe de poliésteres, totalmente biodegradáveis, sintetizados por diversas espécies de microrganismos, agindo como reserva de energia para as células. Em certas espécies de microrganismos, para que a produção de PHA ocorra, a célula deve estar em uma situação de estresse devido a limitação de algum nutriente (fósforo, oxigênio, nitrogênio, etc.) e excesso de fonte de carbono. Por outro lado, em outras espécies, a síntese de PHA ocorre naturalmente ao longo do desenvolvimento celular (ABDEL; ALI; ROUSHDY, 1998; CHANPRATEEP, 2010; KHANNA, S; SRIVASTAVA, 2005; SRIDEWI; BHUBALAN; SUDESH, 2006).

Dentre todos os PHAs, o primeiro a ser descoberto foi o polihidroxibutirato (P(3HB)). O P(3HB) é também um dos PHAs mais estudados como possível substituto de plásticos petroquímicos (PARK, S J; CHOI; LEE, 2005). Entretanto, a produção de P(3HB) ainda é restrita devido ao seu custo. Os principais substratos utilizados na produção de P(3HB) são melaços (cana de açúcar, beterraba, etc.) e xarope de milho, que apesar de apresentarem bons resultados, possuem valor agregado, aumentando o custo do processo. Estima-se ainda que o custo do substrato pode chegar a representar até 45 % do valor total do processo (ABDEL; ALI; ROUSHDY, 1998; FACCIN, D J L, 2012; LEE, S Y; CHOI; WONG, 1999; WU, D. X. *et al.*, 2002).

Sob este parecer, seria interessante utilizar produtos de baixo custo para tornar o P(3HB) mais acessível. Um subproduto da indústria de alimentos que poderia ser direcionado para a produção de P(3HB) é o permeado de soro de leite. O permeado de soro é oriundo da ultrafiltração do soro de leite, onde as proteínas solúveis são removidas do soro, dando então origem ao permeado rico em lactose. Uma grande quantidade do volume de permeado de soro gerado é

simplesmente descartada como efluente, porém, o custo de tratamento deste resíduo se torna elevado devido ao seu volume e suas altas demandas química e bioquímica de oxigênio (DQO e DBO, respectivamente) (BARBA et al., 2001; KOSIKOWSKI, 1979; PANDIAN et al., 2010). Desta forma, encontrar meios de agregar valor a este efluente seria algo de grande interesse para a indústria.

Considerando que a lactose presente no permeado de soro pode ser empregada como fonte de carbono para microrganismos fermentadores de lactose, sua utilização na cadeia produtiva do P(3HB) reduziria os custos da indústria com tratamento de efluentes, aliviaria os impactos ambientais causados pelo descarte do mesmo e ainda poderia auxiliar na redução do custo de produção de P(3HB).

A utilização de permeado de soro como fonte de carbono no processo de obtenção de P(3HB) auxiliaria ainda na redução do desvio de áreas cultiváveis para a produção de substratos por microrganismos, uma vez que o mesmo não compete com a produção de alimentos voltados para o consumo humano, como ocorre com os melaços e xarope de milho.

Neste contexto, este estudo busca verificar a potencial utilização de permeado de soro como meio de cultura para produção de biomassa e P(3HB) por *Bacillus megaterium* (uma bactéria fermentadora de lactose e produtora de P(3HB)) em estufa rotatória e cultivos em biorreator, bem como realizar ajustes finos para maximizar a produtividade do processo.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver um processo de produção de P(3HB) utilizando permeado de soro de queijo como meio de cultivo, utilizando a bactéria *Bacillus megaterium*.

Os objetivos do presente trabalho são:

- Comparar a cinética de produção de P(3HB) em estufa rotatória utilizando permeado de soro com o meio de cultivo sintético com lactose;
- Estudar a necessidade de suplementação do permeado de soro com fontes de nitrogênio, fósforo e outros micronutrientes;
- Determinar a cinética de produção de P(3HB) em biorreator com diferentes taxas de dissolução de oxigênio;
- Avaliar a influência do pH na síntese de P(3HB);



### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Polímeros Naturais**

Os polímeros são uma das classes de compostos mais abundantes no planeta. Eles podem ser encontrados em animais (hidrocarbonetos, proteínas, gorduras, ácidos nucleicos, etc), plantas (celulose, óleos, amidos) e microrganismos. No caso dos polímeros naturais, estes compostos são produzidos ao longo do ciclo de crescimento das células. A síntese dos polímeros é realizada por reações de polimerização (catalisadas por enzimas) que ocorrem no interior das células. Como estes compostos são de origem orgânica, os mesmos podem também ser degradados completamente por organismos vivos. A degradação dos polímeros naturais ocorre, sobretudo, devido a ação de enzimas que rompem as ligações da cadeia polimérica e libera os monômeros que são então utilizados pelas células para realizar suas funções metabólicas gerando, principalmente, água e CO<sub>2</sub> (FLIEGER et al., 2003; KLEMM et al., 2005).

#### **3.2 Polímeros Derivados de Fontes Naturais**

Atualmente, já é possível produzir diversos polímeros que antes eram obtidos apenas de fontes não renováveis (como o petróleo) por processos biotecnológicos. A Figura 1 apresenta os tipos mais comuns de polímeros utilizados industrialmente de acordo com suas formas de obtenção e potencial de biodegradação (SHEN; HAUFÉ; PATEL, 2009).

Um dos maiores exemplos de polímeros derivados de fontes naturais é a *Plant Bottle™* desenvolvida pela Coca-Cola Company que utiliza até 30 % de polietileno tereftalato derivado de biomassa vegetal (bio-PET). No caso do bio-PET, o Brasil também tem se destacado, especialmente na produção de filmes e pellets para extrusão (HALLEY; DORGAN, 2011; SHEN; HAUFÉ; PATEL, 2009).

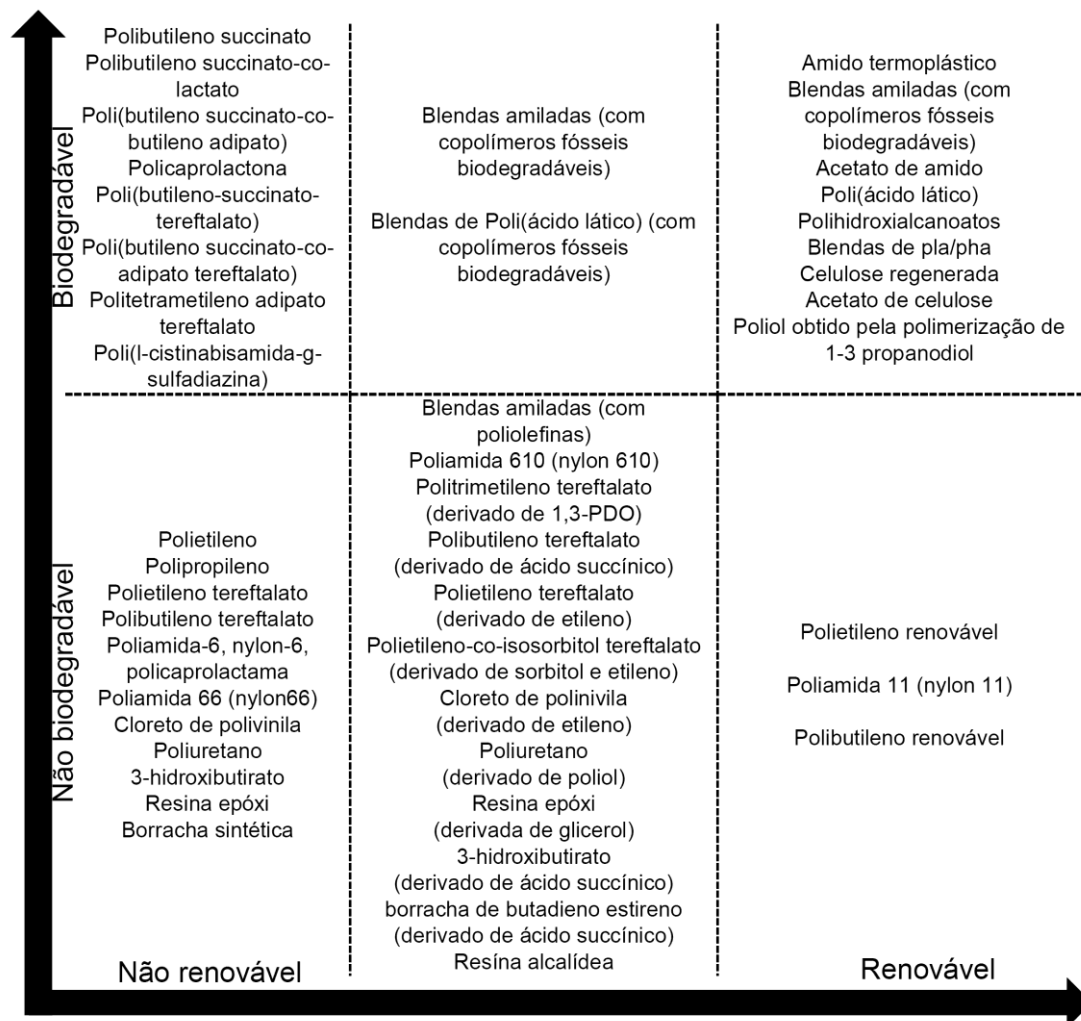


Figura 1 – Classificação de polímeros quanto à biodegradabilidade e forma obtenção. (SHEN; HAUFE; PATEL, 2009)

Outro polímero muito utilizado é a borracha artificial (um copolímero formado por isobutileno e isopreno) que agora pode ser produzida por processos bioquímicos através de *Escherichia coli* recombinante (Genencor, USA), utilizando genes de plantas que permitem a conversão de glicose em isopreno, gerando mais de  $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  deste. O isobutileno, por outro lado, pode ser obtido pela desidratação do isobutanol, que por sua vez é produto da fermentação de amidos e celulose. A utilizações destas formas de produção podem permitir a obtenção de borracha sintética a partir de fontes naturais que pode então ser empregada na indústria de pneus (MITTAL, 2011).



Mais um monômero que pode ser obtido de fontes renováveis é o ácido 3-hidroxipropiônico (3-HP). O 3-HP pode então ser polimerizado, produzindo poly(3-HP) (um poliéster) ou então desidratado gerando ácido acrílico, que, após polimerizado, dá origem ao ácido poliacrílico, um composto utilizado em tintas. Nos polímeros derivados de fontes naturais temos ainda as poliamidas, popularmente conhecidas como nylon. As poliamidas são polímeros resistentes e de alto valor agregado. Atualmente existe um grande interesse em encontrar fontes renováveis para a produção de poliamidas. Nylon-11, por exemplo, pode ser obtido através do óleo de rícino e Nylon-4 pode ser sintetizado a partir de glutamato monossódico, o que pode permitir que microrganismos recombinantes sejam capazes de gerar materiais precursores para a produção destes polímeros (MITTAL, 2011; SUN, 2013).

Embora estes polímeros possam ser obtidos por fontes renováveis, os mesmos não apresentam potencial biodegradável, o que significa que o impacto ambiental, após o descarte, causado pelos mesmos se mantém inalterado (HALLEY; DORGAN, 2011).

### **3.3 Polímeros Biodegradáveis**

Como já mencionado anteriormente, os polímeros utilizados como plásticos (polietileno, polipropileno, etc.) são tipicamente de origem fóssil. Suas estruturas não ocorrem naturalmente, portanto não são biodegradáveis. Através de uma melhor compreensão da relação entre a estrutura, propriedades dos polímeros e processos de degradação biológica, novos materiais foram desenvolvidos. Estes materiais possuem as propriedades e a capacidade de utilização similar aos plásticos, mas são biodegradáveis (CHANPRATEEP, 2010; KHANNA, SHILPI; SRIVASTAVA, 2005).

Atualmente, os polímeros biodegradáveis (com diferentes graus de biodegradabilidade e provenientes de diversas fontes) têm ganhado espaço no mercado industrial, com diversos investimentos sendo feitos em sua pesquisa e desenvolvimento, visando a produção em larga escala (SHEN; HAUFÉ; PATEL, 2009).

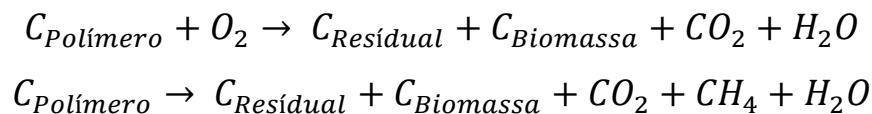
Embora os polímeros biodegradáveis possuam diversas aplicações, existem propriedades que tendem a ser comum entre eles. Por exemplo, todos os polímeros biodegradáveis devem ser estáveis e duráveis o suficiente para possibilitar sua utilização em uma aplicação específica, porém após o descarte a degradação deve ser rápida (KUMAR, 2011). Sobre a degradação, como já vimos anteriormente, os polímeros são compostos por monômeros e as ligações entre estes monômeros geralmente são difíceis de serem quebradas. Assim sendo, o processo de degradação tende a ocorrer a partir dos grupos terminais da cadeia polimérica (BASTIOLI, 2005).

Idealmente, polímeros biodegradáveis também tendem a apresentar pouca ou até mesmo nenhuma ramificação na cadeia já que a presença de ramificações reduz a quantidade de grupos terminais/peso de polímero. Este também é o mesmo motivo pelo qual a cristalinidade é geralmente baixa e o grau de polimerização baixo (CHAMY; ROSENKRANZ, 2013).

É importante lembrar ainda que a taxa de degradação depende ainda do ambiente onde se encontra o polímero, uma vez que pH, a concentração de enzimas, a quantidade de água, entre outros apresentam efeitos na degradação dos polímeros (RATNER *et al.*, 2004).

Ainda falando sobre a degradabilidade dos polímeros, Khanna & Srivastava (2005) trazem que os mesmos podem ser categorizados em três grupos distintos. Os polímeros parcialmente biodegradáveis são polímeros produzidos com a adição de amido. Este amido age como componente ligante, gerando uma mistura homogênea de polímero e amido. Após o descarte, a fração amilácea do produto é rapidamente degradada por microrganismos, porém o restante do composto continuará presente no meio ambiente. Os polímeros fotobiodegradáveis possuem aditivos que aumentam a sensibilidade do material à radiação ultravioleta, tornando-o quebradiço quando exposto a este tipo de radiação por períodos prolongados de tempo. Porém, os polímeros fotobiodegradáveis são apenas fragmentados em partículas menores, não havendo quebra nas ligações entre os monômeros que compõem o polímero. Por fim, polímeros completamente biodegradáveis são aqueles capazes de sofrer degradação completa, ou seja, ruptura das ligações entre as unidades monoméricas pela ação de enzimas, usualmente secretadas por microrganismos.

Estes microrganismos secretam enzimas (depolimerases) que rompem as ligações entre os monômeros, permitindo a metabolização dos mesmos e transformando-os em água e gás carbônico em meios aeróbios ou metano, água e dióxido de carbono quando em condições de anaerobiose, conforme as equações a seguir (CHANPRATEEP, 2010; KHANNA; SRIVASTAVA, 2005; OMAR et al., 2001; SRIDEWI; BHUBALAN; SUDESH, 2006; VERLINDEN et al., 2007).



Dentre os principais polímeros biodegradáveis com aplicação industrial, podemos citar o ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), e os polihidroxicanoatos (PHAs) (MIDDLETON; TIPTON, 2000).

### 3.4 Polihidroxicanoatos

Dentre os polímeros biodegradáveis que mais vem ganhando destaque no mercado estão os polihidroxicanoatos (PHAs), poliésteres passíveis de ser sintetizados por mais de 90 gêneros diferentes de microrganismos e até mesmo algumas plantas, embora o rendimento seja menor. Atualmente mais de 150 tipos diferentes de monômeros já são conhecidos. A vasta quantidade de monômeros possibilita a copolimerização em diferentes compostos, gerando assim uma grande variedade de PHAs com propriedades mecânicas distintas, o que aumenta as aplicações práticas dos mesmos (ANDERSON; DAWES, 1990; HAZER; STEINBÜCHEL, 2007). Outra característica que aumenta ainda mais a importância dos PHAs é o fato de que além de serem completamente biodegradáveis, eles ainda são atóxicos e biocompatíveis, podendo apresentar também características termoplásticas ou elastoméricas, com pontos de fusão entre 40 °C a 180 °C (DOI; STEINBÜCHEL, 2002; SRIDEWI; BHUBALAN; SUDESH, 2006; VERLINDEN *et al.*, 2007).

Em relação a sua obtenção, as bactérias capazes de sintetizar PHAs são ainda separadas em dois grupos distintos. O primeiro grupo necessita da

limitação de algum macronutriente como nitrogênio, oxigênio, magnésio, potássio, fósforo, etc. e excesso de fontes de carbono (*Cupriavidus metallidurans* e *Pseudomonas oleovorans*) para que ocorra a síntese de PHAs. O segundo grupo engloba as bactérias capazes de sintetizar PHAs ao longo da fase de crescimento exponencial, sem que haja a necessidade de limitação de nenhum nutriente (*Azohydromonas lata* e *Bacillus megaterium*) (MCCOOL *et al.*, 1996; OMAR *et al.*, 2001). Porém em todos os microrganismos, os PHAs ficam armazenados sob a forma de grânulos amorfos e osmoticamente inertes no interior da célula, conforme o modelo apresentado na Figura 2 (BYROM, 1993).

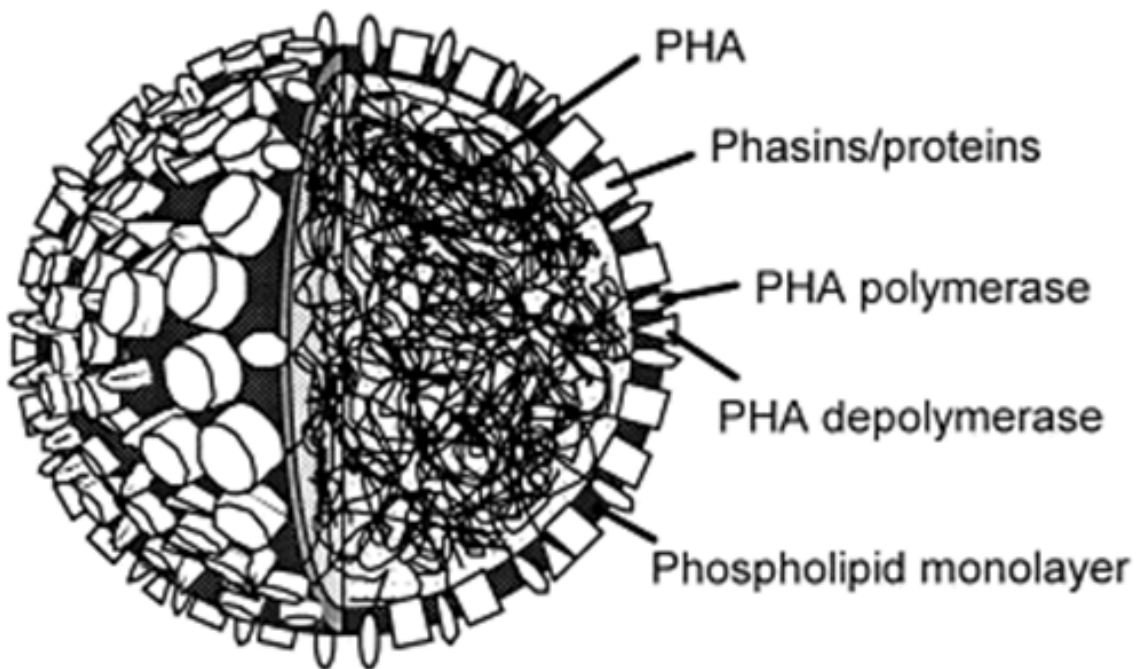


Figura 2 – Morfologia do grânulo de P(3HB) (ZINN; WITHOLT; EGLI, 2001).

Os processos metabólicos que dão origem aos PHAs variam também de acordo com o microrganismo. As Figura 3 e Figura 4 apresentam um esquema resumido das rotas metabólicas para a síntese de PHA.

Com base nessas figuras, nota-se que a biossíntese dos PHAs ocorre em duas etapas principais: a geração de hidroxiacil-CoAs (HA-CoAs) usando hidroxíácidos graxos de cadeia curta e média, e vários metabólitos como precursores e a polimerização das HA-CoAs em PHAs. As PHA sintases promovem a polimerização das HA-CoAs. Estas enzimas possuem uma grande especificidade de substrato em relação a várias HA-CoAs, dentre as quais a 3-

hidroxiacil-CoAs (3HA-CoAs) são os substratos mais favoráveis, embora 4-, 5- e 6-hidrociacil-CoAs possam ser utilizadas como substratos. A enantioseletividade dos monômeros de PHA é decorrente do fato de que as PHA sintases aceitam apenas (R)-HA-CoAs na cadeia polimérica se um centro assimétrico existir no monômero (KIM; OH, 2013; PARK, SI JAE *et al.*, 2012).

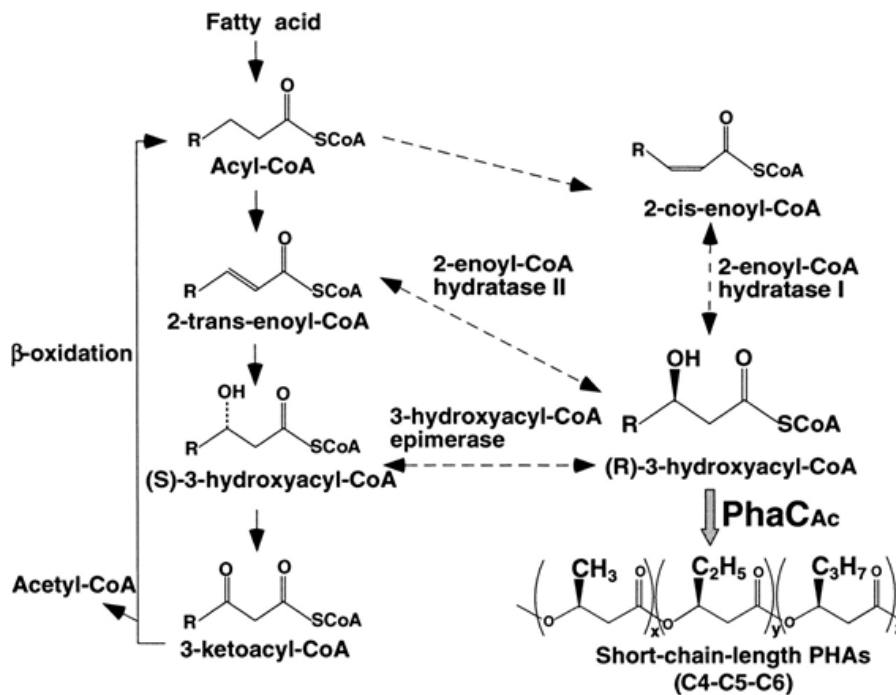


Figura 3 – Esquema de rotas metabólicas para a produção de PHAs de cadeia curta (ARAI, 2002).

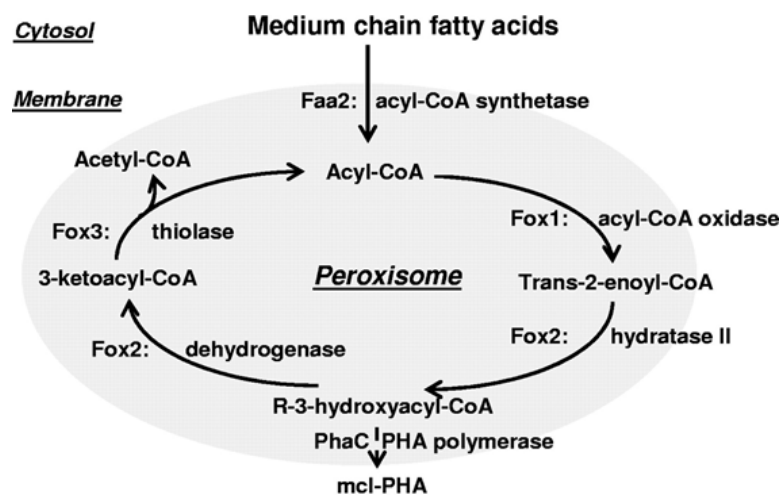


Figura 4 – Esquema do metabolismo para produção de PHAs de cadeia média (ZHANG; CARLSON; SRIENC, 2006).

Existem ainda duas classificações principais para os PHAs. De acordo com os hidroxiácidos graxos utilizados para sua produção, os PHAs são então classificados como PHAs de cadeia curta (formados pela ação das PHA sintases (PhaC) sobre hidroxiácidos graxos com 3 a 5 átomos de carbono) ou de cadeia média (PhaCs utilizam hidroxiácidos graxos com 6 a 14 carbonos) (ARAI, 2002; ZHANG; CARLSON; SRIENC, 2006). PHAs de cadeia curta e média são formados por processos metabólicos diferentes.

A principal diferença entre as espécies de PHAs está em suas propriedades físicas. PHAs de cadeia curta tendem a apresentar rigidez e cristalinidade elevadas, tornando o material quebradiço e limitando sua utilização na indústria de embalagens ou filmes. Já os PHAs de cadeia média apresentam maior elasticidade, assemelhando-se a borracha e demais elastômeros. No caso dos PHAs de cadeia curta, suas propriedades podem ser melhoradas através da biossíntese de copolímeros, onde tem-se mistura de monômeros na cadeia de PHA permitindo obtenção de polímeros com propriedades mecânicas diferentes (ANDERSON; DAWES, 1990; HAZER; STEINBÜCHEL, 2007; PARK, SI JAE *et al.*, 2012).

Sob o ponto de vista ambiental os PHAs são uma alternativa muito interessante para a reduzir a utilização de polímeros de origem petroquímica. Todavia, é preciso garantir que o produto resultante apresente características compatíveis com as necessidades dos segmentos da indústria para qual será destinada sua utilização (PARK, S J; CHOI; LEE, 2005). Sendo que o fato de serem biodegradáveis faz com que os mesmos sejam utilizados, sobretudo, para a produção de artefatos descartáveis, filmes e fibras (HAZER; STEINBÜCHEL, 2007). Outro ponto de grande interesse por parte da indústria é o fato de que os PHAs apresentam propriedades físicas muito similares às de vários polímeros derivados do petróleo (polipropileno, por exemplo) o que torna possível a utilização de PHAs em seu lugar (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

Dentre os PHAs conhecidos, o polihidroxibutirato (P(3HB)) e o polihidroxivalerato (P(3HV)) vem sendo muito estudados devido a suas características favoráveis às aplicações industriais. Algo também muito comum na indústria é a obtenção do copolímero polihidroxibutirato-co-valerato (P(3HB)-

co-P(3HV)), já utilizado como embalagens por algumas empresas (SHEN; HAUFE; PATEL, 2009).

### 3.5 P(3HB)

O polihidroxibutirato (P(3HB)) é um dos principais representantes dos PHAs. É um poliéster formado por diversos monômeros idênticos ligados um ao outro (Figura 5). O P(3HB) foi também o primeiro PHA a ser descoberto, com os primeiros registros ocorrendo próximo a 1888 onde Martinus Beijerinck, um microbiologista holandês, visualizou inclusões de PHAs no interior de células bacterianas (Figura 6). Todavia, a real determinação do P(3HB) ocorreu apenas em 1927, quando o microbiologista francês Maurice Lemoigne foi capaz de isolar e caracterizar o mesmo. Em seu estudo, Lemoigne extraiu de células de *Bacillus megaterium* dois compostos que ele acreditava serem resultado da hidrólise de P(3HB). A composição química destes compostos era idêntica, porém um deles era cristalino, com ponto de fusão de 120 °C enquanto o outro era amorfo e seu ponto de amolecimento se encontrava próximo a 157 °C. Ao fim de sua pesquisa, Lemoigne provou que ambos os compostos eram P(3HB), porém com massas molares diferentes (VOLOVA, 2004).

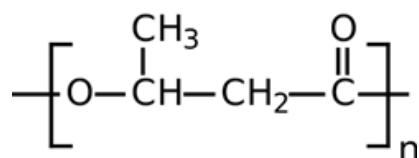


Figura 5 – Estrutura química do polihidroxibutirato (MEKONNEN *et al.*, 2013).

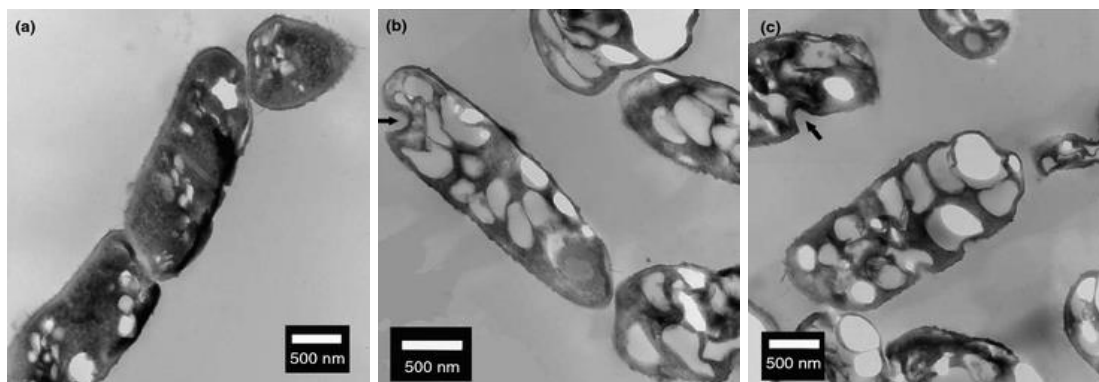


Figura 6 – Grânulos de P(3HB) em *B. megaterium* após 4 h (a), 12 h (b) e 21 h (c). As setas indicam fraturas na parede celular devido ao tamanho dos grânulos de P(3HB) (RODRÍGUEZ-CONTRERAS *et al.*, 2013)

O próximo trabalho envolvendo P(3HB) foi desenvolvido por Macrae & Wilkinson (1958), onde percebeu-se que culturas de *Bacillus megaterium* e *Bacillus cereus* armazenavam grânulos de P(3HB) em meios contendo uma alta concentração de fontes de carbono e nitrogênio. Entretanto, conforme estes nutrientes eram degradados, os grânulos de P(3HB) eram também consumidos pelas células, permitindo a caracterização do P(3HB) como reserva de energia.

Nos anos seguintes houve grande interesse no estudo da influência do P(3HB) no funcionamento celular e a influência de fatores ambientais em sua síntese e utilização pelas células. Apenas em 1973 o estudo do P(3HB) como possível substituto dos polímeros petroquímicos ganhou força, devido à crise do petróleo (VOLOVA, 2004).

Em 1976, empresas inglesas investigavam uma forma rentável de produzir e extrair P(3HB) de culturas bacterianas, utilizando açúcares de plantas. Estes estudos demonstraram que além de ser possível produzir P(3HB) através de materiais renováveis, algumas propriedades do P(3HB) se assemelhavam às do polipropileno (SENIOR, 1984).

A partir deste ponto, as demais características do P(3HB) (biodegradabilidade, biocompatibilidade, etc.) foram suficientes para manter o interesse no composto mesmo com o fim da crise de petróleo, sendo que um dos principais focos foi o processo biológico de síntese de P(3HB) (VOLOVA, 2004).

Como o P(3HB) é um composto que além de biodegradável é biocompatível, o mesmo encontrou grande demanda na área biomédica, sendo utilizado na produção de suturas, curativos, emplastros, pinos ortopédicos, tipoias, *stents* cardíacos, recuperadores de cartilagem, guias nervosas, etc (CHEN; WU, 2005). Além disso, o P(3HB) ainda apresenta potencial como agente encapsulante e pode ser utilizado em sistemas de entrega de medicamentos ou tratamentos terapêuticos a longo prazo (BONARTSEV *et al.*, 2006).

Na indústria de alimentos o foco na utilização do P(3HB) está voltado para a produção de embalagens, trabalhando com parâmetros tais como a transparência, maleabilidade e resistência e formas de melhorar estas propriedades (usualmente blendagem com PLA ou copolimerização com P(3HV)) (ANSARI; FATMA, 2014; BUCCI; TAVARES; SELL, 2005, 2007; SIRACUSA *et*



*al.*, 2008). Alguns estudos vem sendo feitos ainda sobre a possibilidade da utilização de blendas de P(3HB), geralmente com PLA como filmes para produtos vegetais (ARRIETA *et al.*, 2014)

Atualmente, já existem algumas empresas investindo neste processo, seja em escala industrial ou piloto, sintetizando P(3HB) para fins comerciais ou de pesquisa (Tabela 1).

Tabela 1 – Produção Mundial de PHAs (Adaptado de SHEN, HAUFE & PATEL, 2009)

Companhia	Local	Matéria prima	PHAs	Nome comercial	Escala	Produção (2007)	Expectativa de Produção (2020)
Tianan	China	Glicose de milho	P(3HB-co-3HV)	Emmat	Industrial	2.000 t·Ano <sup>-1</sup>	50.000 t·Ano <sup>-1</sup>
Telles	EUA	Glicose de milho	Co-polímeros de P(3HB)	Mirel	Industrial	250 t·Ano <sup>-1</sup>	50.000 t·Ano <sup>-1</sup>
Kaneka	Japão	Glicose de milho	P(3HB-co-3HHx)	Kaneka	Piloto/Industrial	100 t·Ano <sup>-1</sup>	50.000 t·Ano <sup>-1</sup>
Green Bio/DSM	China	Açúcar (não especificado)	P(3HB-co-4HB)	Green Bio	Piloto/Industrial	-	-
PHB Industrial	Brasil	Cana de açúcar	P(3HB) / P(3HB-co-3HV)	Biocycle	Pesquisa/Piloto/Industrial	50 t·Ano <sup>-1</sup>	10.000 t·Ano <sup>-1</sup>
Biomer	Alemanha	Sacarose	P(3HB)	Biomer	Pesquisa/Piloto	-	-
Mitsubishi Gas Chemical	Japão	Metanol (gás natural)	P(3HB)	Biogreen	Pesquisa/Piloto	10 t·Ano <sup>-1</sup>	-
Biomatera	Canadá	Açúcar (não especificado)	P(3HB-co-3HV)	Biomatera	Pesquisa/Piloto	-	-
Meridian	EUA	Glicose de milho			Industrial	-	272.000 t·Ano <sup>-1</sup>
Tepha	EUA	Não Especificado	Não Especificado	TephaFlex / TephElast	Pesquisa/Piloto	-	-
Tianzhu	China	Não Especificado	P(3HB-co-3HHx)	Tianzhu	Pesquisa/Piloto	-	-

Para a produção de P(3HB) tanto em escala industrial quanto para fins de pesquisa, os principais substratos utilizados como fontes de carbono são açúcares e/ou melaços. Embora estes compostos apresentem bons rendimentos, os mesmos ainda possuem valor agregado, encarecendo o processo. O custo do substrato para a produção de P(3HB) pode, em alguns casos, chegar a até 45 % do custo total do processo (FACCIN, DÉBORA JUNG LUVIZETTO *et al.*,

2012; KANJANACHUMPOL *et al.*, 2013; LEE, S Y; CHOI; WONG, 1999; NARANJO *et al.*, 2013; POSADA; NARANJO; LÓPEZ; *et al.*, 2011; WU, D. X. *et al.*, 2002).

Outro fator de extrema importância é a aeração do sistema, uma vez que a quantidade de O<sub>2</sub> presente (no caso de culturas aeróbias) pode limitar a concentração de P(3HB) acumulada pelas células (SUTHERLAND, 1998).

### 3.6 Microrganismos produtores de P(3HB)

Como dito anteriormente, em algumas espécies de bactérias, a falta de nutrientes específicos e o excesso de carbono faz com que a célula ative um caminho metabólico, desviando as moléculas de acetil coenzima A (acetil-CoA) do ciclo tricarboxílico para a produção de P(3HB), dando origem ao grânulo de PHA. Em outras espécies, o ciclo tricarboxílico e a rota metabólica que dá origem aos grânulos de P(3HB) são ativadas simultaneamente, através do desvio parcial das moléculas de acetil-CoA para ambos os ciclos (CHANPRATEEP, 2010).

A função principal do P(3HB) é a de agir como fonte de energia reserva, sendo que ao serem consumidos, os grânulos de P(3HB) são convertidos em ácido acetoacético ao longo de uma série de reações enzimáticas (BYROM, 1993; FACCIN, D J L, 2012).

Enquanto no interior da célula, o P(3HB) se apresenta na forma amorfa, contudo, após a extração a cristalinidade deste polímero pode chegar a valores entre 60 % a 80 % (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

Diversos tipos de microrganismos são capazes de armazenar grânulos de P(3HB), utilizando diferentes fontes de carbono e com variados níveis de eficiência, contudo, os microrganismos que mais receberam destaque na produção comercial foram *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas oleovorans*, *Methylobacterium organophilum*, dentre outras (BYROM, 1993; LENZ; MARCHESSAULT, 2005).

Full, Jung & Madigan (2006) cultivaram espécies selvagens de *Bacillus* capazes de degradar rafinose e ao utilizar glicose como fonte de carbono, e obtiveram 3,12 mg·mL<sup>-1</sup> de P(3HB) (90,9 % da biomassa seca). A bactéria capaz

de produzir esta quantidade de polímero apresentou potencial de crescimento em anaerobiose.

*Cupriavidus necator* (antiga *Ralstonia eutropha*) é um microrganismo produtor de P(3HB) que também vem sendo estudado, sendo que o mesmo apresenta um grande potencial de acúmulo de polímero (até 7,48 g·L<sup>-1</sup>) (ARAMVASH *et al.*, 2015). Morais *et al.* (2014), utilizando resíduo graxo da produção de margarina obtiveram valores totais de biomassa seca 11,2 g·L<sup>-1</sup>, com 56 % de P(3HB) (6,4 g·L<sup>-1</sup>) após 20 h de cultivo. *C. necator* foi cultivado também por Huschner *et al.* (2015) em sistema de batelada alimentada, utilizando ácidos e sais orgânicos como substratos. O grupo encontrou um valor de P(3HB)-co-P(3HV) próximo a 83,3 % (93,5 g·L<sup>-1</sup>) do total de biomassa produzida (112,4 g·L<sup>-1</sup>).

### **3.7 *Bacillus megaterium* na produção de P(3HB)**

O *Bacillus megaterium* é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia estrita com capacidade de formação de esporos que pode ser encontrada em diversos *habitats* como o solo, águas marinhas, sedimentos, cultivos de arroz, mel, pescados e alimentos desidratados (VOS *et al.*, 2009). As células de *B. megaterium* apresentam um comprimento próximo a 4 µm e um diâmetro de 1,5 µm, fazendo com que o mesmo seja considerado uma das maiores bactérias (VARY *et al.*, 2007). A Figura 7 mostra células de *B. megaterium* e de *E. coli*, comparando seu tamanho.

O interesse pelo estudo desta bactéria surgiu na década de 1960, onde *B. megaterium* era utilizado como a principal bactéria Gram-positiva para estudos de esporulação, respostas bioquímicas e ação de bacteriófagos, porém quando suas habilidades de produção de proteínas foram descobertas, as mesmas ganharam destaque nas pesquisas (BUNK *et al.*, 2010).

Em função de suas aplicações na produção de substâncias de interesse biotecnológico, *B. megaterium* ainda é um dos focos deste ramo de estudo (FLICKINGER, 2009). *B. megaterium* pode se desenvolver em substratos de baixo custo e não produz endotoxinas. Além disso o mesmo não apresenta proteases alcalinas, que podem vir a degradar os compostos formados ao longo

do cultivo. O *B. megaterium* é muito utilizado na produção de proteínas para a indústria de panificação ( $\alpha$ - e  $\beta$ -amilases) e também é capaz de produzir penicilina amidase, composto essencial utilizado na síntese de novos antibióticos a base de  $\beta$ -lactama (PANBANGRED *et al.*, 2000).

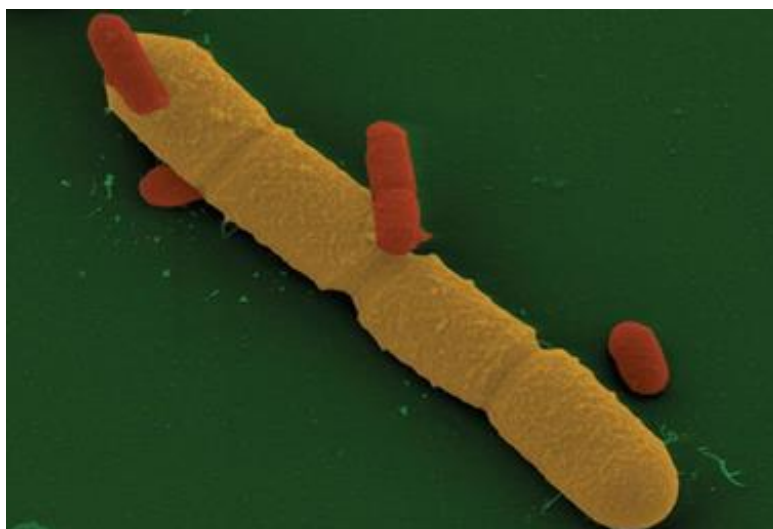


Figura 7 – Comparação morfológica entre células de *B. megaterium* (amarelas) e *E. coli* (vermelhas) (BUNK *et al.*, 2010).

O *B. megaterium* é também capaz de utilizar mais de 62 diferentes fontes de carbono que incluem glicose, lactose, frutose, maltose, trealose, glicerol, além de formatos e acetatos. O gênero possui ainda resistência a condições com elevada temperatura e pressão osmótica, o que facilita sua utilização nos mais variados processos (PANDIAN *et al.*, 2010; PRABHU *et al.*, 2010; VARY *et al.*, 2007; WU, D. X. *et al.*, 2002).

Sobre a utilização do *B. megaterium* como produtor de P(3HB), existem diversos trabalhos utilizando substratos distintos. Omar *et al.* (2001) por exemplo, cultivaram uma cepa selvagem de *B. megaterium*, isolada do lodo de uma estação de tratamento e cultivado em meio de sais minerais com  $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de frutose e uma mistura de oxalato de amônio, nitrato de amônio, nitrato de sódio, acetato de amônio e sulfato de amônio ( $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  cada).

O grupo testou também o comportamento da cepa no meio mineral acrescido de xarope de tâmara. Os cultivos foram conduzidos tanto em estufa rotatória (150 rpm,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 48 h) e biorreator de 42 L (30 L de meio de sais com

xarope). No biorreator, a cultura foi mantida por 24 h, utilizando uma faixa de agitação de 100 a 300 rpm e uma vazão de 0,9 vvm de ar e pH mantido em 7,0.

Como resultados, para a estufa rotatória, encontraram aproximadamente  $3,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de biomassa (52 % de P(3HB)) usando 5 % do xarope e  $2,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de biomassa (17 % de P(3HB)) ao usar frutose como fonte de carbono. No biorreator, utilizou-se 2 % de xarope, sendo que as culturas apresentaram  $3,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de biomassa nas primeiras 14 h (25 % de P(3HB)). Após este ponto, a quantidade de células foi reduzida, provavelmente devido à esporulação. Passadas as 24 h, o grupo encontrou aproximadamente  $2,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de biomassa, contendo um valor de P(3HB) próximo a 17 %.

Por outro lado, Dhangdhariya *et al.* (2015) cultivaram, em estufa rotatória, uma cepa marinha de *B. megaterium* (JK4h) em caldo DSM, visando otimizar o meio de cultura para propiciar o maior acúmulo possível de P(3HB). O grupo testou o efeito da suplementação do meio com peptona, extrato de levedura e glicose em diferentes concentrações.

Seus resultados indicaram que a suplementação do caldo DSM com  $0,3 \text{ g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  de peptona,  $0,075 \text{ g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  de extrato de levedura e  $3 \text{ g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  de glicose apresentaram os melhores resultados. Este cultivo apresentou um acúmulo de  $0,06 \text{ g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  ( $0,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de biomassa com uma concentração de P(3HB) de 55,97 %.

Em outro estudo, Obruca *et al.* (2011) utilizaram soro de leite ( $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactose) com e sem a adição de meio mineral para cultivar *B. megaterium* CCM 2037 (150 rpm,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 50 h). Os autores visualizaram que ao adicionar o meio mineral ao soro, a produção de P(3HB) foi aumentada quase 10 vezes. Realizando um teste de Placket-Burman, o grupo percebeu que a concentração de amônio, fósforo e magnésio não apresentaram influência significativa ( $p>0,05$ ) no acúmulo de biomassa ou P(3HB), porém a pressão osmótica foi um dos fatores de inibição do crescimento celular. Assim, o soro de leite foi diluído para uma concentração de lactose de  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , dando origem a  $2,51 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de biomassa com 31,4 % de P(3HB) ( $0,79 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) após 48 h de cultivo.

Algo interessante que foi abordado neste estudo foi a adição de peróxido de hidrogênio e etanol à cultura como agentes promotores de estresse. Contudo, estes agentes devem ser adicionados ao início da fase estacionária (neste caso,

25 h de cultura). Tanto a adição de etanol quanto peróxido aumentaram o conteúdo de P(3HB), porém o uso de 1 % de etanol aumentou a quantidade de polímero em 41 % em relação ao controle. A influência do peróxido, entretanto, foi muito mais modesta. Como resultados, o estudo encontrou 2,82 g·L<sup>-1</sup> de biomassa no cultivo controle com 37,5 % de polímero (1,05 g·L<sup>-1</sup>). Adicionando então 1 % de etanol, os valores encontrados ao fim da cultura subiram para 2,87 g·L<sup>-1</sup> e 1,48 g·L<sup>-1</sup> (51,57 %) de biomassa e P(3HB), respectivamente.

O aumento da síntese de P(3HB) pela adição de etanol é decorrente do metabolismo de oxidação do etanol que dá origem a Acetil-Coenzima A (Acetil-CoA), uma das moléculas necessárias para o metabolismo de acúmulo de P(3HB) (OBRUCA *et al.*, 2010).

### **3.8 Permeado de soro como meio de cultivo**

As técnicas comerciais empregadas na produção de queijos processados, duros e semiduros dá origem a uma grande quantidade de soro de leite, um líquido pouco viscoso com coloração amarelo-esverdeada, contendo até 55 % dos nutrientes encontrados no leite (proteínas solúveis, lactose, sais minerais e vitaminas) (BARBA *et al.*, 2001). Em função de seu grande volume, estima-se que mais de 50 % de sua produção mundial é descartada em estações de tratamento de efluentes, utilizada como fertilizante em lavouras ou destinada a produção de rações animais (BARBA *et al.*, 2001; KOSIKOWSKI, 1979). Tanto a utilização ou descarte do soro de leite gera dificuldades para a indústria em função de seu volume e sua alta demanda química de oxigênio (DQO) (50 g·kg<sup>-1</sup>) tornando seu descarte problemático (BARBA *et al.*, 2001; GOLOWCZYC *et al.*, 2013).

Por ser rico em proteínas, algo que tem se tornado popular recentemente é o processo de ultrafiltração do soro de leite. O objetivo deste processo é a separação de nutrientes, sobretudo proteínas. Porém, como resultado do processo de ultrafiltração tem-se o acúmulo de grandes quantidades de permeado de soro de leite, rico em sólidos solúveis, principalmente lactose. Em média, o permeado de soro possui cerca de 90 % dos sólidos solúveis totais

inicialmente presentes no soro de leite (HOBMAN, 1984; KRISCHKE; SCHRIFIDER; TRFISCH, 1991; PARENE E., 1989).

Existe uma confusão na literatura referente aos termos “soro desproteinado” e “permeado de soro”. O permeado de soro é definido como o produto oriundo do processo de ultrafiltração, através da ação de diversas membranas. O soro desproteinado é resultado da remoção das proteínas através de tratamentos químicos combinados com aquecimento. Isso faz com que estes produtos apresentem características, composição e comportamentos diferentes, incentivando a distinção entre os mesmos (ZADOW J. G., 1984).

A Tabela 2 apresenta a composição média do permeado de soro e produtos similares. A composição do permeado de soro dependerá não apenas do soro de leite, mas também do sistema de membranas utilizado, suas configurações, condições de operação e ainda na quantidade de sólidos. Porém, como o permeado de soro é essencialmente isento de proteínas, isso facilita sua utilização para a produção de produtos à base de lactose (ZADOW J. G., 1984).

Tabela 2 – Composição média (%) de permeado de leite (desnatado e integral), soro de leite e permeado de soro em base seca (ZADOW J. G., 1984). NNP se refere a nitrogênio não proteico.

Produto	Sódio	Cálcio	Magnésio	Potássio	Cinzas	NNP <sup>1</sup>	Lactose
Permeado de leite desnatado	1,01	0,43	0,11	2,36	10,0	3,43	84,0
Permeado de leite integral	0,84	0,48	0,12	1,99	8,4	3,30	84,0
Permeado de soro de leite	1,12	0,70	0,15	2,74	10,2	3,57	86,0
Soro de leite	0,75	0,70	0,12	2,57	5,0	3,30	77,0

A utilização do permeado de soro em diversos setores industriais vem sendo estudada a algum tempo. Nykänen et al. (1998) avaliaram o efeito de lavagens com permeado de soro na contagem total e características sensoriais de trutas. Este estudo verificou que o tratamento dos peixes com permeado de soro reduziu a contagem de microrganismos e não impactou negativamente nas propriedades organolépticas do produto.

Ainda na década de 90, Norton, Lacroix & Vuilleumard (1994) avaliariam a cinética de produção de ácido láctico em fermentadores contínuos. Neste estudo, foi utilizada uma cultura de *Lactobacillus helveticus* imobilizada em esferas de κ-carragenana, utilizando permeado de soro suplementado com extrato de levedura como meio de cultivo. Foram testados diferentes valores de pH, sendo que a taxa máxima de produção de ácido láctico em pH 5,5 (taxa de diluição 1,21 h<sup>-1</sup>) foi de 28,5 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, um valor maior que o encontrado por Eschlimann, Di' stasi & Von Stockar (1990), que ao cultivar o mesmo microrganismos obtiveram uma produção de 8,27 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> (taxa de diluição 0,40 h<sup>-1</sup>)

A utilização de permeado de soro como meio de cultivo para a produção de PHAs é um campo pouco estudado, porém estudos já indicam que exista esta possibilidade, porém o potencial comercial ainda é desconhecido (POVOLO; CASELLA, 2003).

### **3.9 Efeitos da taxa de transferência de O<sub>2</sub>**

Oxigênio dissolvido (DO) é, usualmente, um nutriente limitado em sistemas de cultivo microbiológicos devido sua baixa solubilidade em água. Para cultivos com bactérias e leveduras, a concentração crítica de oxigênio é geralmente 10 % a 50 % de saturação de ar no meio de cultura (SUTHERLAND, 1998).

Acima do valor crítico, a concentração de oxigênio não limita o crescimento celular. Para otimizar o crescimento é importante que o nível de DO seja mantido acima do valor crítico através do borbulhamento de gás pelo biorreator. A taxa de transferência de massa do oxigênio para o líquido deve ser igual ou maior que a taxa em que as células que estão crescendo consomem o oxigênio (LYDERSEN; D'ELIA; NELSON, 1994).

Ao longo do cultivo, o oxigênio é transferido de um gás (usualmente ar na forma de bolhas) para um líquido, para então ser absorvido pelas células e metabolizado. A taxa de transferência de oxigênio (TTO) é diretamente proporcional ao coeficiente de transferência de massa da fase líquida ( $k_L$ , s<sup>-1</sup>), à área de transferência de massa ( $a$ , m<sup>2</sup>) e ao gradiente de concentração de



oxigênio, com  $C$  e  $C^*$  sendo as concentrações de oxigênio no meio líquido e na interface gás-líquido, respectivamente:

$$TTO = k_L a (C - C^*)$$

A viscosidade do meio influencia na TTO, sendo que quanto maior a viscosidade, mais difícil se o processo se torna (CASAS; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000; LO *et al.*, 2001).

A TTO de um biorreator também é influenciada por características como geometria biorreator, propriedades do líquido, dissipação de energia no fluido, propriedades biocatalisadoras, concentração e morfologia dos microrganismos (BANDAIPHET; PRASERTSAN, 2006). A Figura 8 demonstra a relação entre as variáveis do processo e a TTO.

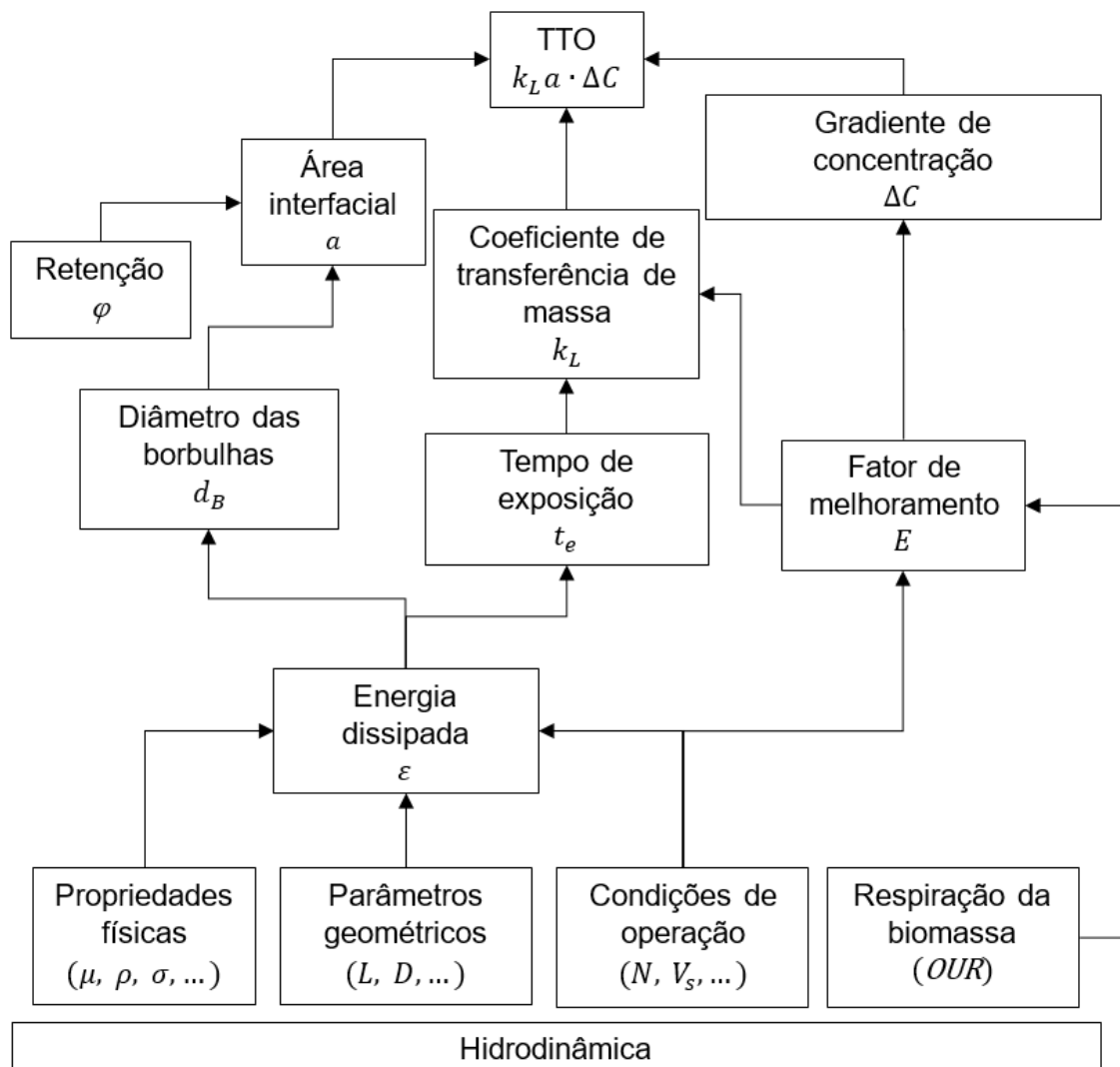


Figura 8 – Relação entre variáveis de bioprocessos que afetam a taxa de transferência de oxigênio (Adaptado de KANE, 2012)

A medição do coeficiente volumétrico de transferência de massa ( $k_La$ ), oferece informações pois descreve a eficiência com que o oxigênio é dissolvido em um determinado biorreator em condições de operação específicas. Medir o valor de  $k_La$  permite também realizar ajustes finos na taxa de oxigenação para otimização de processos e previne o desperdício de energia e custos decorrentes da utilização de oxigênio em excesso (KANE, 2012).

O suprimento de  $O_2$  é um parâmetro decisivo no cultivo de bactérias do gênero *bacillus*, embora os resultados encontrados na literatura sejam um tanto contraditórios (FACCIN *et al.*, 2013; MOUNSEF *et al.*, 2015). Sarrafzadeh & Navarro (2005), por exemplo, visualizaram o efeito da taxa de aeração na esporulação de *B. thuringiensis*, onde o grupo verificou que ao remover a aeração do sistema, a esporulação da cultura foi de 100 %. Aumentando a quantidade de oxigênio, houve uma redução na taxa de esporulação, porém ocorreu um aumento da toxicidade da cultura.

Similarmente, Sen & Swaminathan (1997) perceberam que culturas em biorreator que utilizam baixas velocidades de agitação com alta taxa de aeração favorece a biossíntese de surfactina por *Bacillus subtilis*. Para cultivos em estufa rotatória, Jacques *et al.* (1999) apontam que rotações maiores também propiciam o acúmulo de metabólitos por bactérias do gênero *bacillus*.

Em relação a produção de P(3HB) e outros PHAs por *Bacillus sp.*, ainda existem poucos estudos que trabalham com a otimização do processo em biorreator que considerem o efeito da oxigenação e  $k_La$  na produtividade de polímero (PHILIP *et al.*, 2009). Estes autores avaliaram o efeito do pH e da velocidade de agitação na produção de P(3HB) por *Bacillus cereus* e perceberam que ao utilizar velocidades de agitação elevadas (500 rpm) não houve acúmulo de polímero ao longo do período de cultivo (72 h), algo que o grupo atribui a possíveis alterações metabólicas devido a possível lise ou dano das células causada pela turbina do reator. Por outro lado, ao utilizar uma velocidade de agitação de 50 rpm, não houve crescimento celular, o que indica que esta velocidade de agitação não foi capaz de suprir a necessidade de  $O_2$  da cultura.

A produção de P(3HB) foi avaliada utilizando duas velocidades de agitação (125 e 250 rpm), sendo que o grupo notou que uma maior quantidade

de polímero (34 %) foi acumulada ao se utilizar uma agitação mais baixa, enquanto que a velocidade de agitação mais elevada gerou menos polímero (29 %) (PHILIP *et al.*, 2009).

Faccin *et al.* (2013) também testaram a influência de diferentes  $k_La$ s no acúmulo de P(3HB) por *B. megaterium* e perceberam que a maior quantidade de P(3HB) (3,3 g·L<sup>-1</sup>, 62 %) foi obtida ao se utilizar um  $k_La$  de 0,006 s<sup>-1</sup>, sendo que valores superiores a 0,013 s<sup>-1</sup> apresentaram concentrações reduzidas de polímero. Os autores também apontam que em valores baixos de  $k_La$ , a produção de P(3HB) segue uma cinética lenta, porém constante, um comportamento diferente do observado em  $k_La$ s superiores a 0,013 s<sup>-1</sup>, onde ocorre um rápido acúmulo de P(3HB), seguido por um consumo do mesmo ao longo das etapas finais do cultivo.

Em contrapartida, Kulpreecha *et al.* (2009), também cultivaram *B. megaterium* e perceberam que ao aumentar a concentração de O<sub>2</sub> dissolvido de 60 % para 80 %, nenhuma diferença significativa na concentração de P(3HB) foi encontrada, embora o crescimento celular tenha sido reduzido. Além disso, os autores apontaram que ao reduzir a quantidade de O<sub>2</sub> dissolvido de 60 % para 40 %, o tempo de cultivo foi prolongado e a produtividade, reduzida drasticamente, algo interessante, se comparados aos resultados encontrados nos estudos citados anteriormente.

### **3.10 Principais formas de extração e separação**

Outra etapa importante na cadeia produtiva do P(3HB) e demais PHAs, é a forma empregada para remover os grânulos de polímero do interior das células. Atualmente diversos processos de separação podem ser utilizados, como por exemplo, extração com solvente, rompimento celular por ação mecânica, digestão da biomassa, extração supercrítica, etc (KUNASUNDARI; SUDESH, 2011).

A extração por solvente é o método de separação mais empregado, utilizando compostos como clorofórmio, dicloreto, alguns álcoois (com cadeia de 4 a 10 carbonos), ésteres, cetonas, dentre outros (KESSLER *et al.*, 2001; POSADA; NARANJO; LOPEZ; *et al.*, 2011). Neste método, o solvente permeia

o interior da célula, solubilizando os grânulos de polímeros, que são depois precipitados em um composto não solvente, como água ou etanol.

Outra forma de separação é a digestão celular, que pode ocorrer pela ação de agentes químicos ou enzimas. Durante este processo, o material celular (proteínas, lipídios, carboidratos, etc.) é digerido, enquanto os grânulos de polímero permanecem. Quando o processo utiliza agentes químicos, os mais comuns incluem surfactantes, detergentes e hipoclorito de sódio. No processo enzimático entretanto, enzimas atacam a membrana celular, causando sua degradação. Os principais tipos de enzimas incluem fosfolipases, proteases, lecitinases, dentre outras (KESSLER *et al.*, 2001; POSADA; NARANJO; LOPEZ; *et al.*, 2011).

Embora estes métodos possuam uma eficiência considerável, uma metodologia que vem sendo estudada recentemente é a extração por fluido supercrítico, onde os principais fluidos são CO<sub>2</sub>, amônia e metanol (KUNASUNDARI; SUDESH, 2011). Testes com CO<sub>2</sub> apresentam uma grande eficiência na extração de lipídeos e demais compostos hidrofóbicos. A extração supercrítica permite também que o polímero extraído tenha um alto grau de pureza (HEJAZI; VASHEGHANI-FARAHANI; YAMINI, 2003; KESSLER *et al.*, 2001; RIEDEL *et al.*, 2013).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismo utilizado

O microrganismo utilizado foi a bactéria *Bacillus megaterium* DSMZ 32<sup>T</sup> cedida pelo Laboratório de Bioprocessos da COPPE/UFRJ. A bactéria utilizada nos experimentos foi mantida sob refrigeração (-20 °C ± 2 °C) em solução crioprotetora até o momento de sua utilização.

### 4.2 Meio de cultivo

Como meio de cultivo, utilizou-se meio mineral conforme a metodologia proposta por Faccin (2012) e Wang & Lee (1997). Este meio mineral (Tabela 3 e Tabela 4) foi suplementado com diferentes fontes de carbono.

Tabela 3 – Composição do meio mineral

Composto	Concentração
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,6 g·L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g·L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05 g·L <sup>-1</sup>
Ácido Cítrico	0,1 g·L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,01 g·L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,008 g·L <sup>-1</sup>
Sol. micronutrientes	1 mL·L <sup>-1</sup>

Tabela 4 – Composição da solução de micronutrientes

Composto	Concentração
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	300 mg·L <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	200 mg·L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	30 mg·L <sup>-1</sup>
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	30 mg·L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	30 mg·L <sup>-1</sup>
NiSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	30 mg·L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	10 mg·L <sup>-1</sup>

As fontes de carbono utilizadas foram lactose (Dinâmica), sacarose (Sigma-Aldrich) e permeado de soro de leite. O permeado de soro em pó foi adquirido com a empresa Sooro Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda., na cidade de Marechal Cândido Rondon, Paraná.

Em alguns cultivos ocorreu a suplementação do meio de cultivo com fonte de nitrogênio (sulfato de amônio, 2 g·L<sup>-1</sup>). As composições dos meios de cultura estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Composição dos meios de cultura

<b>Fonte de Carbono</b>	<b>Demais componentes</b>
Sacarose (16 g·L <sup>-1</sup> )	Meio mineral + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2 g·L <sup>-1</sup> )
Lactose (16 g·L <sup>-1</sup> )	Meio mineral + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2 g·L <sup>-1</sup> )
Permeado de soro (23 g·L <sup>-1</sup> , 19 g·L <sup>-1</sup> de lactose)	N/A
Permeado de soro (23 g·L <sup>-1</sup> , 19 g·L <sup>-1</sup> de lactose)	Meio mineral
Permeado de soro (23 g·L <sup>-1</sup> , 19 g·L <sup>-1</sup> de lactose)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2 g·L <sup>-1</sup> )
Permeado de soro (23 g·L <sup>-1</sup> , 19 g·L <sup>-1</sup> de lactose)	Meio mineral + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2 g·L <sup>-1</sup> )

### 4.3 Experimentos em estufa rotatória

Os experimentos foram realizados em estufa rotatória (30 °C, 180 rpm, 36 h), em frascos cônicos com capacidade para 250 mL. Cada frasco conteve 50 mL de meio de cultura. Amostras foram retiradas e valores de pH medidos a cada 4 h.

Para o pré-inóculo, 2 mL da solução crioprotetora (contendo *B. megaterium*) foram adicionados em 50 mL de meio mineral com sulfato de amônio (2 g·L<sup>-1</sup>) e glicose (16 g·L<sup>-1</sup>) e incubado em estufa rotatória (30 °C, 180 rpm, 16 h). Ao final deste período a densidade ótica deste subcultivo foi ajustada para 1,0 em um comprimento de onda de 625 nm. Com o subcultivo padronizado, adicionou-se 1 mL do mesmo aos frascos de meio de teste.

#### 4.4 Hidrólise do permeado de soro

Testou-se também a viabilidade da utilização de permeado de soro hidrolisado ( $23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactose) em meio mineral suplementado com sulfato de amônio ( $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Para realizar a hidrólise do permeado, utilizou-se enzima  $\beta$ -galactosidade comercial (Maxilact® LX 5000) proveniente de *Kluymermyces lactis*.

Para realizar a hidrólise, utilizou-se  $300 \mu\text{L}$  de enzima para cada  $200 \text{ mL}$  de amostra. A hidrólise foi mantida até o ponto onde  $90 \%$  da lactose total foi hidrolisada (aproximadamente  $8 \text{ h}$ ). O processo foi conduzido em frascos encamisados, com controle de temperatura ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). A Figura 9 ilustra o aparato experimental utilizado na hidrólise do permeado de soro.



Figura 9 – Processo de hidrólise do permeado de soro.

Para verificar o grau de hidrólise foi empregado o teste de determinação quantitativa de glicose (Spinreact, Espanha). Este método consiste na utilização de glicose-oxidase (GOD) que catalisa a oxidação de glicose em gluconato. O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) formado é detectado por um acceptor cromogênico de oxigênio (fenol e 4-aminofenazona) na presença de peroxidase (POD). A

intensidade da cor formada (rosa a vermelho) é proporcional à concentração de glicose na amostra.

Para a realização na análise, adiciona-se 1 mL da solução 1 (Tabela 6) em 1 mL de amostra não diluída. Após a mistura, a solução é incubada por 20 min à 25 °C. Após a incubação, mediu-se a absorbância da amostra (505 nm). Com a absorbância da amostra, se obtém a concentração de glicose ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) que é convertida então em valor de percentagem. Os testes de hidrólise foram realizados em duplicata.

Tabela 6 – Composição da solução 1 (Spinreact).

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração</b>
TRIS pH 7,4	90 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
Fenol	0,3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
Glicose-oxidase (GOD)	15000 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$
Peroxidase (POD)	1000 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$
4-Aminofenazona	2,6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

#### 4.5 Experimentos em biorreator

Para realizar o estudo em biorreator, utilizou-se o meio a base de permeado de soro que apresentou maior potencial de formação de P(3HB) ao longo dos testes em estufa rotatória.

Os cultivos foram realizados em um vaso fermentador com volume de 5 L. A duração do cultivo foi de 24 h, com amostras e valores de pH retirados em intervalos de 3 h. O equipamento utilizado é composto por uma unidade de controle e um vaso fermentador encamisado da marca BIOSTAT B<sup>TM</sup> (B. Braun Biotech International Co., Alemanha). Acoplados ao vaso fermentador estão sensores de pH e oxigênio dissolvido, bem como um rotor responsável pela agitação do meio de cultura. As Figuras 10 e 11 apresentam o fermentador montado e pronto para ser utilizado e a evolução do cultivo em batelada, respectivamente.





Figura 10 – Biorreator BIostat B™, com eletrodos de pH, oxigênio dissolvido e rotor acoplados à unidade de controle

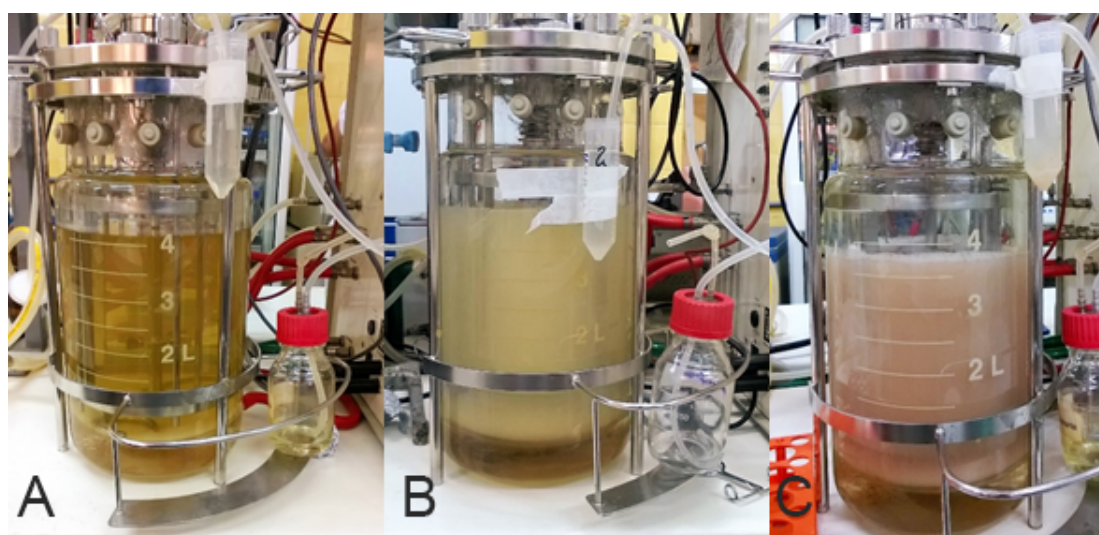


Figura 11 – Evolução do cultivo em batelada de 4 L em 0 h (A), 12 h (B) e 24 h (C)

Os experimentos em biorreator também foram conduzidos em duas etapas, a primeira, cujo foco foi a identificação da velocidade de agitação que melhor propicia o acúmulo de P(3HB) em relação aos dados presentes na literatura (FACCIN, D J L, 2012). A etapa seguinte buscou verificar a influência do pH na taxa de produção de biomassa e polímero.

As características do processo que foram empregadas ao longo dos cultivos podem ser visualizadas na Tabela 7:

Tabela 7 – Parâmetros de controle dos cultivos em biorreator.

<b>Velocidade de Agitação</b>	<b>pH</b>	<b>Aeração</b>
250 rpm	sem controle	4 L·min <sup>-1</sup>
300 rpm	sem controle	4 L·min <sup>-1</sup>
300 rpm	7,0	4 L·min <sup>-1</sup>
300 rpm	7,0 – 6,3	4 L·min <sup>-1</sup>
350 rpm	sem controle	4 L·min <sup>-1</sup>

#### **4.6 Determinação de biomassa**

A metodologia utilizada para determinação de biomassa foi realizada por gravimetria, onde amostras foram coletadas em recipientes secos em estufa e pesados previamente. As amostras foram então centrifugadas a 3000 g por 15 min, lavadas e mantidas em estufa na temperatura de 75 °C até que as mesmas atinjam peso constante.

A quantidade de biomassa foi definida através da massa das células bacterianas mais o polímero armazenado por elas menos a massa do recipiente vazio. A biomassa residual foi então calculada através da subtração da massa de polímero encontrado na amostra do restante da massa da biomassa.

#### **4.7 Determinação de P(3HB)**

A quantidade de polímero produzida ao longo do cultivo foi avaliada através do método apresentado por Riis e Mai (1988), onde o polímero é degradado por propanólise, sendo então quantificado pelo processo de cromatografia gasosa.

Para a realização desta determinação, pesou-se aproximadamente 40 mg de biomassa seca em tubos com vedação de teflon. Adicionou-se então 2 mL de 1,2-dicloroetano, 2 mL de *n*-propanol acidificado (80 % de *n*-propanol mais 20 % de ácido clorídrico) e 200 µL de solução de padrão interno (2 g de ácido benzoico em 50 mL de *n*-propanol).

Os tubos contendo as amostras e os reagentes permaneceram em banho termostatizado a 100 °C por 2 h, sendo agitados em intervalos regulares de 20 min. Após o período de aquecimento, os frascos foram removidos do banho

e mantidos em temperatura ambiente até esfriarem. Ao atingirem temperatura ambiente, adicionou-se 4 mL de água destilada em cada tubo, sendo os mesmos agitados e então armazenados sob refrigeração até a separação das fases (Figura 12).



Figura 12 – Amostras de biomassa após extração de P(3HB)

Após a separação das fases, a fração mais densa (1,2-dicloroetano mais P(3HB)) é removida e armazenada em *vials* de cromatografia gasosa e mantidos a uma temperatura de  $-18 \pm 2$  °C para evitar a evaporação do solvente.

Após este processo, realizou-se a análise por cromatografia gasosa das amostras, bem como a elaboração de uma curva de calibração, utilizando padrão de P(3HB) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Utilizou-se um cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu, Japão (CG-2010 Plus) com detector de ionização de chama (FID). Como coluna, utilizou-se a coluna Rtx®-Wax com comprimento de 30 m. As amostras foram também injetadas automaticamente por injetor automático (AOC-20i, Shimadzu Corp., Japão).

#### 4.8 Medida de açúcares totais

Para avaliar o consumo da fonte de carbono ao longo do cultivo, utilizou-se a metodologia de Dubois et al. (1956), onde 500 µL de amostra diluída são adicionadas em um tubo de ensaio, recebendo então 500 µL de solução de

fenol 5 % e 2,5 mL de ácido sulfúrico P.A. Os tubos foram agitados e mantidos em repouso até atingir temperatura ambiente.

A reação entre os compostos dá origem a uma coloração alaranjada de acordo com a concentração de carboidratos presentes na amostra, a intensidade de cor foi então medida em espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 490 nm. Para minimizar erros, curvas de calibração foram construídas para cada um dos carboidratos avaliados (lactose, sacarose) cada vez que a análise foi realizada.

#### **4.9 Medida de nitrogênio amoniacal**

O consumo de fonte de nitrogênio foi calculado seguindo a metodologia do teste de indofenol, proposta por Weatherburn (1967). Para realizar a análise, duas soluções foram preparadas. Solução A, composta por 5 g de fenol, 25 mg de nitroprussiato de sódio, e 500 mL de água destilada. E solução B, composta por 2,5 g de hidróxido de sódio, 4,2 mL de hipoclorito de sódio (10 – 12 %) e água destilada para 500 mL.

Com as soluções preparadas, 100 µL de amostra diluída foram adicionados a um tubo de ensaio, recebendo, nesta ordem, 5 mL de solução A e 5 mL de solução B. Os tubos foram agitados e mantidos em banho termostatizado a 37 °C em ambiente escuro por 20 min. A reação entre as soluções e a amostra da origem a uma cor azul que foi então medida em espectrofotômetro a 625 nm.

Uma curva de calibração foi elaborada, seguindo o intervalo linear do nitrogênio amoniacal (0,05 a 6 µg). A concentração da curva para sulfato de amônio foi de 0,05 g·L<sup>-1</sup> a 0,3 g·L<sup>-1</sup>, respeitando esta linearidade.

#### **4.10 Quantificação de proteínas totais**

A avaliação da presença de proteínas ao longo do cultivo foi realizada através da metodologia de Lowry et al. (1951), utilizando 4 soluções que devem ser armazenadas sob refrigeração:

- Solução A: 2 g hidróxido de sódio, 10 g carbonato de sódio e água destilada suficiente para 500 mL;

- Solução B: 100 mg tartarato de sódio e potássio, 50 mg sulfato de cobre e água destilada suficiente para 10 mL;
- Solução C: Reagente de Folin-Ciocalteu 1 N;
- Solução D: 50 partes de Solução A para 1 parte de Solução B (preparada no momento do uso).

Para a realização da análise, utilizou-se 100 µL de amostra concentrada, adicionando 2,5 mL da solução D e mantendo as amostras em banho termostatizado a 37 °C por 10 min. A seguir foram adicionados 300 µL de solução C, agitando os frascos imediatamente. Após a agitação dos frascos, os mesmos foram mantidos no escuro por 30 min. A absorbância então foi lida em espectrofotômetro a 750 nm.

#### **4.11 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ )**

A determinação do  $k_La$  foi realizada em meio mineral com permeado de soro hidrolisado sem células a 30 °C. Os valores de  $k_La$  para as diferentes velocidades de agitação foram medidos através da injeção de O<sub>2</sub> até a saturação do meio. Através de uma regressão linear dos dados encontrados é possível isolar o valor de  $k_La$  como coeficiente angular da equação (RECH, 2005).

$$\ln\left(1 - \frac{C}{C^*}\right) = -k_La \cdot t$$

#### **4.12 Análise estatística**

Os resultados encontrados foram submetidos ao teste de ANOVA de fator único e a comparação entre as amostras foi realizada via teste de Tukey através do software STATISTICA 12 (StatSoft/Dell, USA). Diferenças significativas foram aceitas em um nível de 5 % ( $p < 0,05$ ).



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho estão apresentados sob a forma de artigo científico submetido à publicação.

### **Synthesis of P(3HB) by *Bacillus megaterium* in bioreactor cultures using hydrolyzed whey permeate as basic medium**

#### **5.1 Abstract**

This work studied the use of whey permeate as a low cost culture medium for the production of P(3HB) by *Bacillus megaterium*. The effects of pH and volumetric oxygen mass transfer coefficient ( $k_La$ ) on P(3HB) synthesis in bioreactor cultures were also determined. Shaker tests showed the need of nitrogen and mineral supplementation of whey permeate in order to support microbial growth. Because *B. megaterium* displayed a limited ability to grow on lactose, cultures were prepared using supplemented lactose-hydrolyzed whey permeate. These cultures showed high biomass production (5.67 g L<sup>-1</sup>) and P(3HB) concentration (1.92 g L<sup>-1</sup>, 36.4 % of DCW). In batch bioreactor cultures, the highest P(3HB) concentration of 2.17 g L<sup>-1</sup> (50.4 % of the cell dry weight) was achieved under conditions of  $k_La$  of 0.016 s<sup>-1</sup> (stirring speed of 300 rpm and 4 L min<sup>-1</sup> air flow) without pH control. Results suggest that low pH cultures favor biomass accumulation as well as product synthesis. Lactose-hydrolyzed whey permeate showed biomass and P(3HB) productions similar to those on sucrose-based medium, being a promising culture medium to lower industrial P(3HB) production costs.

**KEYWORDS:** Biopolymer; Polyhydroxyalkanoates; Polyhydroxybutyrate; Whey Permeate; *Bacillus megaterium*.

## 5.2 Introduction

Fossil oil-based plastic materials became an integral part of modern society, replacing glass and paper in many applications. Although plastic artifacts possess interesting properties such as durability and mechanical resistance, they also pose a huge environmental problem after their disposal, because of their recalcitrance and low biodegradability (LEE, SANG YUP, 1996).

One possible alternative to oil-based plastics is the use of biodegradable plastics, such as polyhydroxyalkanoates (PHA). These biopolymers have similar physical characteristics with polypropylene and are fully biodegradable by many bacteria found in water and soil (ABDEL; ALI; ROUSHDY, 1998; CHANPRATEEP, 2010; KHANNA, SHILPI; SRIVASTAVA, 2005; SRIDEWI; BHUBALAN; SUDESH, 2006). PHAs are a class of polyesters synthesized by many species of microorganisms as energy storage. Usually, PHAs are synthesized under cell stress conditions, mainly nutrient limitation (nitrogen, oxygen, phosphorus, among others) and excess of a carbon source. However, some bacteria are capable of synthesize PHA as a natural metabolite along their growth.

Polyhydroxybutyrate (P(3HB)) was the first documented PHA in the literature (LENZ; MARCHESSAULT, 2005), showing research and industrial interest because of its thermoplastic properties and biodegradability (OBRUCA *et al.*, 2011). However, the industrial use of P(3HB) is still limited by its high production costs (LEE, S Y; CHOI; WONG, 1999).

The usual culture media for P(3HB) production are molasses (of sugarcane or beet) and corn syrup. Although showing good results for biomass and polymer production, these media are expensive, with the carbon source representing up to 45 % of the total cost of the process (ABDEL; ALI; ROUSHDY, 1998; FACCIN, D J L, 2012; LEE, S Y; CHOI; WONG, 1999; WU, D. X. *et al.*, 2002). Therefore, byproducts or residues of the food industry could be tested as alternative carbon sources to lower P(3HB) production costs.

Whey permeate is an industrial by-product, which is rich in lactose and widely available. Some preliminary studies show the ability of some *Bacillus*



strains to produce P(3HB) growing on whey (GÓMEZ CARDOZO *et al.*, 2016; OBRUCA *et al.*, 2011).

The aims of this work were to determine the potential use of whey permeate as culture medium for biomass and P(3HB) production by *B. megaterium*, a lactose fermenting bacterium capable of synthesizing P(3HB). The need of mineral and nitrogen supplementation of whey permeate was also studied. The results were compared to a lactose-hydrolyzed whey permeate medium. Furthermore, the effects of the volumetric oxygen mass transfer coefficient ( $k_L a$ ) and pH on P(3HB) production by *B. megaterium* were also determined.

### 5.3 Materials and methods

#### 5.3.1 Microorganism and pre-cultures

The microorganism used in this study was the *Bacillus megaterium* strain DSMZ 32<sup>T</sup>. Cell stock was prepared by cultivating *B. megaterium* DSMZ 32<sup>T</sup> in 50 mL of mineral broth (3.6 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 g L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g L<sup>-1</sup> citric acid, 0.01 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 8 mg L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.3 mg L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.2 mg L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.03 mg L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.03 mg L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.03 mg L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.03 mg L<sup>-1</sup> NiSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01 mg L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) supplemented with sucrose (16 g L<sup>-1</sup>) and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 g L<sup>-1</sup>). The culture was incubated for 18 h and then 1 mL of this cell culture was transferred to Eppendorf tubes containing 200 µL of a cryoprotectant solution of glycerol (50 % volume fraction). The cells were kept at -20 °C until the moment of use (FACCIN, DÉBORA JUNG LUVIZETTO *et al.*, 2012).

Pre-cultures were prepared to be used in shaker-flask and bioreactor cultures, 1 mL of glycerol cells stock were transferred to 50 mL of mineral broth supplemented with glucose (16 g L<sup>-1</sup>) and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 g L<sup>-1</sup>) (WANG; LEE, 1997). After an incubation of 16 h, cell suspension was adjusted to optical density 1.0 (650 nm) and a volume of 2 % was used to inoculate shake-flasks and bioreactors.

### 5.3.2 Shake-flask cultivation

Shake-flask cultures were performed to determine whether nitrogen and/or mineral supplementation of whey permeate was needed. Several culture media compositions were tested, and they were composed of sucrose, lactose, or whey permeate supplemented or not with nitrogen ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) and minerals according to Table 8. Sucrose (SMN) and lactose (LMN) media were used as control cultures.

The cultures were performed in 250 mL conic flasks containing 50 mL of culture medium. Incubation lasted for 36 h at 30 °C and 180 rpm. Samples were taken every 4 h for analysis of pH, total sugars, nitrogen, biomass, and P(3HB) concentration.

Assay HWMN was performed with lactose-hydrolyzed whey permeate. Lactose was hydrolyzed using a commercial  $\beta$ -galactosidase (Maxilact® LX 5000, 5000 NLU  $\text{g}^{-1}$ ) from *Kluyveromyces lactis*. The hydrolysis was carried out at 25 °C, using 1.5  $\text{g L}^{-1}$  of enzyme and carried out until 90 % of the total lactose was hydrolyzed.

Table 8 – Media composition tested in this research

Assay	Carbon Source	Other components
SMN	Sucrose ( $16 \text{ g L}^{-1}$ )	Mineral broth + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ( $2 \text{ g L}^{-1}$ )
LNM	Lactose ( $16 \text{ g L}^{-1}$ )	Mineral broth + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ( $2 \text{ g L}^{-1}$ )
W	Whey permeate ( $19 \text{ g L}^{-1}$ )	N/A
WM	Whey permeate ( $19 \text{ g L}^{-1}$ )	Mineral broth
WN	Whey permeate ( $19 \text{ g L}^{-1}$ )	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ( $2 \text{ g L}^{-1}$ )
WMN	Whey permeate ( $19 \text{ g L}^{-1}$ )	Mineral broth + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ( $2 \text{ g L}^{-1}$ )
HWMN	Hydrolyzed whey permeate ( $19 \text{ g L}^{-1}$ )	Mineral broth + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ( $2 \text{ g L}^{-1}$ )

### 5.3.3 Bioreactor cultivation

Batch cultures were conducted on a bench scale 5.0 L vessel (BIOSTAT B™, B. Braun Biotech International Co., Germany) containing 4.0 L of culture media (HWMN). Temperature was kept at 30 °C and air-flow rate at 4  $\text{L air min}^{-1}$ .

The cultures lasted for 24 h, with samples taken every 3 h. The experiments were performed at three different stirrer speeds (250 rpm, 300 rpm and 350 rpm), and three pH profiles (fixed at 7.0; varying from 7.0 to 6.3; and without pH control). The dissolved oxygen concentration was measured using a polarographic oxygen sensor. The volumetric oxygen mass transfer coefficient ( $k_L a$ ) was measured via the static gassing-out method using N<sub>2</sub> to remove the initial oxygen found in the vessel (GARCIA-OCHOA; G, 2009).

### **5.3.4 Analytical procedures**

The samples taken along the cultures were centrifuged (3,000 g, 15 min). The pellets (biomass) were washed four times using distilled water and used for determination of biomass by dry-cell weight and P(3HB) concentration. The supernatant was used to evaluate total sugars, nitrogen, and protein concentrations.

The pellets were dried at 60 °C for dry-cell weight determination (DCW). P(3HB) was determined in the dried biomass using the propanolysis method (RIIS; MAI, 1988). The samples were analyzed using a gas chromatograph (CG-2010 Plus, Shimadzu Corp., Japan) with a flame ionization detector. The column was 30 m in length (Rtx®-Wax). Each test was performed in, at least, duplicate. Pure P(3HB) (Sigma-Aldrich, USA) was used as standard.

Total sugars were analyzed by phenol-sulfuric acid method (DUBOIS *et al.*, 1956). Nitrogen was measured by the indophenol method (WEATHERBURN, 1967). Protein was analyzed following the Lowry method (LOWRY *et al.*, 1951). All tests were performed in, at least, duplicates.

All results were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) and compared by Tukey test at 5 % significance level using Statistica 12.0 software.

## 5.4 Results and discussion

### 5.4.1 Definition of best culture medium for P(3HB) production

In Table 9 are presented the results for the ability of *B. megaterium* DSMZ 32T to grow on different media, clearly showing that a complete mineral composition and the synthetic nitrogen source ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) were essential to sustain cell growth and P(3HB) production, irrespective of the carbon source, being sucrose better than lactose. The use of whey permeate showed to be a poor medium for *B. megaterium* DSMZ 32T growth, irrespective of supplementation. These results corroborate findings reported in the literature. Obruca et al. (OBRUCA *et al.*, 2011) reported a ten-fold increase in P(3HB) production by *B. megaterium* CCM 2037 in cheese whey when using mineral supplementation. The authors suggested that cheese whey would be a poor source of essential salts such as phosphorus, magnesium, and manganese. These authors used a medium composed of 20 g L<sup>-1</sup> of lactose and mineral supplementation, obtaining a biomass of 2.51 g L<sup>-1</sup> and P(3HB) yields of 0.79 g L<sup>-1</sup> (31.47 % of DCW) after 20 h of culture, values which are similar to those found in this work when using WMN medium.

Table 9 – Total biomass (*X*) formed and P(3HB) percentage of cell mass fraction at 36 h of cultivation as a function of the medium used.

Culture medium	<i>X</i> (g·L <sup>-1</sup> )	P(3HB) (% of DCW)	P(3HB) (g·L <sup>-1</sup> )
SMN	4.37 ± 0.06 <sup>a</sup>	50.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	2.19 ± 0.08 <sup>a</sup>
LMN	2.10 ± 0.00 <sup>bc</sup>	19.4 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.45 <sup>a</sup>
W	1.11 ± 0.02 <sup>c</sup>	ND	ND
WM	1.04 ± 0.04 <sup>c</sup>	ND	ND
WN	1.02 ± 0.11 <sup>c</sup>	ND	ND
WMN	2.65 ± 0.44 <sup>b</sup>	46.9 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.00 <sup>a</sup>

Different letters in the same column mean significant difference at  $p < 0.05$  level (Tukey test). ND – not detected

Considering that growth of the bacterium was poor on non-hydrolyzed whey permeate, it was decided to test lactose-hydrolyzed whey permeate (HWMN), supplemented with minerals and nitrogen source (Table 10). New SMN

and WMN cultures were also performed to compare the results (Table 10 and Figure 13).

Table 10 – Total biomass ( $X$ ), P(3HB) concentration and P(3HB) percentage of cell mass fraction at 36 h of cultivation as a function of the medium used.

Culture	$X$ (g·L <sup>-1</sup> )	P(3HB) (% of DCW)	P(3HB) (g·L <sup>-1</sup> )
SMN	4.48 ± 0.12 <sup>ab</sup>	48.9 ± 3.2 <sup>a</sup>	2.19 ± 0.08 <sup>a</sup>
WMN	3.67 ± 0.13 <sup>b</sup>	21.1 ± 0.8 <sup>c</sup>	0.78 ± 0.00 <sup>b</sup>
HWMN	5.27 ± 0.29 <sup>a</sup>	36.5 ± 0.7 <sup>b</sup>	1.92 ± 0.07 <sup>a</sup>

Different letters in the same column mean significant difference at  $p < 0.05$  level (Tukey test).

*B. megaterium* DSMZ 32T showed high biomass and P(3HB) production in lactose-hydrolysed whey permeate. The time courses of cultivations (Figure 13) indicate that *B. megaterium* DSMZ 32T reached stationary phase faster in HWMN culture, compared to SMN and WMN cultures. However, the P(3HB) mass fraction was higher in SMN culture. P(3HB) polymer concentration decreased after 28 h in HWMN and SMN cultures. Faccin et al. (FACCIN, DÉBORA JUNG LUVIZETTO *et al.*, 2013) found a similar behavior, suggesting that this reduction in P(3HB) is probably linked to endogenous consumption of it by the cells, caused by the presence of toxic metabolites generated as metabolic by-products or by cellular disruption.

In the culture where non-hydrolyzed whey permeate was used (WMN), it is possible to identify a clear diauxic profile (Figures 13 A and B), because cells had to hydrolyze lactose before start the consumption of its monomers, and this fact might explain the lower growth and P(3HB) production in these cultures. Nitrogen consumption was similar for all cultures (Figure 13 C), thus there were no alterations in cellular metabolism due to lack of nitrogen.

Regarding pH (Figure 13 D), SMN culture showed a low final pH than WMN and HWMN cultures, probably due a buffering capacity of whey permeate.

Although *B. megaterium* DSMZ 32T grew better in HWMN culture, P(3HB) production was lower compared to SMN medium. Moreno et al. (2015) cultivated wild *B. megaterium* strains in shake flasks using glycerol as carbon source and reported P(3HB) mass fraction of 29 % of DCW. Wu et al. (2001) cultivated

different *Bacillus* sp. strains on shake flasks using molasses containing 50 % of sucrose as carbon source and reported P(3HB) mass fractions close to 45 % of DCW. Comparison of results by these authors and the ones obtained in this work suggest that the metabolism of *B. megaterium* DSMZ 32T on sucrose is better for of P(3HB) synthesis. Despite this fact, HWMN culture medium was chosen for bioreactor cultures in order to try to maximize P(3HB) synthesis because this carbon source is an abundant and cheap agro-industrial residue.

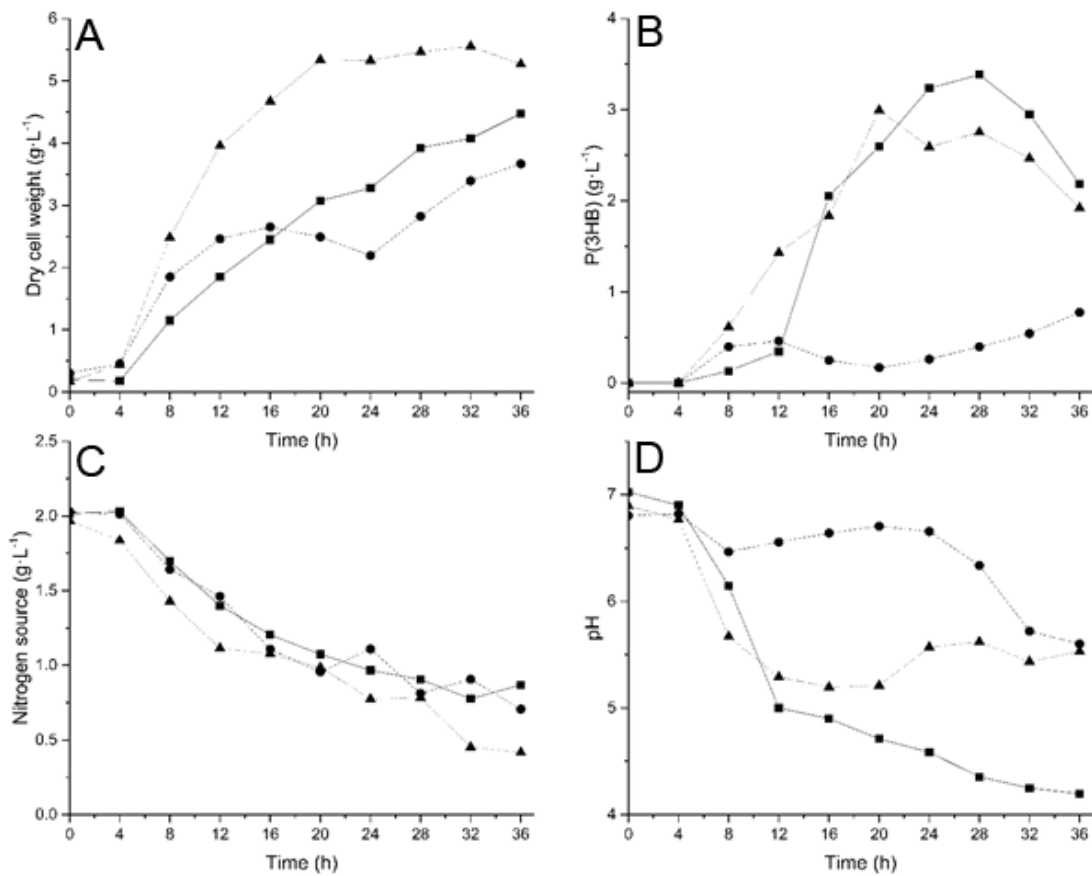


Figure 13 – Time course of *B. megaterium* DSMZ 32T growing in HWMN (▲), SMN (■), and WMN (●) media. Dry cell weight (A), P(3HB) production (B), nitrogen source consumption (C), and pH variation (D). Results represent the mean of duplicates.

#### 5.4.2 Effect of $k_L a$ and pH on P(3HB) production

In a previous study using *B. megaterium* DSMZ 32T grown in sucrose as carbon source, it was demonstrated that the volumetric oxygen mass transfer

coefficient ( $k_L a$ ) affected P(3HB) mass fraction production (FACCIN, DÉBORA JUNG LUVIZETTO *et al.*, 2013). The authors reported that a  $k_L a$  value of  $0.006 \text{ s}^{-1}$  generated the highest amount of (P3HB) (62 % CDW,  $3.3 \text{ g L}^{-1}$ ), with lower and higher values negatively affecting P(3HB) production (FACCIN, DÉBORA JUNG LUVIZETTO *et al.*, 2013). Since in our work medium composition, in special carbon source, were different, we decided to test the effects of  $k_L a$  variation on cell formation and P(3HB) production ( $k_L a$  values of  $0.011 \text{ s}^{-1}$ ,  $0.016 \text{ s}^{-1}$ , and  $0.022 \text{ s}^{-1}$ , as functions of agitation speed). The cultures were conducted in batch mode using HWMN as culture medium. Results are depicted in Table 11 and Figures 14, 15, and 16.

Table 11 – The effect of  $k_L a$  on total biomass, P(3HB) concentration at the end of the culture, and P(3HB) productivity ( $P_{P(3HB)}$ ) at 21 h of culture.

Stirrer Speed (rpm)	$k_L a$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$X$ ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	P(3HB) (% of DCW)	P(3HB) ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$P_{P(3HB)}$ ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )
250	0.011	$4.15 \pm 0.06^b$	$49.6 \pm 6.0^a$	$2.05 \pm 0.22^a$	$0.084 \pm 0.012^a$
300	0.016	$4.50 \pm 0.18^{ab}$	$48.3 \pm 2.3^a$	$2.17 \pm 0.02^a$	$0.099 \pm 0.005^a$
350	0.022	$5.17 \pm 0.16^a$	$38.0 \pm 7.4^a$	$1.98 \pm 0.32^a$	$0.087 \pm 0.026^a$

Data are the mean on two independent experiments. Different letters in the same column mean significant difference at  $p < 0.05$  level (Tukey test).

Although we could observe an increase in biomass formation proportional to  $k_L a$  increase ( $p = 0.033$ ),  $k_L a$  variation produced no effect on P(3HB) concentration ( $p = 0.84$ ), P(3HB) mass fraction ( $p = 0.43$ ), or P(3HB) productivity ( $p = 0.81$ ).

López *et al.* (LÓPEZ *et al.*, 2012) reported that low oxygen supply to the culture favored cell P(3HB) accumulation in batch cultures of *B. megaterium* using glucose as carbon source. On the other hand, Kulpreecha *et al.* (KULPREECHA *et al.*, 2009), described an opposite behavior when batch cultivating *B. megaterium* in sugar cane molasses at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  and pH 7.0. Explanation for these inconclusive effect of  $k_L a$  upon P(3HB) production by *B. megaterium* might be attributed to strain characteristics and media composition.

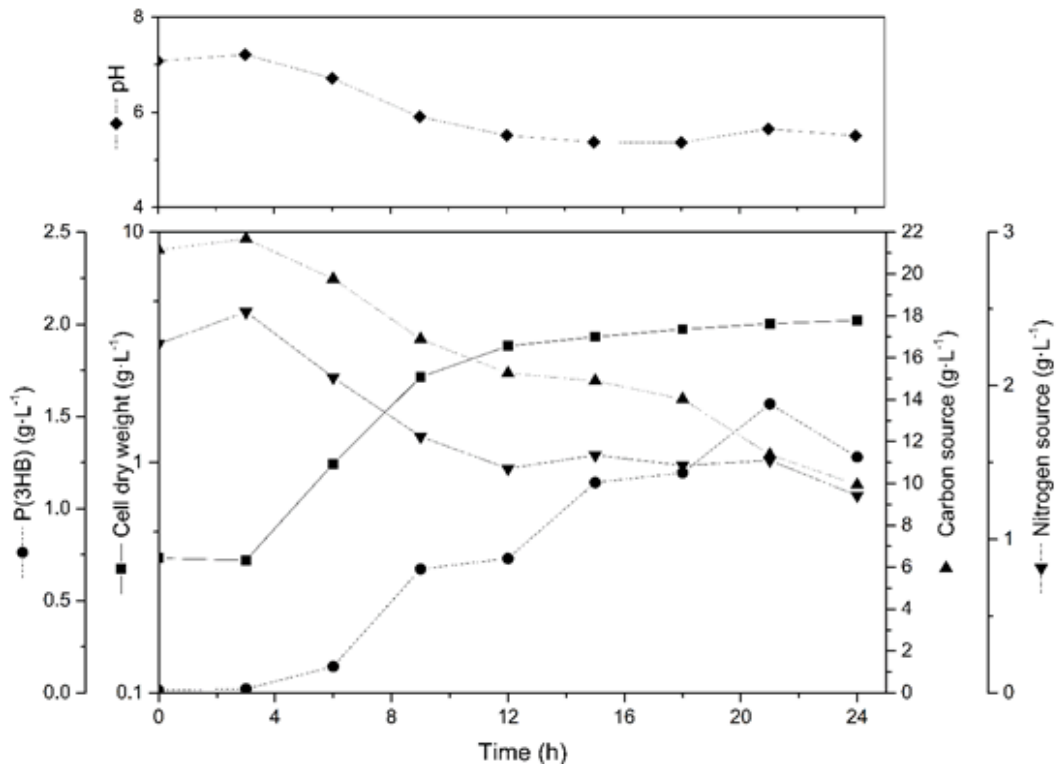


Figure 14 – Time course of *B. megaterium* culture for a  $k_L a$  value of  $0.011 \text{ s}^{-1}$ ,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  and without pH control. Results are the mean of duplicates.

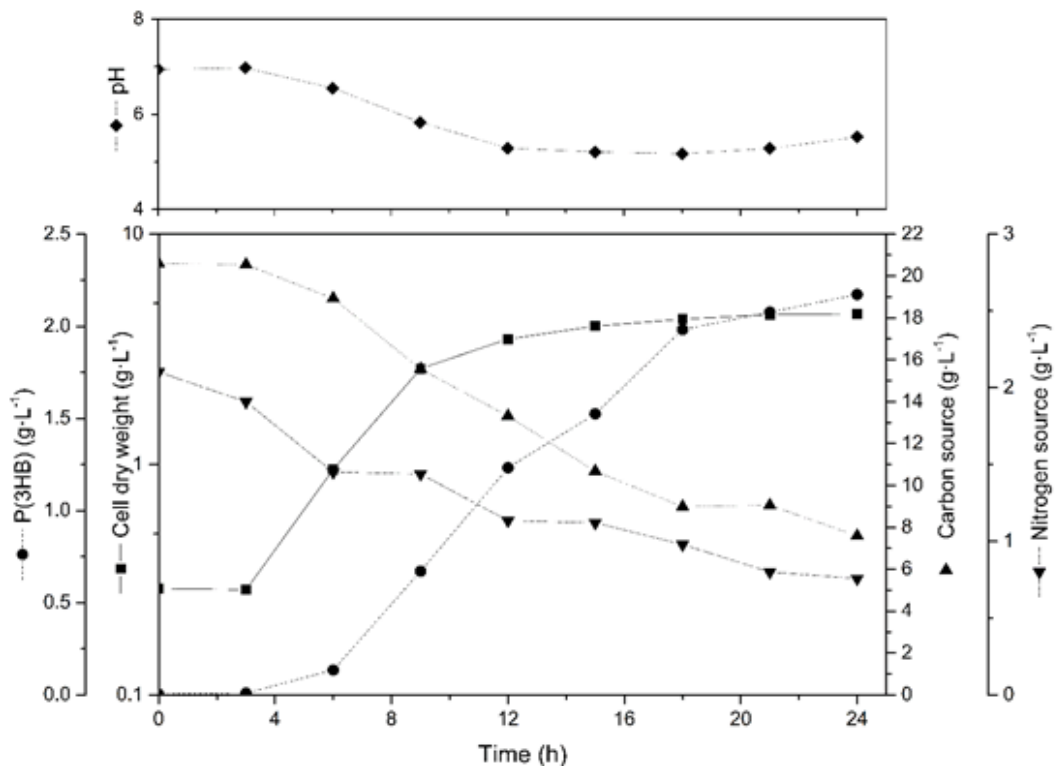


Figure 15 – Time course of *B. megaterium* culture for a  $k_L a$  value of  $0.016 \text{ s}^{-1}$ ,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  and without pH control. Results are the mean of duplicates.



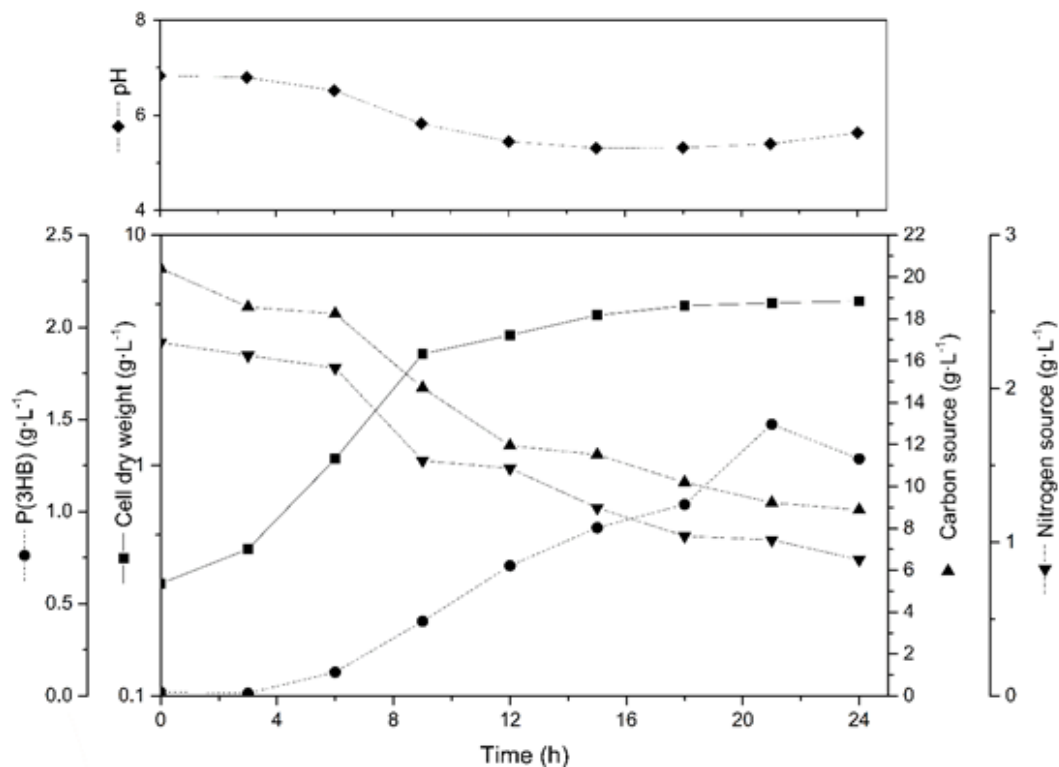


Figure 16 – Time course of *B. megaterium* culture for a  $k_L a$  value of  $0.022 \text{ s}^{-1}$ ,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  and without pH control. Results are the mean of duplicates.

In the experiments to test  $k_L a$ , we kept pH uncontrolled. In all cultures, there was steady reduction of pH down to 5.0 at the end of the exponential growth phase (~12 h, Figures 14, 15, and 16).

We tested the effect of pH control on biomass and P(3HB) production by *B. megaterium* DSMZ 32. Three cultures were performed at  $k_L a$  of  $0.016 \text{ s}^{-1}$  and three different pH profiles: uncontrolled pH; with pH controlled at 7.0; and initial pH of 7.0 and varying down to 6.3 (Table 12, Figures 17 & 18). This last experiment was set in order to have a somewhat intermediate point between neutrality and the experimental data found on the cultures with uncontrolled pH.

Results show that cultures with no pH control allowed for highest amount of biomass ( $4.50 \text{ g L}^{-1}$ ), highest P(3HB) production ( $2.17 \text{ g L}^{-1}$ ; 48.3 % DCW), and highest P(3HB) productivity ( $0.099 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

Similar behavior was reported by Philip et al. (PHILIP *et al.*, 2009) who tested the effect of impeller speed and pH (pH-stat, pH 3.0, 6.8, and 10.0) in *B.*

*cereus* cultures, the low pH conditions increasing P(3HB) amount and preventing its degradation.

Table 12 – The effect of pH on total biomass, P(3HB) concentration at the end of the culture, and P(3HB) productivity ( $P_{P(3HB)}$ ) at 21 h of culture.

pH	$X$ (g·L <sup>-1</sup> )	P(3HB) (% of DCW)	P(3HB) (g·L <sup>-1</sup> )	$P_{P(3HB)}$ (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
uncontrolled	4.50 ± 0.18 <sup>a</sup>	48.3 ± 2.3 <sup>a</sup>	2.17 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.099 ± 0.005 <sup>a</sup>
7.0 – 6.3	3.77 ± 0.01 <sup>b</sup>	36.8 ± 0.7 <sup>b</sup>	1.39 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.058 ± 0.000 <sup>b</sup>
7.0	3.71 ± 0.01 <sup>b</sup>	25.1 ± 1.1 <sup>c</sup>	0.93 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.048 ± 0.007 <sup>b</sup>

Data are the mean on two independent experiments. Different letters in the same column mean significant difference at  $p < 0.05$  level (Tukey test).

Our results contrast with results reported by Pandian et al. (PANDIAN *et al.*, 2010), who cultivated *B. megaterium* SRKP<sup>3</sup> cells in dairy waste and seawater, obtaining the highest P(3HB) production (11.32 g L<sup>-1</sup>) when setting the culture to pH 9.0. In another study, Kulpreecha et al. (KULPREECHA *et al.*, 2009) cultivated *B. megaterium* in a mineral salts medium, with sucrose and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, uncontrolled and controlled pH of 6.0, 7.0, and 8.0, and observed that the highest P(3HB) production was achieved at pH 7.0 (5.41 g L<sup>-1</sup>; 61.62 % of DCW). Biomass was highest, however, in cultures at controlled pH 8.0 and at uncontrolled pH. The authors suggested that increased polymer production occurred at pH 7.0 because this is the optimal cell environment for many enzymes in P(3HB) synthesis metabolic pathway. Macrae & Wilkinson (MACRAE; WILKINSON, 1958) suggested that the optimum pH for P(3HB) synthesis by *B. megaterium* is around 7.5, whereas the optimum pH for cell growth is in between 6.0 to 8.0, according to Andalib et al. (ANDALIB *et al.*, 2016).

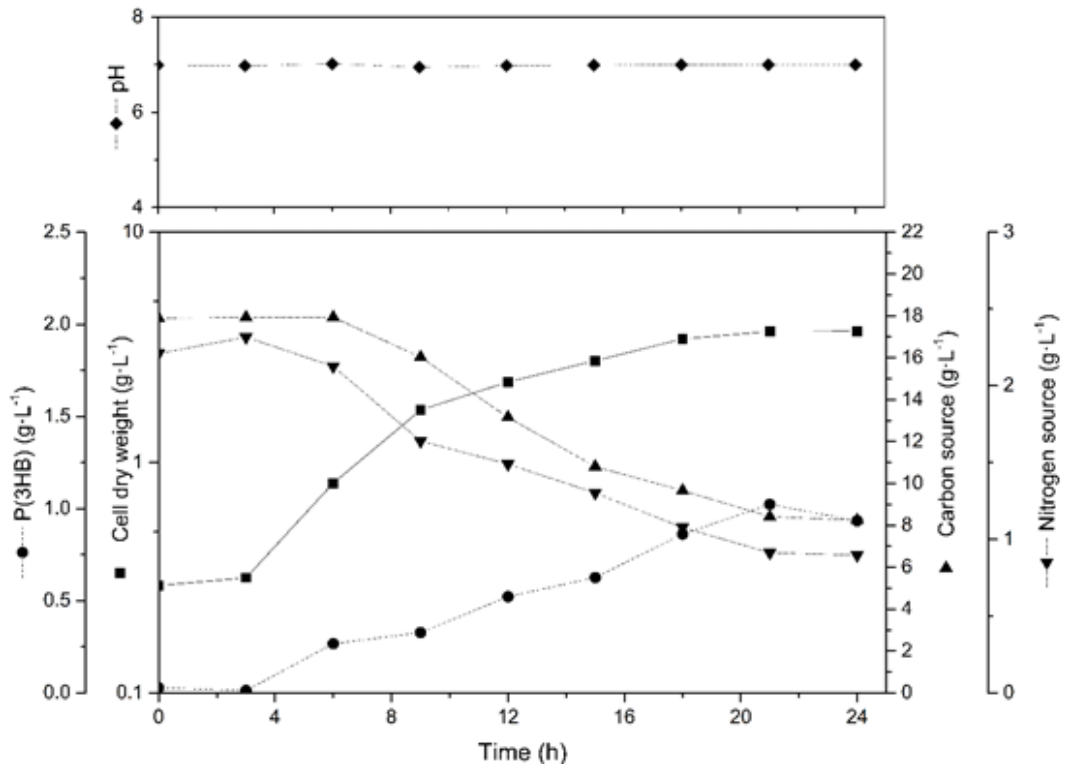


Figure 17 – Time course of *B. megaterium* culture for a  $k_La$  value of  $0.016 \text{ s}^{-1}$ ,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  and pH controlled at 7.0. Results are the mean of duplicates.

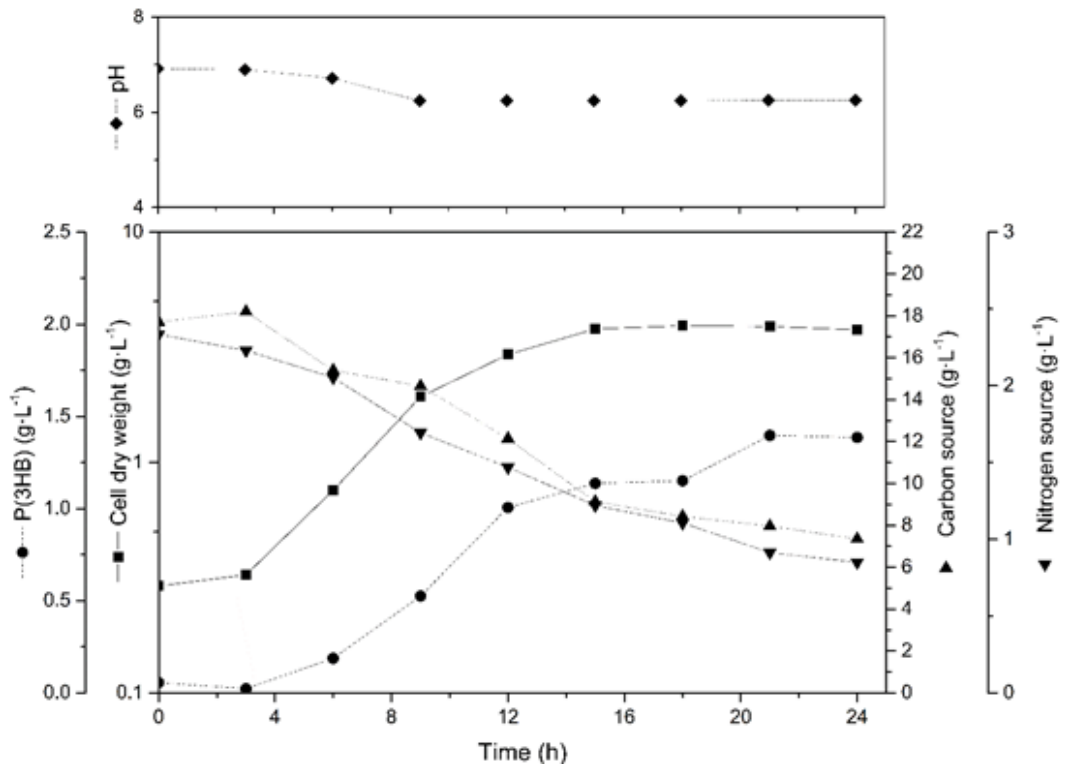


Figure 18 – Time course of *B. megaterium* culture for a  $k_La$  value of  $0.016 \text{ s}^{-1}$ ,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  and pH varying from 7.0 to 6.3. Results are the mean of duplicates.

## 5.5 Conclusions

Initial tests showed that *B. megaterium* has a low ability to grow on lactose as the sole carbon source. However, by using lactose-hydrolyzed whey permeate, *B. megaterium* is able to produce high amounts of P(3HB) after 24 h (48.6 % of total dry biomass), a considerable amount compared to the literature. In this work we found that low  $k_L a$  values favored P(3HB), whereas pH in the range of 5.0 to 5.5 was best for biomass and P(3HB) production. Results in this research suggest that hydrolyzed whey permeate is a viable and cheap carbon source for the production of P(3HB).

## 6 CONCLUSÃO

Ao longo do presente trabalho foi possível observar que *B. megaterium* quando cultivado em permeado de soro de leite necessita de fontes suplementares de nitrogênio e micronutrientes. Os testes iniciais mostraram também que *B. megaterium* tem uma baixa capacidade de crescer em lactose como única fonte de carbono. No entanto, realizando uma hidrólise da fonte de carbono, *B. megaterium* foi capaz de produzir quantidades elevadas de P(3HB), após 24 h (48,6% de biomassa seca total), uma quantidade considerável de acordo com a literatura disponível.

Testes no biorreator apresentaram uma concentração similar de P(3HB) (48,3% da biomassa total). Os testes em biorreator também demonstraram que uma maior acidez do meio de cultura estimula a produção de polímero, porém percebeu-se também que a taxa de formação de biomassa e produto são inversamente proporcionais de acordo com a taxa de oxigenação. Cultivos que utilizaram  $k_L$ s menores permitiram um maior acúmulo de P(3HB) porém apresentaram uma quantidade reduzida de biomassa.

O pH também altera o comportamento celular, sendo que culturas que tiveram o pH mantido em 7,0 apresentaram a menor quantidade de biomassa entre todas as culturas, o que contraria certos dados encontrados na literatura. Notou-se ainda que ao reduzir o pH para uma faixa entre 5,0 a 5,5, a biomassa e a quantidade de P(3HB) aumentou consideravelmente.

Com isso em mente podemos dizer que permeado de soro de leite é uma fonte de carbono viável para a produção de P(3HB) se oferecido em sua forma hidrolisada. O uso do permeado de soro como fonte de carbono, em função de seu preço relativamente baixo, pode ajudar a reduzir a o custo de produção do P(3HB). Além disso, devido às grandes quantidades de permeado de soro descartados como efluente, a sua utilização na cadeia de produção P(3HB) pode ajudar a aliviar os impactos ambientais causados por ele, bem como os custos de tratamento por parte da indústria.



## **7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Futuramente poderão ser estudadas formas de extração de P(3HB) com utilização de outras tecnologias de separação, como por exemplo a tecnologia supercrítica. Isto permitirá uma melhor difusão de embalagens a base P(3HB) para produtos alimentícios.

Atualmente grande parte dos processos de separação utilizam compostos clorados e solventes orgânicos como clorofórmio e éter para solubilizar os grânulos de polímero. Caso o processo de recuperação do solvente não seja adequada isto pode fazer com que ocorra migração do cloro da embalagem para o produto, que no caso de alimentos pode causar grandes riscos à saúde do consumidor.

Encontrar novas formas de extração sem a utilização de compostos nocivos auxiliará na produção de embalagens completamente biodegradáveis, sobretudo para produtos de porção única, reduzindo os efeitos ambientais do acúmulo de plásticos, e incentivando o consumo sustentável.





## 8 REFERÊNCIAS

ABDEL, A.; ALI, A.; ROUSHDY, I. M. Fermentation of milk permeate by proteolytic bacteria for protease production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 74, n. 2, p. 85–93, 1998.

AESCHLIMANN, A.; DI STASI, L.; VON STOCKAR, U. Continuous production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus* in two chemostats in series. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 12, n. 12, p. 926–932, dez. 1990.

ANDALIB, R. *et al.* Optimum concentration of *Bacillus megaterium* for strengthening structural concrete. *Construction and Building Materials*, v. 118, p. 180–193, 2016.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological reviews*, v. 54, n. 4, p. 450–72, dez. 1990.

ANSARI, S.; FATMA, T. Polyhydroxybutyrate – a Biodegradable Plastic and its Various Formulations. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, v. 3, n. 2, 2014.

ARAI, Y. Synthesis of a Novel Class of Polyhydroxyalkanoates in Arabidopsis Peroxisomes, and Their Use in Monitoring Short-Chain-Length Intermediates of  $\beta$ -Oxidation. *Plant and Cell Physiology*, v. 43, n. 5, p. 555–562, 15 maio 2002.

ARAMVASH, A. *et al.* Statistical physical and nutrient optimization of bioplastic polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 12, n. 7, p. 2307–2316, 4 fev. 2015

ARRIETA, M. P. *et al.* Ternary PLA–PHB–Limonene blends intended for biodegradable food packaging applications. *European Polymer Journal*, v. 50, p. 255–270, jan. 2014.

BANDAIPHET, C.; PRASERTSAN, P. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient,  $kLa$  in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, n. 2, p. 216–228, out. 2006.

BARBA, D. *et al.* Kinetic analysis of *Kluyveromyces lactis* fermentation on whey: batch and fed-batch operations. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 6, p. 531–536, 2001.

BASTIOLI, C. *Handbook of Biodegradable Polymers*. [S.l.]: Rapra Publishing, 2005.

BONARTSEV, A. P. *et al.* New poly-(3-hydroxybutyrate)-based systems for controlled release of dipyridamole and indomethacin. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*, v. 42, n. 6, p. 710–5, jan. 2006.

BUCCI, D. Z.; TAVARES, L. B. B.; SELL, I. Biodegradation and physical evaluation of PHB packaging. *Polymer Testing*, v. 26, n. 7, p. 908–915, out. 2007.

BUCCI, D. Z.; TAVARES, L. B. B.; SELL, I. PHB packaging for the storage of

- food products. *Polymer Testing*, v. 24, n. 5, p. 564–571, ago. 2005.
- BUNK, B. *et al.* A short story about a big magic bug. *Bioengineered bugs*, v. 1, n. 2, p. 85–91, jan. 2010.
- BYROM, D. The synthesis and biodegradation of polyhydroxyalkanoates from bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 31, n. 3, p. 199–208, 1993.
- CASAS, J. .; SANTOS, V. .; GARCÍA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties☆. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, n. 2–4, p. 282–291, fev. 2000.
- CHAMY, R.; ROSENKRANZ, F. *Biodegradation-Life of Science*. 2013.
- CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Cited By (since 1996):58Export Date: 4 April 2014Source: Scopus, v. 110, n. 6, p. 621–632, 2010.
- CHEN, G.-Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, v. 26, n. 33, p. 6565–78, nov. 2005.
- DHANGDHARIYA, J. H. *et al.* Polyhydroxyalkanoate from marine *Bacillus megaterium* using CSMCRI's Dry Sea Mix as a novel growth medium. *International journal of biological macromolecules*, v. 76, p. 254–61, maio 2015.
- DOI, Y.; STEINBÜCHEL, A. *Biopolymers, Volume 3b, Polyesters II – Properties and Chemical Synthesis*, 2002.
- DUBOIS, M. *et al.* COLORIMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF SUGARS AND RELATED SUBSTANCES. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- FACCIN, D. J. L. *Avaliações das condições de cultivo para aumento da produção de P(3HB) por Bacillus megaterium e modelagem do bioprocesso*. 2012. 138 f. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.
- FACCIN, D. J. L. *et al.* Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. *Process Biochemistry*, v. 48, n. 3, p. 420–425, 2013.
- FACCIN, D. J. L. *et al.* Modeling P(3HB) production by *Bacillus megaterium*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 87, n. 3, p. 325–333, 2012.
- FLICKINGER, M. C. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- FLIEGER, M. *et al.* Biodegradable plastics from renewable sources. *Folia Microbiologica*, v. 48, n. 1, p. 27–44, jan. 2003.
- FULL, T. D.; JUNG, D. O.; MADIGAN, M. T. Production of poly-beta-hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. *Letters in applied microbiology*, v. 43, n. 4, p. 377–84, out. 2006.
- GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate

in microbial processes: an overview. *Biotechnology advances*, v. 27, n. 2, p. 153–76, jan. 2009.

GOLOWCZYC, M. *et al.* Use of whey permeate containing in situ synthesised galacto-oligosaccharides for the growth and preservation of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Dairy Research*, v. 80, n. 3, p. 374–381, 2013.

GÓMEZ CARDOZO, J. R. *et al.* Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoates and Native Microorganisms Synthesized from Fatty Waste. *International Journal of Polymer Science*, 2016.

HALLEY, P. J.; DORGAN, J. R. Next-generation biopolymers: Advanced functionality and improved sustainability. *MRS Bulletin*, v. 36, n. 9, p. 687–691, 16 set. 2011.

HAZER, B.; STEINBÜCHEL, A. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 74, n. 1, p. 1–12, mar. 2007.

HEJAZI, P.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; YAMINI, Y. Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly(beta-hydroxybutyrate) recovery. *Biotechnology progress*, v. 19, n. 5, p. 1519–23, jan. 2003.

HOBMAN, P. G. REVIEW OF PROCESSES AND PRODUCTS FOR UTILIZATION OF LACTOSE IN DEPROTEINATED MILK SERUM. *Journal of Dairy Science*, v. 67, n. 11, p. 2630–2653, 1984.

HUSCHNER, F. *et al.* Development of a feeding strategy for high cell and PHA density fed-batch fermentation of *Ralstonia eutropha* H16 from organic acids and their salts. *Process Biochemistry*, v. 50, n. 2, p. 165–172, fev. 2015.

JACQUES, P. *et al.* Optimization of Biosurfactant Lipopeptide Production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman Design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77, n. 1–3, p. 223–234, 1999.

KANE, J. Measuring  $k_L a$  for Better Bioreactor Performance. *BioProcess International*, v. 10, n. 3, 2012.

KANJANACHUMPOL, P. *et al.* Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 36, n. 10, p. 1463–74, out. 2013.

KESSLER, B. *et al.* Production of microbial polyesters: fermentation and downstream processes. *Biopolyesters*, 2001.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 2, p. 607–619, 2005.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 2, p. 607–619, fev. 2005.

KIM, K.-R.; OH, D.-K. Production of hydroxy fatty acids by microbial fatty acid-hydroxylation enzymes. *Biotechnology advances*, v. 31, n. 8, p. 1473–85, dez. 2013.

KLEMM, D. *et al.* Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, v. 44, n. 22, p. 3358–93, 30 maio 2005.

KOSIKOWSKI, F. V. Whey Utilization and Whey Products. *Journal of Dairy Science*, v. 62, n. 7, p. 1149–1160, 7 jul. 1979

KRISCHKE, W.; SCHRIFIDER, M.; TRFISCH, W. Applied Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei* subsp., *casei*. p. 573–578, 1991.

KULPREETCHA, S. *et al.* Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 107, n. 3, p. 240–5, mar. 2009.

KUMAR, A. Properties of biodegradable polymers and degradation for sustainable development. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 2011.

KUNASUNDARI, B.; SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *eXPRESS Polymer Letters*, v. 5, n. 7, 2011.

LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, n. 1, p. 1–14, 1996.

LEE, S. Y.; CHOI, J. I.; WONG, H. H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. *International Journal of Biological Macromolecules*, International Symposium on Biological Polyhydroxyalkanoates (ISBP 98) Sep 09-11, 1998, Riken inst, saitama, japan90, v. 25, n. 1–3, p. 31–36, 1999.

LENZ, R. W.; MARCHESSAULT, R. H. Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2005.

LO, Y. *et al.* Oxygen transfer characteristics of a centrifugal, packed-bed reactor during viscous xanthan fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 24, n. 3, p. 187–193, 1 out. 2001.

LÓPEZ, J. A. *et al.* 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.

LOWRY, O. H. *et al.* PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LYDERSEN, B. K.; D'ELIA, N. A.; NELSON, K. L. *Bioprocess Engineering: Systems, Equipment and Facilities*. John Wiley & Sons, 1994.

MACRAE, R. M.; WILKINSON, J. F. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Metabolism in Washed Suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *Journal of General Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 210–222, 1958.

MCCOOL, G. J. *et al.* Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. *Fems Microbiology Letters*, v. 138, n. 1, p.

41–48, 1996.

MEKONNEN, T. *et al.* Progress in bio-based plastics and plasticizing modifications. *Journal of Materials Chemistry A*, v. 1, n. 43, p. 13379, 15 out. 2013.

MIDDLETON, J.; TIPTON, A. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, 2000.

MITTAL, V. *Renewable Polymers: Synthesis, Processing, and Technology*. John Wiley & Sons, 2011. v. 16.

MORAIS, C. *et al.* Conversion of fat-containing waste from the margarine manufacturing process into bacterial polyhydroxyalkanoates. *International journal of biological macromolecules*, v. 71, p. 68–73, nov. 2014.

MORENO, P. *et al.* Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. *New biotechnology*, v. 32, n. 6, p. 682–9, 25 dez. 2015.

MOUNSEF, J. R. *et al.* The effect of aeration conditions, characterized by the volumetric mass transfer coefficient  $K(L)a$ , on the fermentation kinetics of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. *Journal of biotechnology*, v. 210, p. 100–6, 20 set. 2015.

NARANJO, J. M. *et al.* Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology*, v. 133, p. 38–44, 2013.

NORTON, S.; LACROIX, C.; VUILLEMARD, J.-C. Kinetic study of continuous whey permeate fermentation by immobilized *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 16, n. 6, p. 457–466, jun. 1994.

NYKÄNEN, A. *et al.* The Effect of Lactic Acid, Nisin Whey Permeate, Sodium Chloride and Related Combinations on Aerobic Plate Count and the Sensory Characteristics of Rainbow Trout. *LWT – Food Science and Technology*, v. 31, n. 3, p. 286–290, abr. 1998.

OBRUCA, S. *et al.* Effect of ethanol and hydrogen peroxide on poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic pathway in *Cupriavidus necator* H16. *World journal of microbiology & biotechnology*, v. 26, n. 7, p. 1261–7, jul. 2010.

OBRUCA, S. *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037. *Annals of Microbiology*, v. 61, n. 4, p. 947–953, 2011.

OMAR, S. *et al.* Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. *Biotechnology Letters*, v. 23, n. 14, p. 1119–1123, 2001.

PANBANGRED, W. *et al.* High expression of the penicillin G acylase gene (*pac*) from *Bacillus megaterium* UN1 in its own *pac* minus mutant. *Journal of Applied Microbiology*, v. 89, n. 1, p. 152–157, jul. 2000.

- PANDIAN, S. R. *et al.* Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. *Bioresource technology*, v. 101, n. 2, p. 705–11, jan. 2010.
- PARENE E., E. . Z. Growth of Thermophilic Starters in Whey Permeated Media. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 20–28, 1989.
- PARK, S. J. *et al.* Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: Towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 6, p. 1196–1206, 2012.
- PARK, S. J.; CHOI, J. I.; LEE, S. Y. Short-chain-length polyhydroxyalkanoates: Synthesis in metabolically engineered *Escherichia coli* and medical applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 15, n. 1, p. 206–215, 2005.
- PHILIP, S. *et al.* Effect of impeller speed and pH on the production of poly(3-hydroxybutyrate) using *Bacillus cereus* SPV. *Biomacromolecules*, v. 10, n. 4, p. 691–9, 13 abr. 2009.
- POSADA, J. A.; NARANJO, J. M.; LOPEZ, J. A.; *et al.* Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 1, p. 310–317, 2011.
- POSADA, J. A.; NARANJO, J. M.; LÓPEZ, J. A.; *et al.* Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 1, p. 310–317, jan. 2011.
- POVOLO, S.; CASELLA, S. Bacterial production of PHA from lactose and cheese whey permeate. *Macromolecular Symposia*, v. 197, p. 1–9, 2003.
- PRABHU, N. N. *et al.* Native granule associated short chain length polyhydroxyalkanoate synthase from a marine derived *Bacillus* sp. NQ-11/A2. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 97, n. 1, p. 41–50, jan. 2010.
- RATNER, B. D. *et al.* *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Society for Biomaterials, 2004.
- RECH, R. *Bioengenharia Para Engenharia Química*. Porto Alegre, 2005.
- RIEDEL, S. L. *et al.* Recovery of Poly ( 3-Hydroxybutyrate- co -3-Hydroxyhexanoate ) From *Ralstonia eutropha* Cultures With Non-Halogenated Solvents. v. 110, n. 2, p. 461–470, 2013.
- RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography A*, v. 445, n. 0, p. 285–289, 1988.
- RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A. *et al.* High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain. *Journal of applied microbiology*, v. 114, n. 5, p. 1378–87, maio 2013.
- SARRAFZADEH, M. H.; NAVARRO, J. M. The effect of oxygen on the sporulation,  $\delta$ -endotoxin synthesis and toxicity of *Bacillus thuringiensis* H14. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, n. 3, p. 305–310, 28 set. 2005.

- SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 47, n. 4, p. 358–363, 14 abr. 1997.
- SENIOR, P. J. Polyhydroxybutyrate, a speciality polymer of microbial origin. *Continuous Culture*, v. 8, p. 266–271, 1984.
- SHEN, L.; HAUFE, J.; PATEL, M. Product overview and market projection of emerging bio-based plastics. The European Polysaccharide Network of Excellence, 2009.
- SIRACUSA, V. *et al.* Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 19, n. 12, p. 634–643, dez. 2008.
- SRIDEWI, N.; BHUBALAN, K.; SUDESH, K. Degradation of commercially important polyhydroxyalkanoates in tropical mangrove ecosystem. *Polymer Degradation and Stability*, v. 91, n. 12, p. 2931–2940, 2006.
- SUN, X. S. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. [S.l.]: Elsevier, 2013.
- SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in biotechnology*, v. 16, n. 1, p. 41–6, jan. 1998.
- VARY, P. S. *et al.* *Bacillus megaterium* from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 76, n. 5, p. 957–967, 2007.
- VERLINDEN, R. A. J. *et al.* Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, n. 6, p. 1437–1449, 2007.
- VOLOVA, T. G. *Polyhydroxyalkanoates: Plastic Materials of the 21st Century – Production, Properties, Applications*. Nova Publishers, 2004.
- VOS, P. *et al.* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – Volume 3: The Firmicutes*. Springer, 2009.
- WANG, F.; LEE, S. Y. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation. *Applied and environmental microbiology*, v. 63, n. 9, p. 3703–6, 1997.
- WEATHERBURN, M. W. PHENOL-HYPOCHLORITE REACTION FOR DETERMINATION OF AMMONIA. *Analytical Chemistry*, v. 39, n. 8, p. 971–974, 1967.
- WU, D. X. *et al.* Effect of gamma irradiation on starch viscosity and physicochemical properties of different rice. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 65, n. 1, p. 79–86, 2002.
- WU, Q. *et al.* Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 80, n. 2, p. 111–118, 2001.

ZADOW J. G. Lactose: Properties and Uses. *Journal of Dairy Science*, v. 67, 1984.

ZHANG, B.; CARLSON, R.; SRIENC, F. Engineering the monomer composition of polyhydroxyalkanoates synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, v. 72, n. 1, p. 536–43, 1 jan. 2006.

ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 53, n. 1, p. 5–21, dez. 2001.