

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Avaliação de condições de cultivo para
aumento da produção de P(3HB) por
Bacillus megaterium e modelagem do
bioprocesso**

TESE DE DOUTORADO

Débora Jung Luvizetto Faccin

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Avaliação de condições de cultivo para aumento da
produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* e
modelagem do bioprocesso

Débora Jung Luvizetto Faccin

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor em Engenharia

Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de
Processos

Orientador:
Prof. Dr. Nilo Sérgio Medeiros Cardozo
Prof. Dr. Argimiro Resende Secchi

Co-orientadora:
Prof^a. Dra. Rosane Rech

Colaborador:
Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese *Avaliação de condições de cultivo para aumento da produção de P(3HB) por Bacillus megaterium e modelagem do bioprocesso*, elaborada por Débora Jung Luvizetto Faccin como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia.

Comissão Examinadora:



Prof^ª. Dra. Isabel Cristina Tessaro



Prof^ª. Dra. Sueli Teresinha Van Der Sand



Prof. Dr. Tito Lívio Moitinho Alves

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Departamento de Engenharia Química, por proporcionar condições para a realização deste trabalho. Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. À CAPES, pela disponibilização da bolsa e à FAPERGS, pelo suporte financeiro.

Aos meus orientadores, pelo ensino, incentivo e paciência, especialmente nas horas difíceis. Ao Professor Nilo, pela paciência e disponibilidade. À Professora Rosane, por todo apoio não só profissional, mas também emocional. Ao Professor Argimiro, que mesmo distante esteve presente. Ao professor Ayub, pela grande colaboração e disponibilização do Bioteclab.

Ao professor Plinho, pela ajuda e disponibilização do laboratório. Aos técnicos do DEQUI, por toda ajuda e disponibilidade, em especial à Tatiana, ao Eduardo e ao Igor. Ao Patrício, pela ajuda nos tramites da defesa. Aos bolsistas de Iniciação Científica, pela ajuda na realização do trabalho.

Aos professores Isabel Cristina Tessaro, Sueli Teresinha Van Der Sand e Tito Lívio Moitinho Alves, pela atenção e grande contribuição.

Aos meus amigos, pelo apoio e por compreender minha ausência. Aos amigos que fiz no Laboratório de Biotecnologia, Bioteclab, agradeço por toda a cooperação. Aos amigos do DEQUI, pelo apoio.

À minha Família, que sempre me incentivou, ajudou e soube compreender minha ausência.

Ao Flávio, meu amor, por toda a compreensão, apoio, ajuda e disponibilidade.

Resumo

O poli(3-hidroxi-butirato) é um biopolímero obtido a partir de fontes renováveis e é um poliéster biodegradável. Possui um grande potencial de aplicação principalmente em artefatos e embalagens descartáveis e também na área médica, devido sua biocompatibilidade. Neste trabalho foi estudada a produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* em meio mineral, buscando o aumento na produção deste biopolímero, bem como representar matematicamente este bioprocessos. Foram avaliadas a influência do pH e da disponibilidade de oxigênio em cultivos utilizando sacarose como fonte de carbono. Também foi avaliada a influência de diferentes fontes de nitrogênio, com glicerol ou sacarose como fonte de carbono.

A influência do pH foi estudada mediante experimentos em biorreator de 4 L com controle da concentração de oxigênio dissolvido acima de 40 % em relação a saturação, com ou sem controle de pH. Observou-se que o acúmulo de P(3HB) foi maior quando o pH não foi controlado, 34 % em relação a biomassa em comparação com 28 % quando pH foi controlado. Foi realizada a modelagem da produção de P(3HB), com proposição de quatro modelos. Os dados experimentais dos cultivos com e sem controle de pH foram utilizados na etapa de estimação de parâmetros. Em comparação com modelos relatados na literatura os modelos propostos apresentaram melhor ajuste, com menor ou igual número de parâmetros, e forneceram estimativas dos parâmetros com menor variabilidade.

A avaliação da influência do oxigênio foi realizada através de cultivos em biorreator de 4 L, sem controle de pH, com diferentes condições de transferência de oxigênio, obtidas variando-se a rotação do impelidor entre 100 rpm e 600 rpm. O maior acúmulo de biopolímero foi obtido em experimento com rotação do impelidor 200 rpm, o qual apresentou um baixo coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_{La} = 0,006 \text{ s}^{-1}$) e possibilitou acúmulo de 62 % de P(3HB) em relação a biomassa seca.

Para avaliar a melhor fonte de nitrogênio, foram realizados experimentos em estufa incubadora rotatória com cinco fontes de nitrogênio diferentes: cloreto de amônio, citrato de amônio, sulfato de amônio, fosfato de amônio e nitrato de amônio. Com relação à fonte de carbono, sacarose possibilitou maior acúmulo de P(3HB) e biomassa que glicerol. Com relação à fonte de nitrogênio, cloreto de amônio possibilitou maior acúmulo de P(3HB) e biomassa quando utilizado glicerol como fonte de carbono, enquanto que sulfato de amônio aumenta a produção com sacarose.

Abstract

Poly(3-hydroxybutyrate) is a biodegradable polyester produced from renewable resources. This polymer has a great potential to be used as disposable items and packaging, and also in the medical field due to its biocompatibility. In this work, the P(3HB) production by *Bacillus megaterium* in mineral medium was studied aiming the increase of biopolymer production, as well the development of a mathematical model for this bioprocess. The influence of pH and oxygen transfer rate in a *B. megaterium* culture using sucrose as carbon source was evaluated, and the influence of different nitrogen sources using sucrose or glycerol as carbon source was analyzed.

The influence of pH-medium was studied in bench-scale bioreactor under controlled and uncontrolled pH. The dissolved oxygen was controlled above 40 % of saturation. It was observed that P(3HB) accumulation was higher in the experiment without pH control (34 % of dry biomass) than in the experiment with pH control (28 % of dry biomass). Four models were proposed to perform the mathematical modeling of this bioprocess. The experimental data of the cultures with and without pH control were used for parameter estimation. Compared to earlier models reported in the literature, the proposed models show better fitting, with less or equal number of parameters, and provide parameters estimative with much lower variability.

The evaluation of oxygen transfer rate influence was performed in 4 liters bioreactor cultures without pH control, with different conditions of oxygen transfer rates by ranging impeller speed between 100 rpm and 600 rpm. The higher P(3HB) accumulation (62 % of dry biomass) was attained in the experiment with low volumetric oxygen transfer rate ($k_La = 0.006 \text{ s}^{-1}$), at 200 rpm impeller speed.

To evaluate the best nitrogen source for sucrose or glycerol as carbon sources, experiments were performed in shaker with five different nitrogen sources: ammonium chloride, ammonium citrate, ammonium sulfate, ammonium phosphate and ammonium nitrate. With respect to carbon source, sucrose allowed higher biomass and P(3HB) accumulation than glycerol. With respect to nitrogen source, ammonium chloride allowed highest biomass and P(3HB) accumulation when glycerol was used as carbon source, whereas ammonium sulfate showed the best results for sucrose.

Sumário

Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xvi
Nomenclatura	xvii
Introdução	1
Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica	3
1.1 Biopolímeros	3
1.2 Polihidroxialcanoatos	5
1.2.1 Tipos de PHAs e classificação	7
1.2.2 Características e aplicações dos PHAs	8
1.2.3 Micro-organismos produtores e obtenção em diversas fontes de carbono.....	12
1.2.4 Recuperação e purificação de PHAs	14
1.3 Biopolímeros Poli(3-hidroxi-butarato)	15
1.3.1 Síntese de P(3HB) por micro-organismos.....	16
1.3.2 Produção de P(3HB) pelo gênero <i>Bacillus</i>	27
1.4 Modelagem do Bioprocesso	32
1.5 Referências Bibliográficas	33
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	43
2.1 Micro-organismo	43
2.2 Meio de Cultura	43
2.3 Avaliação da Influência da Fonte de Nitrogênio na Produção de P(3HB) e Biomassa.	44
2.4 Experimentos em Biorreator de 5L	45
2.4.1 Experimentos sem controle de pH.....	46
2.4.2 Experimentos em diferentes rotações	47
2.5 Métodos Analíticos	47
2.5.1 Determinação de biomassa	47
2.5.2 Determinação de poli(3-hidroxi-butarato).....	47
2.5.3 Determinação de sacarose e glicerol	48
2.5.4 Determinação de nitrogênio amoniacal	48
2.5.6 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de massa (k_{La}).....	49
2.6 Estimação de Parâmetros do Modelo para Produção de P(3HB)	49
2.7 Referências Bibliográficas	50
Introdução aos capítulos 3, 4, 5 e 6	53
Capítulo 3 - Artigo 1 - Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by <i>Bacillus megaterium</i>	55

3.1 Introduction	57
3.2 Materials and Methods	58
3.3 Results and Discussion	60
3.4 Conclusions	66
3.5 Acknowledgements	66
3.6 References	66
Capítulo 4 - Artigo 2 - Modeling of P(3HB) production by <i>Bacillus megaterium</i>	69
4.1 Notation	71
4.2 Introduction	73
4.3 Modeling and Parameter	74
4.4 Results and Discussion	78
4.5 Conclusions	85
4.6 Acknowledgements	85
4.7 References	85
Capítulo 5 - Artigo 3 - Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by <i>Bacillus megaterium</i>	89
5.1 Introduction	91
5.2 Materials and Methods	92
5.3 Results	93
5.4 Discussion	97
5.5 Conclusions	99
5.6 Acknowledgements	99
5.7 References	99
Capítulo 6 - Artigo 4 - Avaliação da influência da fonte de nitrogênio e carbono na produção de P(3HB) por <i>Bacillus megaterium</i>	103
6.1 Introdução	105
6.2 Material e Métodos	105
6.3 Resultados e Discussão	107
6.4 Conclusões	110
6.5 Referências Bibliográficas	110
Capítulo 7 - Considerações Finais	113
7.1 Discussão geral dos resultados	113
7.2 Conclusões	117
7.3 Sugestões para Trabalhos Futuros	118
7.4 Referências	119
Referências Bibliográficas	121
Imagens da <i>B.megaterium</i>	131

Lista de Figuras

- Figura 1.1:** Classificação dos polímeros biodegradáveis (adaptada de Averous e Boquillon (2004)).4
- Figura 1.2:** Classificação de polímeros quanto à biodegradabilidade e origem de obtenção (adaptada de Shen *et al.* (2009)).5
- Figura 1.3:** Exemplo de monômeros constituintes de polihidroxialcanoatos (REHM, 2003).7
- Figura 1.4:** Estrutura geral dos polihidroxialcanoatos (LEE, 1996b)..... 8
- Figura 1.5:** Degradação de amostra do Biopol, incubados em diferentes locais (1-10) monitorados a cada 5 semanas. Locais: 1) rio Danúbio; 2) lodo na margem do rio Danúbio; 3) solo da floresta; 4) solo de campo; 5) estufa com turfa úmida; 6) estação de tratamento de esgoto (ETE), flotador; 7) ETE, tanque de aeração; 8) ETE, tanque pós-tratamento aeróbio 9) ETE, tanque com lodo de biorreator anaeróbio; 10) caçamba de lixo municipal (MATAVULJ e MOLITORIS, 2000).11
- Figura 1.6:** Degradação de amostra do Biopol, incubado em estufa com compostagem (MATAVULJ e MOLITORIS, 2000).12
- Figura 1.7:** Esquema das principais rotas metabólicas para produção de biomassa residual e P(3HB) a partir de diferentes fontes de carbono (BORMANN, 2000). EMP: via Embden–Meyerhof–Parnas ou glicólise, EDP: via Entner–Doudoroff.17
- Figura 1.8:** Rotas metabólicas conhecidas para suprimento do monômero (R) 3-hidroxi butirato utilizado na síntese de P(3HB) (SUDESH *et al.*, 2000). PhaA, β -cetotiolase; PhaB, NADPH-dependente acetoacetyl-CoA redutase; PhaC, PHA sintase; PhaG, 3-hidroxiacil-ACP-CoA transferase; PhaJ, (R)-enoil-CoA hidratase; FabD, malonil-CoA-ACP transacilase; FabG, 3-cetoacil-CoA redutase.18
- Figura 1.9:** Rota metabólica da síntese de P(3HB) (STUBBE *et al.*, 2005).19
- Figura 1.10:** Metabolismo cíclico da biosíntese e degradação do P(3HB) em bactérias (SUDESH *et al.*, 2000). PhaA, β -cetotiolase; PhaB, NADPH-dependente acetoacetyl-CoA redutase; PhaC, PHA sintase; PhaZ, PHA depolimerase; 1, dímero hidrolase; 2, (R)-3-hidroxi butirato desidrogenase; 3, acetoacetyl-CoA sintetase; 4, NADH-dependente acetoacetyl-CoA redutase.20
- Figura 1.11:** Esquema do Ciclo do ácido tricarbóxico com pontos de controle do ciclo (CAMPBELL e FARRELL, 2006).21
- Figura 1.12:** Representação da organização dos genes que codificam proteínas responsáveis pela síntese de PHAs (REHM, 2003).25
- Figura 1.13:** Representação do grânulo de PHA (A) e microscopia eletrônica da bactéria *Ralstonia eutropha* contendo grânulos de PHA (B) onde a barra representa 0,5um (SUDESH *et al.*, 2000).26

Figura 2.1: Biorreator de 5L com unidade de controle acoplada.	46
Figure 3.1: Time course of (a) polymer accumulation (% CDW) and (b) nitrogen concentration and (c) pH in the culture —■ exp 1 (S = 44; C:N = 22; FN = 2), ---◆ exp 2 (S = 44; C:N = 8; FN = 5.5), ---▲ exp 3 (S = 16; C:N = 22; N = 0.73), ---▼ exp 4 (S = 16; C:N = 8; FN = 2), ---◇ exp 5 (S = 30; C:N = 5; FN = 6), ---◁ exp 6 (S = 30; C:N = 25; FN = 1.2), ---▷ exp 7 (S = 10; C:N = 15; FN = 0.67), ---○ exp 8 (S = 50; C:N = 15; FN = 3.33) e ---◆ exp 9 (S = 30; C:N = 15; FN = 2).	60
Figure 3.2: Response surface plots for the effects of initial carbon:nitrogen ratio and initial sucrose concentration on (a) total biomass, (b) biopolymer (%CDW), (c) nitrogen and (d) sucrose measured at 20 hours of cultivation.	62
Figure 3.3: Plot of the objective function, indicating the location of the nine experiments.....	63
Figure 3.4: Time course of pH (◇ with control, ◆ without control) and dissolved oxygen (— with control, --- without control).	64
Figure 3.5: Time course of total biomass biopolymer concentration, biopolymer accumulation (%CDW), sucrose concentration and nitrogen concentration in the culture without pH control.	65
Figure 3.6: Time course of total biomass biopolymer concentration, biopolymer accumulation (%CDW), sucrose concentration and nitrogen concentration in the culture with pH control.	65
Figure 4.1: Comparison between experimental data and simulated curves of (a) total biomass and P(3HB), (b) sucrose and nitrogen concentrations, and (c) percentage of P(3HB) in relation to dry cell weight (DCW) for controlled pH tests. Experimental data: total biomass (■), P(3HB) (□), Sucrose (▼), and nitrogen (△) concentrations (g.L-1) and the percentage of P(3HB) accumulation in relation to DCW (*). Models: Mulchandani (---), Raje-Srivastava (.....), Khanna-Srivastava (----), Biop (----), and BiopRhyp (—).	81
Figure 4.2: Comparison between experimental and simulated data for uncontrolled pH tests. Experimental data: (a) total biomass (■) and P(3HB) (□), (b) Sucrose (▼) and nitrogen (△) concentrations (g.L-1), and (c) pH (o) and P(3HB) (*) accumulation (% DCW). Models: BiopRhyp (—), BiopRhyp_H (----), and BiopRhyp_Hf (.....).	84
Figure 5.1: Estimated values and standard deviation of volumetric coefficients of oxygen transfer (k_La) as a function of stirrer speed.	94
Figure 5.2: Time course of total and residual biomass, biopolymer concentration, sucrose concentration and nitrogen concentration in the culture with k_La of (a) 0.002 s^{-1} , (b) 0.006 s^{-1} , (c) 0.013 s^{-1} , (d) 0.016 s^{-1} , (e) 0.027 s^{-1} e (f) 0.037 s^{-1}	95
Figure 5.3: Time course of P(3HB) content, mass fraction of CDW, in batch cultures with k_La of (○) 0.002 s^{-1} , (□) 0.006 s^{-1} , (●) 0.013 s^{-1} , (▲) 0.018 s^{-1} , (▽) 0.027 s^{-1} and (×) 0.037 s^{-1}	96

Figure 5.4: Time course of dissolved oxygen, DO, in batch cultures with k_{La} of (○) 0.002 s ⁻¹ , (□) 0.006 s ⁻¹ , (●) 0.013 s ⁻¹ , (▲) 0.018 s ⁻¹ , (▽) 0.027 s ⁻¹ and (×) 0.037 s ⁻¹	97
Figura A.1: Imagem da amostra obtida do pré-inóculo (18 horas) com procedimento de coloração de esporos (a) corante verde malaquita (b) corante verde malaquita e contracorante safranina.	132
Figura A.2: Imagem da amostra obtida do inóculo (5 horas) com procedimento de coloração de esporos (a) corante verde malaquita (b) corante verde malaquita e contracorante safranina.	133
Figura A.3: Imagem da amostra do meio de cultura com 5 horas de cultivo com procedimento de coloração de esporos com corante verde malaquita e contracorante safranina.	134
Figura A.4: Imagem da amostra do meio de cultura com 6 horas de cultivo com procedimento de coloração de esporos com corante verde malaquita.	134
Figura A.5: Amostra do meio de cultura com 7 horas de cultivo com procedimento de coloração de esporos com corante verde malaquita.	135
Figura A.6: Amostra do meio de cultura com 8 horas de cultivo com procedimento de coloração de esporos com corante verde malaquita e contracorante safranina.	135
Figura A.7: Amostra do meio de cultura com 9 horas de cultivo com procedimento de coloração de esporos com corante verde malaquita e contracorante safranina.	136
Figura A.8: Amostra do meio de cultura com 10 horas de cultivo com procedimento de coloração de esporos com corante verde malaquita e contracorante safranina.	136
Figura A.9: Amostra do meio de cultura com 11 horas de cultivo com procedimento de coloração de esporos com corante verde malaquita e contracorante safranina.	137
Figura A.10: Amostra do meio de cultura com 12 horas de cultivo com procedimento de coloração de esporos com (a) corante verde malaquita (b) corante verde malaquita e contracorante safranina.	138

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Produção industrial de PHAs (adaptada de Shen <i>et al.</i> (2009)).....	6
Tabela 1.2: Tabela de propriedades de alguns PHAs e alguns polímeros petroquímicos (adaptada de Lee (1996a)).....	9
Tabela 1.3: Gêneros de micro-organismos capazes de acumular PHAs.....	13
Tabela 1.4: Classificação da Pha sintase (adaptada de Valappil, Boccaccini <i>et al.</i> (2007)).....	24
Tabela 2.1: Meio mineral utilizado nos cultivos.....	44
Tabela 2.2: Solução de micronutrientes.....	44
Tabela 2.3: Concentrações das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas nos experimentos.....	45
Table 3.1: Central composite design of experiments.....	59
Table 3.2: Values of correlations coefficients between pH and percent of polymer accumulated and residual biomass to pH.....	61
Table 3.3: Response surface equations and coefficient of determination.....	61
Table 4.1: Description of the three models from the literature used in this work.....	75
Table 4.2: General formulation of the proposed models for production of P(3HB).....	76
Table 4.3: Expression for specific growth rate (μ) and correction factor for biopolymer formation rate (ϕ) used in the proposed models.....	76
Table 4.4: Results for the parameters estimation with experimental data from controlled pH cultures.....	79
Table 4.5: Values of coefficient of determination (R^2) and mean squared error (MSE) for controlled pH cultures.....	80
Table 4.6: Comparison of fitting ability among the expressions tested to describe the kinetics of cations H^+ formation.....	82
Table 4.7: Results for the parameters estimation using experimental data from uncontrolled pH cultures.....	83
Table 4.8: Values of coefficient of determination (R^2) and mean squared error (MSE) for uncontrolled pH cultures.....	83
Tabela 6.1: Concentração de nutrientes utilizados em cada ensaio.....	106
Tabela 6.2: Concentração média de biomassa obtida em 20 horas de cultivo utilizando glicerol como fonte de carbono.....	107
Tabela 6.3: Concentração média de P(3HB) obtida em 20 horas de cultivo utilizando glicerol como fonte de carbono.....	107
Tabela 6.4: Percentual médio de acúmulo de P(3HB) obtido em 20 horas de cultivo utilizando glicerol como fonte de carbono.....	108
Tabela 6.5: Concentração média de biomassa obtida em 20 horas de cultivo utilizando sacarose como fonte de carbono.....	109
Tabela 6.6: Concentração média de P(3HB) obtida em 20 horas de cultivo utilizando glicerol como fonte de carbono.....	109
Tabela 6.7: Percentual médio de acúmulo de P(3HB) obtido em 20 horas de cultivo utilizando sacarose como fonte de carbono.....	109

Nomenclatura

Lista de símbolos

$C_{i,j}$	concentração das variáveis experimentais
$\tilde{C}_{i,j}$	concentração das variáveis previstas pelo modelo
C	concentração de oxigênio dissolvido no instante t qualquer
$C:N$	razão inicial de carbono/nitrogênio
C_0	concentração de oxigênio dissolvido no instante onde foi retomada a aeração
C_i	concentração de saturação do oxigênio na fase líquida antes de desligar a aeração
eN	expoente do modelo de KHANNA e SRIVASTAVA
eS	expoente do modelo KHANNA e SRIVASTAVA
F_{Obj}	função objetivo
H	concentração de íons hidrogênio
H_m	concentração de íons hidrogênio máxima
k_0	parâmetro do termo associado ao crescimento
k_1	parâmetro do termo associado ao crescimento na produção de polímero
k_{1H}	parâmetro da equação da taxa de velocidade específica de crescimento no modelo BiopRHyp_Hf
k_2	parâmetro do termo não associado ao crescimento na produção de polímero
k_2	parâmetro do termo não associado ao crescimento na produção de polímero
k_{2H}	parâmetro da equação da taxa de velocidade específica de crescimento no modelo BiopRHyp_Hf
k_3	parâmetro do termo de consumo de nitrogênio para produção de biomassa
k_4	parâmetro do termo não associado ao crescimento na produção de polímero
k_5	parâmetro do termo não associado ao crescimento referente a inibição pelo produto
k_6	parâmetro do termo de consumo de açúcar para a manutenção da biomassa
k_7	parâmetro do termo de consumo de açúcar para ao crescimento da biomassa
k_8	parâmetro do termo de consumo de açúcar para a formação do polímero
k_c	parâmetro do termo de consumo de polímero pela biomassa
k_d	parâmetro do termo de morte celular
k_H	parâmetro da equação do hidrogênio
k_{La}	coeficiente de transferência de massa
K_{NS}	constante de saturação do nitrogênio
k_{p1}	parâmetro da equação do hidrogênio
$k_{p1'}$	parâmetro da equação do hidrogênio
k_{p2}	parâmetro da equação do hidrogênio

k_{p2}	parâmetro da equação do hidrogênio
K_{PS}	constante do termo associado ao crescimento
K_S	constante de saturação do substrato limitante
K_{S1}	constante de saturação do substrato limitante no termo de Monod
K_{S2}	constante de saturação do substrato limitante no termo sigmoidal
K_{SS}	constante de saturação da fonte de carbono
m	expoente do termo sigmoidal do modelo de Mulchadani
m_N	parâmetro do termo referente a utilização de nitrogênio para a manutenção celular
m_S	parâmetro do termo referente a utilização de açúcar para a manutenção celular
n	expoente do termo de inibição do modelo de Mulchadani
N	concentração de nitrogênio
N_m	concentração máxima de fonte de nitrogênio
nN	expoente do termo de inibição por nitrogênio no modelo de KHANNA e SRIVASTAVA
nS	expoente do termo de inibição por nitrogênio no modelo de KHANNA e SRIVASTAVA
NS_m	valor máximo para a razão nitrogênio/fonte de carbono
P	concentração de P(3HB)
pH	ph do meio
PHB	concentração de P(3HB)
S	concentração da fonte de carbono
S_i	concentração de sacarose inicial
S_m	concentração máxima de fonte de carbono
S_r	concentração de sacarose residual no meio
t	tempo
w	Peso da função objetivo
X	biomassa total
$X1$	variável codificada referente a concentração inicial de sacarose
$X2$	variável codificada referente a razão inicial de fonte de carbono/fonte de nitrogênio
X_R	biomassa residual
X_{Rmin}	valor mínimo de X_R logo após o início da produção de P(3HB)
X_T	biomassa total
$Y_{Xr/N}$	rendimento da biomassa residual em relação a fonte de nitrogênio

Lista de Símbolos Gregos

α	parâmetro do modelo de consumo de açúcar
γ	parâmetro do modelo de consumo de açúcar
ϕ	fator de correção da taxa de formação de P(3HB)
μ	taxa de crescimento específico
μ_1	taxa de crescimento do termo de Monod no modelo de RAJE e SRIVASTAVA
μ_2	taxa de crescimento do termo sigmoidal no modelo de RAJE e SRIVASTAVA
μ_m	taxa de crescimento máxima específica
σ_j^2	variância experimental
$\tilde{\sigma}^{*2}$	variância experimental estimada baseada no modelo
σ^{*2}	variância experimental normalizada

Lista de Abreviações

3HB	3-hidroxi butirato
3HB-CoA	(R)-3-hidroxi butiril Coenzima A
3HV	3-hidroxi valerato
4HB	4-hidroxi butirato
ABS	3-hidroxi butirato
acetil-CoA	acetil coenzima A
acetoacetil-CoA	acetoacetil coenzima A
ACP	proteína transportadora de acila
ADP	adenosina trifosfato
ATP	adenosina difosfato
CoA	coenzima A
CoASH	coenzima A livre
EDP	via metabólica Entner–Doudoroff
EMP	via metabólica Embden–Meyerhof–Parnas
FabD	malonil-CoA-ACP transacilase
FabG	3-cetoacil-CoA redutase
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FADH ₂	flavina adenina dinucleotídeo na forma reduzida
FC	fonte de carbono
FN	fonte de nitrogênio
H ₂ *	agentes redutores
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
NADP	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida
NS	Concentração de fonte de nitrogênio
P(3HB)	poli(3-hidroxi butirato)
P(3HB-co-3HHx)	poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato)
P(3HV)	poli(3-hidroxi valerato)
P(4HB)	poli(4-hidroxi butirato)
PA11	poliamida 11 (nylon 11)
PA6	poliamida-6, nylon-6, policaprolactama
PA610	poliamida 610 (nylon 610)

PA66	poliamida 66 (nylon66)
PB	polibutileno
PBAT	poli(butileno-adipato-tereftalato);
PBS	polibutileno succinato
PBSA	poli(butileno succinato-co-butileno adipato)
PBSAT	poli(butileno succinato-co-adipato tereftalato)
PBSL	polibutileno succinato-co-lactato
PBST	poli(butileno-succinato-tereftalato)
PBT	polibutileno tereftalato
PCBS	poli(l-cistinabisamida-g-sulfadiazina)
PCL	policaprolactona
PE	polietileno
PEA	poliesteramidas
PEIT	polietileno-co-isosorbitol tereftalato
PET	polietileno tereftalato
PhaA	β -Cetotiolase
<i>phaA</i>	gene que codifica a enzima PhaA
PhaB	aceto-acetil coenzima A redutase
<i>phaB</i>	gene que codifica a enzima PhaB
PhaC	PHA sintase
<i>phaC</i>	gene que codifica a enzima PhaC
<i>phaD</i>	gene que codifica uma proteína com função desconhecida
PhaE	proteína que compõe a PHA sintase
PhaG	3-hidroxiacil-ACP-CoA transferase
PhaJ	(R)-enoil-CoA hidratase
PHA _{LCL}	polihidroxicanoato com comprimento de cadeia longo
PHA _{MCL}	polihidroxicanoato com comprimento de cadeia médio
PhaP	proteína encontrada nos grânulos da <i>Bacillus megaterium</i>
<i>phaP</i>	gene que codifica a proteína PhaP
PhaQ	proteína responsável pela repressão de outras proteínas na produção de PHB
<i>phaQ</i>	gene que codifica a proteína PhaQ
PhaR	proteína que compõe a PHA sintase
<i>phaR</i>	gene que codifica a proteína PhaR
PHAs	polihidroxicanoatos

PHA _{SCL}	polihidroxicanoato com comprimento de cadeia curto
<i>phaZ</i>	gene que codifica a Pha depolimerase intracelular
Pi	grupo fosfato livre
PLA	poli(ácido láctico)
pO ₂	percentual de oxigênio dissolvido relativo a saturação
PO3G	poliol obtido pela polimerização de 1-3 propanodiol
PP	polipropileno
PTMAT	politetrametileno adipato tereftalato
PTT	politrimetileno tereftalato
PUR	poliuretano
PVC	cloro de polivinila
SBR	borracha de butadieno estireno
Spo0A	fator de transcrição - desempenha papel central no início da esporulação em bacilos
TCA	ciclo do ácido tricarbóxico, ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico
TPS	amido termoplástico
Y ^G _{P/C}	rendimento global da produção de P(3HB) a partir de carbono
Y ^T _{P/C}	rendimento teórico, em base mássica, da produção de P(3HB) a partir de glicose

Introdução

Com a maior conscientização global com a segurança do meio ambiente, aumentou a preocupação com a disposição final de resíduos. Neste contexto, os polímeros petroquímicos aparecem como protagonistas. A cada ano o consumo de polímeros, que são materiais versáteis de grande qualidade para aplicação nos mais variados produtos, aumenta. No entanto, a dificuldade da correta disposição final deste tipo de material vem cada vez mais se tornando um problema, sobretudo quando pensamos em produtos e embalagens descartáveis.

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são uma classe de biopolímeros que surgem como alternativa a polímeros petroquímicos em algumas aplicações. Eles são poliésteres sintetizados por micro-organismos e são completamente biodegradáveis. A diversidade de PHAs existentes possibilita uma variada gama de propriedades, podendo apresentar características que vão de termoplásticos a elastômeros e tendo, assim, potencial para utilização em muitas aplicações. Além disso, os PHAs são obtidos a partir de fontes renováveis, em geral, fontes provenientes da agricultura e até mesmo a partir de CO₂.

Devido a sua biocompatibilidade, os PHAs encontram atualmente maior mercado na área médica, mercado este que se dispõe a pagar um preço maior em função das excelentes características de aplicação. Neste campo, além da biocompatibilidade, os PHAs contam com a biodegradabilidade que possibilita a reabsorção do material pelo corpo possibilitando aplicações em fios de sutura, próteses e liberação controlada de medicamentos.

Em aplicações mais gerais, o grande entrave da utilização dos PHAs ainda é o custo de produção. Neste sentido o estudo para otimização dos seus processos de produção é de grande importância. A busca por substratos mais baratos também poderá contribuir para a diminuição no preço destes biopolímeros. Cada vez mais vem sendo estudada a utilização de resíduos como soro de leite, glicerol residual, melaço de cana entre outros.

Dentre os PHAs destaca-se o poli(3-hidroxiбутирато) ou P(3HB). Este possui propriedades semelhantes ao polipropileno, porém com baixa resistência à ruptura. Propriedade que pode ser melhorada com a produção de copolímeros com incorporação do monômero 4-hidroxiбутирато.

A bactéria *Bacillus megaterium* foi a primeira bactéria na qual se identificou corpos de inclusão constituídos pelo P(3HB). Esta é amplamente utilizada industrialmente para produção de diversos bioprodutos entre eles a penicilina sintética e a vitamina B₁₂, porém ainda não é utilizada para a produção industrial de P(3HB). A *B. megaterium* possui características interessantes para aplicação industrial como tolerância à temperatura e à pressão osmótica altas, o que significa que pequenos distúrbios nestas variáveis não geram grandes perturbações no processo, além de apresentar um rápido crescimento celular. Mas, talvez, a característica mais importante desta bactéria é a capacidade de produzir P(3HB) a partir de diversas fontes de carbono, como sacarose, lactose, maltose, glicerol, entre outros, podendo ser utilizados resíduos agro-industriais como soro de leite, melação de cana e glicerol residual da produção de biodiesel. Além disso, a *B. megaterium* é capaz de sintetizar copolímeros a partir de uma única fonte de carbono. Contudo a produção de P(3HB) por esta bactéria necessita ser mais estudada, pois em grande parte dos cultivos para a produção de P(3HB) ocorre consumo intracelular deste polímero levando a níveis de acúmulo de polímero baixo, normalmente este consumo é atribuído à formação de esporo.

Inserido neste contexto, o presente trabalho trata do estudo da produção de P(3HB) pela *B. megaterium* com o objetivo de aumentar a produção deste biopolímero. Os seguintes estudos foram propostos: i) avaliação da influência do pH na produção de P(3HB) e formação de biomassa; ii) avaliação da influência do oxigênio na produção de P(3HB); iii) modelagem matemática do bioprocessos; iv) produção de P(3HB) a partir de fontes de carbono diferentes: sacarose (por se tratar de açúcar abundante e relativamente barato no Brasil) e glicerol (como alternativa para reaproveitamento de resíduo da produção de biodiesel).

Escolheu-se apresentar o trabalho no formato de artigos, acrescidos de dois capítulos para contextualização geral (Capítulos 1 e 2). Desta forma, o Capítulo 1 traz a revisão bibliográfica com breve descrição sobre os polihidroxialcanoatos, sobretudo o P(3HB), propriedades, micro-organismos produtores, rotas metabólicas para obtenção e produção a partir de bactérias do gênero *Bacillus* entre outros tópicos. No Capítulo 2 são apresentados os materiais e métodos utilizados nos estudos, apesar de conter nos artigos materiais e métodos específicos de cada trabalho. Após estes capítulos iniciais, é apresentada uma breve introdução aos Capítulos 3, 4, 5 e 6 que são os capítulos referentes aos artigos. No Capítulo 7 é feito o fechamento com as principais conclusões do estudo e sugestões para trabalhos futuros. Com o objetivo de facilitar a leitura, além da lista apresentada ao final de cada Capítulo com as referências nele utilizadas, também se apresenta no final do documento uma lista geral das referências utilizadas.

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

1.1 Biopolímeros

Segundo Flieger *et al.* (2003) biopolímeros são polímeros obtidos a partir de fontes renováveis, geralmente biodegradáveis e não tóxicos, podendo ser produzidos por sistemas biológicos (i.e. micro-organismos, plantas e animais) ou sintetizados quimicamente a partir de materiais biológicos (exemplos: açúcares, amido, óleos e gorduras, etc.).

Dentre as características citadas merece destaque a biodegradação, que é um processo natural no qual um composto orgânico é degradado, por ação de micro-organismos e suas enzimas, e convertido a compostos mais simples, mineralizados e redistribuídos através dos ciclos elementares como o ciclo de carbono, de nitrogênio e de enxofre (CHANDRA e RUSTGI, 1998).

Reddy *et al.* (2003) dividem os plásticos biodegradáveis em 3 tipos: completamente biodegradáveis, foto-biodegradáveis e semi-biodegradáveis. Os completamente biodegradáveis são aqueles que apresentam capacidade intrínseca de biodegradação. Foto-biodegradáveis são polímeros com aditivos que incorporam na cadeia polimérica grupos sensíveis à luz, de maneira que quando submetidos à exposição prolongada à radiação ultravioleta inicia o processo de degradação quebrando parte da molécula de polímero permitindo, em alguns casos, a biodegradação. Semi-biodegradáveis são blendas produzidas pela incorporação de amido a um polímero não biodegradável (como polietileno, por exemplo). Assim os micro-organismos são capazes de atacar o amido e iniciar a biodegradação. Contudo a parte não amido do polímero continua não biodegradável.

Os polímeros completamente biodegradáveis são divididos em 4 grupos de acordo com a obtenção do polímero, como mostra a Figura 1.1. Agro-polímeros são obtidos a partir de agro-produtos, geralmente com o fracionamento da biomassa. Estes estão divididos em polissacarídeos e proteínas e lipídeos. No segundo grupo estão os poliésteres sintetizados por micro-organismos a partir de fontes renováveis, neste grupo encontram-se os polihidroxicanoatos (PHAs). O terceiro grupo é formado por polímeros sintetizados quimicamente a partir de monômeros derivados de processos biotecnológicos, como o caso do poli(ácido lático) (PLA) que pode ser obtido pela polimerização do ácido lático proveniente de cultivo de micro-organismos. O último grupo contempla polímeros biodegradáveis provenientes de origem não renováveis totalmente sintetizados em processos petroquímicos. Neste grupo destacam-se a policaprolactona (PCL), as poliesteramidas (PEA), co-poliésteres alifáticos, como por exemplo o poli(butileno succinato -co-adipato) (PBSA) e co-poliésteres aromáticos como o poli(adipato-co-tereftalato de butileno) (PBAT) (AVEROUS e BOQUILLON, 2004).

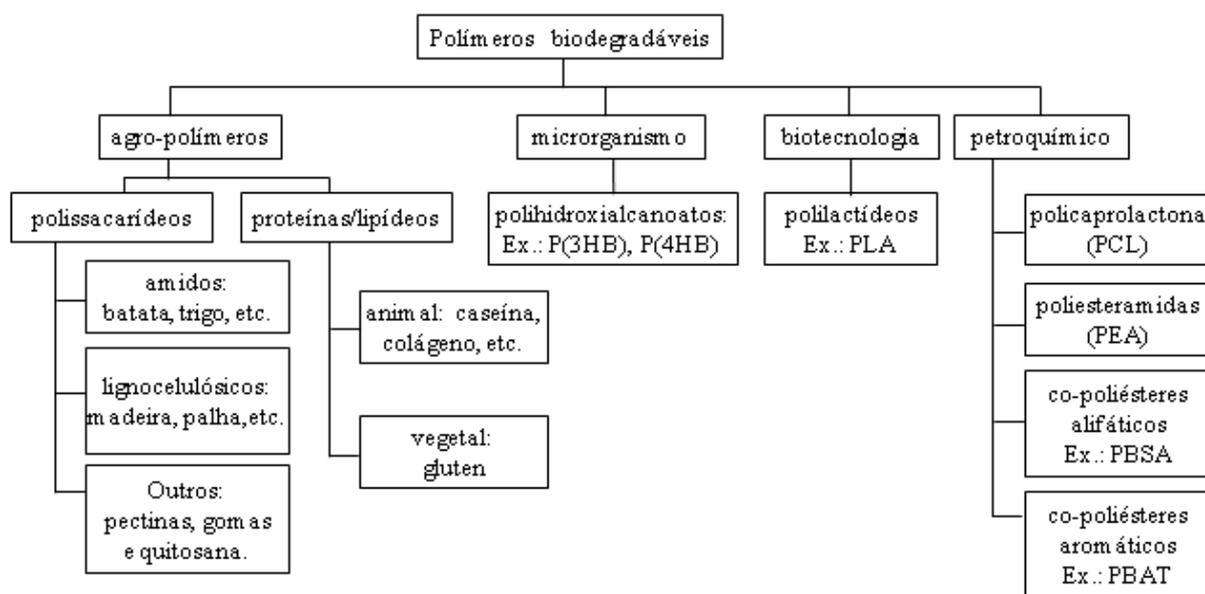


Figura 1.1: Classificação dos polímeros biodegradáveis (adaptada de Averous e Boquillon (2004)).

Atualmente, os termos bioplásticos e biopolímeros são muitas vezes usados como sinônimos, sendo empregados para referenciar tanto polímeros produzidos diretamente por micro-organismos como polímeros derivados de fontes biológicas e, às vezes, para denotar polímeros biodegradáveis. Na Figura 1.2 são apresentados alguns polímeros obtidos a partir de fontes renováveis, parcialmente obtidos de fontes renováveis e obtidos a partir de fonte fósseis dispostos conforme sua biodegradabilidade.

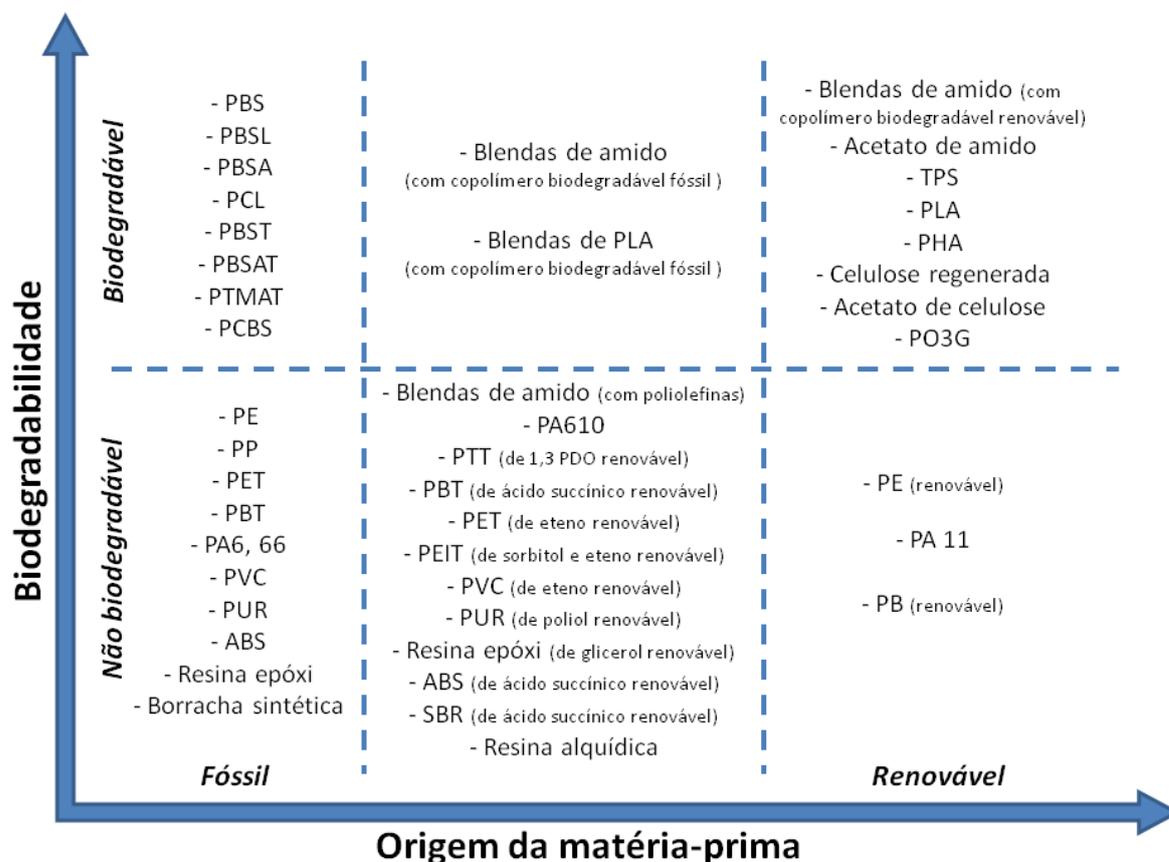


Figura 1.2: Classificação de polímeros quanto à biodegradabilidade e origem de obtenção (adaptada de Shen *et al.* (2009)).

Dentre os biopolímeros biodegradáveis obtidos a partir de fontes renováveis destacam-se os polihidroxicanoatos (PHAs), que serão abordados de modo mais detalhado porque são o objeto desta pesquisa.

1.2 Polihidroxicanoatos

Os Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres sintetizados por inúmeros microorganismos e são armazenados em corpos de inclusões insolúveis no citosol com objetivo de reserva de carbono e energia (DAWES e SENIOR, 1973; ANDERSON e DAWES, 1990; LEE, 1996b; SUDESH *et al.*, 2000). Através da polimerização de intermediários solúveis gerando moléculas insolúveis, a célula não altera sua pressão osmótica e nem permite a saída dessa fonte para o exterior da célula, armazenando carbono e energia e diminuindo a disponibilidade de carbono para outras espécies concorrentes (MADISON e HUISMAN, 1999; VERLINDEN *et al.*, 2007).

O crescente interesse nos PHAs é justificado por serem polímeros biodegradáveis que possuem propriedades similares aos polímeros petroquímicos, podendo apresentar

características de termoplásticos ou elastômeros dependendo das condições de cultivo e do micro-organismo utilizado. Outro ponto favorável é o fato destes serem obtidos a partir de fontes renováveis provenientes da agricultura e até mesmo de resíduos industriais (LEE, 1996a; BRAUNEGG *et al.*, 1998; KESHAVARZ e ROY, 2010). Além disso, os PHAs são insolúveis em água, são substâncias enantiomericamente puras (R-estereoisômeros), não tóxicos e biocompatíveis e possuem propriedades piezoelétricas (STEINBÜCHEL, 2001).

O custo elevado da produção dos PHAs ainda é um entrave na comercialização, mas já existem algumas empresas produzindo estes biopolímeros em diversos países como, por exemplo, nos Estados Unidos, Brasil, Japão e Itália, em alguns casos em escala piloto, mas com intenção de aumento de escala (TIAN *et al.*, 2009).

A Tabela 1.1 foi retirada e adaptada do relatório elaborado pelas associações European Bioplastics e European Polysaccharide Network of Excellence (SHEN *et al.*, 2009). A tecnologia de produção pertencente à Procter & Gamble foi repassada as empresas Kaneca e Meridian. A tecnologia do Biopol que pertencia a Zeneca foi repassada para a Monsanto em 1996 e depois repassada, em 2001, para a Metabolix. Em 2007 a empresa Metabolix e Archer Daniels Midland (ADM) formaram uma *joint venture* denominada Telles (SHEN *et al.*, 2009).

Tabela 1.1: Produção industrial de PHAs (adaptada de Shen *et al.* (2009)).

Empresa	País	Produto (nome comercial)	PHAs	Matéria-prima	Escala (2007)	Capacidade (2007)	Capacidade futura (2020)
Tianan	China	Enmat	P(3HB-co-3HV)	Milho	Industrial	2.000 t/ano	50.000 t/ano (A)
Telles	EUA	Mírel	copolímero de PHB	Milho	Industrial (A)	250 t/ano	500.000 t/ano (P)
Kaneka	Japão	Kaneka PHBH	P(3HB-co-3HHx)	Óleo vegetal	Piloto e Industrial (A)	100 t/ano	50.000 t/ano (P)
Green Bio - DSM	China	Green Bio	P(3HB-co-4HB)	Açúcares (não específicos)	Piloto e Industrial (A)	-	-
PHB Industrial	Brasil	Biocycle	P(3HB) e P(3HB-co-3HV)	Cana-de-açúcar	Pesquisa, Piloto e Industrial (A)	50 t/ano	10.000 t/ano (P)
Biomers	Alemanha	Biomer	P(3HB)	Sacarose	Pesquisa e Piloto	-	-
Mitsubishi Gas Chemical	Japão	Biogreen	P(3HB)	Metanol (de gás natural)	Pesquisa e Piloto	10 t/ano	-
Biomatera	Canada	Biomatera	P(3HB-co-3HV)	Açúcares (não específicos)	Pesquisa e Piloto	-	-
Meridian	EUA	Meridian PHA	-	Milho	Industrial (A)	-	272.000 t/ano (A)
Tepha	EUA	TephaFlex, TephElast	-	-	Pesquisa e Piloto	-	-
Tianzhu	China	PHBH	P(3HB-co-3HHx)	-	Pesquisa e Piloto	-	-
Procter & Gamble	EUA	Nodax	P(3HB-co-3HO) e P(3HB-co-3Hod)	-	Desativada em 2006	-	-
Monsanto	Japão	Biopol	P(3HB-co-3HV)	-	Desativada em 1998	-	-
Zeneca	Inglaterra	Biopol	P(3HB-co-3HV)	-	Desativada em 1996	-	-

1.2.1 Tipos de PHAs e classificação

O primeiro relato de observação em microscópio de corpos de inclusões refrativos, semelhantes a lipídeos, em bactérias ocorreu ainda no século XIX (BRAUNEGG *et al.*, 1998; SUDESH *et al.*, 2000). Porém o fato de estes corpos de inclusão serem poliéster permaneceu desconhecido até 1958 (LENZ *et al.*, 2005).

Apesar disto, a presença de corpos de inclusão, a composição e o fato de serem polímeros foi reportado em 1926, quando Lemoigne isolou da bactéria *Bacillus megaterium* e caracterizou o poli(3-hidroxiбутirato) (P3HB), biopolímero pertencente à família dos PHAs (FLICKINGER e DREW, 1999; LENZ *et al.*, 2005). Atualmente já foram identificados aproximadamente 150 tipos de constituintes da família de PHAs, exemplos são mostrados na Figura 1.3 (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995; SURIYAMONGKOL *et al.*, 2007).

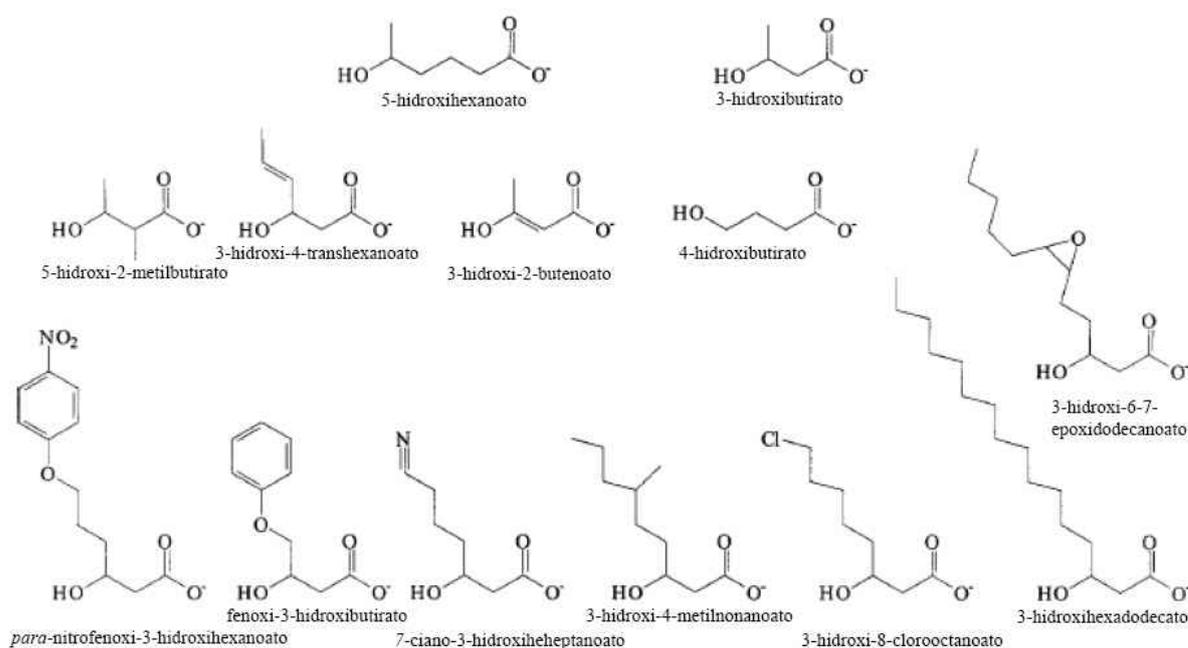


Figura 1.3: Exemplo de monômeros constituintes de polihidroxicanoatos (REHM, 2003).

A grande variedade de monômeros existentes constituintes de PHAs permite a obtenção de uma gama de polímeros com diferentes propriedades (SURIYAMONGKOL *et al.*, 2007). Porém, poucos destes biopolímeros foram obtidos em quantidades suficientes para caracterização e avaliação de suas propriedades (LEE, 1996b). A variedade mais estudada e melhor caracterizada é o poli(3-hidroxi-butirato) ou P(3HB), também chamado de poli(β -hidroxi-butirato).

Os polihidroxicanoatos são poliésteres com encadeamento cabeça-cauda, ocorrendo uma ligação éster entre o grupo carboxila de um monômero e o grupo hidroxila do monômero

vizinho. A substituição da hidroxila no átomo de carbono, na maioria dos PHAs se dá na configuração R devido à ação de enzimas estereo-específicas, com pequenas exceções onde o polímero não apresenta quiralidade (MADISON e HUISMAN, 1999). A estrutura geral dos PHAs está mostrada na Figura 1.4, onde n pode variar de 1 até 4 e a cadeia lateral R pode ser um simples hidrogênio, um grupamento alquila ou até mesmo cadeias aromáticas, insaturadas ou halogenadas (LEE, 1996b; MADISON e HUISMAN, 1999; VALAPPIL,BOCCACCINI *et al.*, 2007).

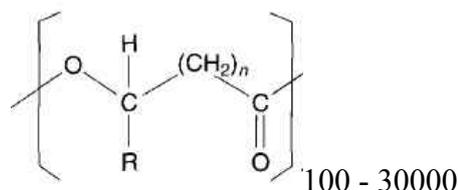


Figura 1.4: Estrutura geral dos polihidroxialcanoatos (LEE, 1996b).

A composição da cadeia lateral R e o valor de n contribuem para a identificação do polímero. Por exemplo, o poli(3-hidroxi butirato) possui uma metila no local do R e $n = 1$, apresentando no total 4 átomos de carbono, enquanto que o poli(3-hidroxi valerato) apresenta o mesmo n porém a cadeia R é uma etila (LEE, 1996b; BRAUNEGG *et al.*, 1998).

Micro-organismos podem produzir também copolímeros. A produção destes depende do micro-organismo utilizado, tipo de fonte de carbono e condição de cultivo. Durante a síntese do polímero, ao invés de ser adicionado sempre o mesmo monômero, pode ser adicionado outro monômero, de forma aleatória, quando disponível. O copolímero mais estudado é o poli(3-hidroxi butirato-co-valerato) (LEE, 1996b; BRAUNEGG *et al.*, 2004; LENZ *et al.*, 2005).

Os PHAs são classificados em 3 grupos de acordo com o número de átomos de carbono na molécula de monômero: PHAs com comprimento de cadeia curto (PHA_{SCL}) o qual compreende PHAs formados por monômeros contendo de 3 a 5 carbonos, PHAs com comprimento de cadeia médio (PHA_{MCL}) possuem de 6 até 14 carbonos PHAs com comprimento de cadeia longo (PHA_{LCL}). Normalmente PHA_{SCL} possuem características de polímeros termoplásticos enquanto que PHA_{MCL} apresentem semelhança com elastômeros (ZINN *et al.*, 2001; SURIYAMONGKOL *et al.*, 2007).

1.2.2 Características e aplicações dos PHAs

A crescente atenção dada aos PHAs se deve principalmente às características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e ainda por possuírem propriedades semelhantes aos polímeros petroquímicos que são amplamente utilizados (LEE, 1996a; KESHAVARZ e ROY, 2010).

As propriedades dos PHAs variam bastante e dependem dos monômeros de que os polímeros são constituídos e também de combinações destes, permitindo a obtenção de

materiais com diferentes características como no caso de copolímeros (LEE, 1996a; KHANNA e SRIVASTAVA, 2005a).

Na Tabela 1.2 são apresentadas propriedades de PHAs e de alguns polímeros petroquímicos. Comparando as propriedades do polipropileno e do P(3HB) percebemos semelhanças entre suas temperaturas de fusão e tensão de cisalhamento. Contudo, o P(3HB) possui resistência à ruptura muito menor. A adição do monômero 4-hidroxi-butirato (4HB), com formação do copolímero P(3HB-co-4HB), aumenta a resistência à ruptura (Tabela 1.2). A obtenção de copolímero de P(3HB-co-3HV) com monômeros 3-hidroxi-butirato e 3-hidroxi-valerato (3HV) resulta em um polímero mais flexível à medida que aumenta-se a fração do 3HV incorporado o que pode ser observado pela diminuição no módulo de Young (Tabela 1.2).

Tabela 1.2: Tabela de propriedades de alguns PHAs e alguns polímeros petroquímicos (adaptada de Lee (1996a)).

Polímero	Temperatura de fusão (°C)	Módulo de Young (GPa)	Tensão de cisalhamento (MPa)	Resistência à ruptura (%)
P(3HB)	179	3,5	40	5
P(3HB-co-3HV)				
3 mol% 3HV	170	2,9	38	-
9 mol% 3HV	162	1,9	37	-
14 mol% 3HV	150	1,5	35	-
20 mol% 3HV	145	1,2	32	-
25 mol% 3HV	137	0,7	30	-
P(3HB-co-4HB) ¹				
3 mol% 4HB	166	-	28	45
10 mol% 4HB	159	-	24	242
16 mol% 4HB	-	-	26	444
64 mol% 4HB	50	30	17	591
90 mol% 4HB	50	100	65	1080
P(4HB)	53	149	104	1000
P(3HHx-co-3HO) ²	61	-	10	300
Polipropileno	170	1,7	34,5	400
Polietileno-tereftaleno	262	2,2	56	7300
Poliestireno	110	3,1	50	-

¹ Poli(3-hidroxi-butirato-co-4-hidroxi-butirato)

² Poli(3-hidroxi-hexanoato-co-3-hidroxi-octanoato)

O P(3HB) apresenta-se sob forma amorfa enquanto permanece no interior da célula, porém quando extraído apresenta alta cristalinidade (entre 60 a 80 %) (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005a). A obtenção de copolímeros com monômeros 3HB e 4HB ou 3HB e 3HV, leva a um grau de cristalinidade menor que o homopolímero com 3HB (FLICKINGER e DREW, 1999; MADISON e HUISMAN, 1999). A massa molar média em massa M_w do P(3HB) varia em geral entre 1×10^4 a 3×10^6 g·gmol⁻¹ com polidispersão em torno de 2 (SUDESH *et al.*, 2002). O valor de M_w obtido depende tanto das condições de cultivo e micro-organismo utilizado como do método de extração do polímero de dentro das células.

A grande variedade de PHAs (entre homopolímeros e copolímeros) com diversas propriedades, associada à característica de biodegradabilidade torna esses biopolímeros excelentes candidatos à substituição de polímeros petroquímicos em artefatos, sobretudo nos artefatos descartáveis.

Os PHAs podem ser degradados pelo micro-organismo produtor, no caso deste necessitar utilizar essa reserva de carbono, quando ainda armazenados no interior da célula. Essa degradação ocorre por ação da enzima PHA depolimerase intracelular (MERRICK e DOUDOROFF, 1964; FLICKINGER e DREW, 1999). Contudo a degradação que faz com que os PHAs sejam intitulados “biodegradáveis” é a ação de micro-organismos sobre PHAs já extraídos da célula, e essa degradação não está vinculada apenas aos micro-organismos produtores de PHAs. Existe uma grande variedade de bactérias e fungos que desenvolveram a capacidade de utilizar PHAs como fonte de nutriente (FLICKINGER e DREW, 1999; JENDROSSEK e HANDRICK, 2002). Esses micro-organismos, encontrados no meio ambiente, geralmente hidrolisam os PHAs por ação de enzimas PHAs depolimerases extracelulares específicas. O produto desta hidrólise, monômeros e oligômeros de PHAs, são então utilizados como fonte de carbono (SUDESH *et al.*, 2000; JENDROSSEK, 2001). Os produtos gerados na biodegradação completa de PHAs, em geral, são os produtos comuns às atividades de crescimento de micro-organismo. Sendo água e CO₂ no caso da degradação ocorrer em meio aeróbio e água e metano em meio anaeróbio (LEE, 1996b; JENDROSSEK, 2001).

É importante ressaltar que a PHA depolimerase intracelular, geralmente, é incapaz de degradar os PHAs depois que foram removidos do interior da célula, assim como a enzima extracelular não degrada o polímero ainda no interior da célula. Isto se deve, provavelmente, a diferença de estrutura física que o PHA apresenta no interior e exterior da célula. No interior o PHA está na forma amorfa e quando extraído aumenta sua cristalinidade (JENDROSSEK, 2001; JENDROSSEK e HANDRICK, 2002). Recentemente foi avaliada a enzima PHA depolimerase intracelular de *B. megaterium* que apresentou capacidade de degradar P(3HB) na forma amorfa e na forma cristalina (CHEN *et al.*, 2009).

A biodegradação pode ocorrer em diversos ecossistemas, aeróbios ou anaeróbios, como nos solos, esgotos e ambientes aquáticos. Nesses ecossistemas, a taxa de biodegradação depende da densidade de população de micro-organismos capazes de degradar esse material, do pH, temperatura, potencial redox e disponibilidade de nutrientes. Além disso, o material a ser degradado, também influencia na biodegradação. Os fatores mais importantes são a cristalinidade, massa molar e composição dos monômeros (FLICKINGER e DREW, 1999; MADISON e HUISMAN, 1999). As PHAs depolimerases são capazes de degradar somente polímeros em configuração R. O poli((S)-3-hidroxiбутирато), sintetizado somente quimicamente, aparentemente não é degradado pela ação da PHA depolimerase (JENDROSSEK *et al.*, 1996).

Matavulj e Molitoris (2000) estudaram a biodegradação de amostras de Biopol^R (P(3HB-co-3HV) copolímero comercial), recortados de frascos de xampu (30x10x1 mm). As amostras foram colocadas em 11 ambientes diferentes e monitoradas durante 1 ano. Os

autores avaliaram perda de massa através de pesagem e também visualmente. Os ambientes que as amostras foram dispostas são: 1) rio Danúbio; 2) lodo na margem do rio Danúbio; 3) solo da floresta; 4) solo de campo; 5) estufa com turfa úmida; 6) estação de tratamento de esgoto (ETE), flotador; 7) ETE, tanque de aeração; 8) ETE, tanque pós-tratamento aeróbio 9) ETE, tanque com lodo de biorreator anaeróbio; 10) caçamba de lixo municipal e 11) estufa com compostagem úmida. As amostras foram retiradas a cada 5 semanas. A Figura 1.5 mostra as amostras que foram dispostas nos ambientes 1 até 10 mencionados acima.

Embora as amostras incubadas nos ambientes 1 até 4 e 9 não apresentem degradação visual, os autores observaram perda de massa, após 50 semanas, na ordem de 30 % na amostra colocada no rio Danúbio, 60 % na amostra disposta no lodo na margem do rio Danúbio, 11 % no solo da floresta, 16 % em solo de campo e 16 % na ETE, tanque com lodo de biorreator anaeróbio.

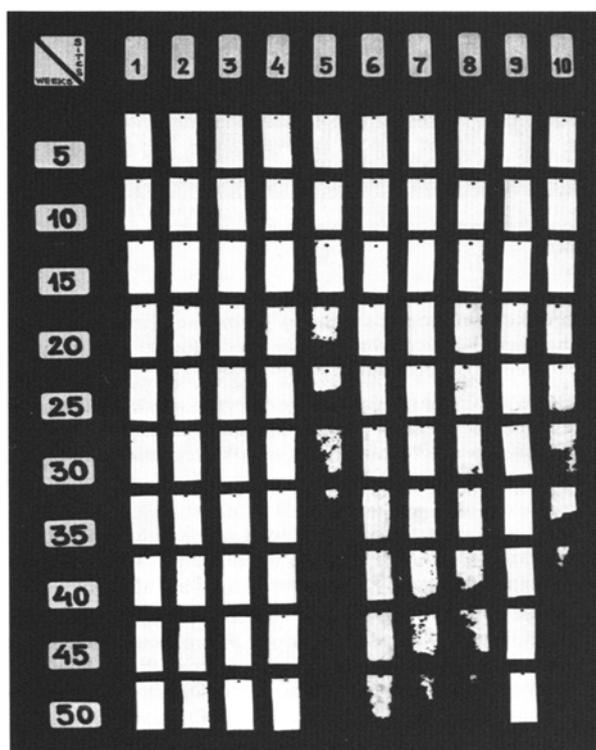


Figura 1.5: Degradação de amostra do Biopol, incubados em diferentes locais (1-10) monitorados a cada 5 semanas. Locais: 1) rio Danúbio; 2) lodo na margem do rio Danúbio; 3) solo da floresta; 4) solo de campo; 5) estufa com turfa úmida; 6) estação de tratamento de esgoto (ETE), flotador; 7) ETE, tanque de aeração; 8) ETE, tanque pós-tratamento aeróbio 9) ETE, tanque com lodo de biorreator anaeróbio; 10) caçamba de lixo municipal (MATAVULJ e MOLITORIS, 2000).

A Figura 1.6 amostras dispostas em estufa com compostagem úmida, ambiente 11. Neste ambiente foi observada degradação acelerada da amostra de biopolímero.



Figura 1.6: Degradação de amostra do Biopol, incubado em estufa com compostagem (MATAVULJ e MOLITORIS, 2000).

A variedade de PHAs encontrados com diferentes propriedades e em especial a capacidade de biodegradação possibilita uma grande gama de aplicação (VERLINDEN *et al.*, 2007). Os PHAs podem substituir o uso dos polímeros petroquímicos em embalagens e invólucros (MADISON e HUISMAN, 1999). Foi relatado o uso de PHAs em diversos artefatos entre eles: *containers*, pinos de golfe, fraldas, produtos de higiene, adesivos hot-melt e hot-melt sensíveis à pressão, filmes, embalagens de xampu e cosméticos (MADISON e HUISMAN, 1999; LUENGO *et al.*, 2003; KESHAVARZ e ROY, 2010).

Devido à biocompatibilidade apresentada pelos PHAs, a aplicação na área médica é favorecida. Neste campo, os PHAs podem ser utilizados em cápsulas para liberação controlada de medicamentos, fios para sutura, matriz bioabsorvível usada na engenharia de tecidos humanos, implante bioabsorvíveis usados na regeneração de ossos entre outras aplicações (ZINN *et al.*, 2001; KESHAVARZ e ROY, 2010).

1.2.3 Micro-organismos produtores e obtenção em diversas fontes de carbono.

Os PHAs são acumulados naturalmente por inúmeras bactérias, incluindo grupos taxonômicos diferentes como bactérias fototróficas, arqueobactérias, bactérias gram positivas e negativas, bactérias aeróbias e anaeróbias (YU e SHANG-TIAN, 2007). As bactérias mais utilizadas para estudo da produção de PHAs são *Cupriviadus Necator*¹ e *Azohydromonas lata*² e *Escherichia coli* recombinante no caso de PHA_{SCL} e *Pseudomonas* no caso de PHA_{MCL}.

Braunegg *et al.* (2004) apresentam alguns gêneros de micro-organismos capazes de produzir PHAs (Tabela 1.3).

Com o avanço da engenharia genética, outros organismos foram modificados na tentativa de aumentar a produção de PHAs. Plantas transgênicas obtidas a partir da *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* (milho), *Gossypium hirsutum* (algodão) já foram utilizadas para a produção de PHAs. Porém, o conteúdo de PHAs obtido nessas plantas ainda é

¹ Esta bactéria foi reclassificada diversas vezes. Já foi classificada como *Alcaligenes eutrophus*, *Hydrogenomonas eutropha*, *Ralstonia eutropha*, *Wausteria eutropha* e, recentemente, vem sendo denominada de *Cupriviadus necator* (VANDAMME e COENYE, 2004).

² A bactéria *Alcaligenes latus* foi reclassificada e atualmente é denominada de *Azohydromonas lata* (XIE e YOKOTA, 2005).

considerado baixo. Também foram feitas tentativas para a produção por modificação de leveduras como no caso da *Saccharomyces cerevisiae* (MADISON e HUISMAN, 1999; TIAN *et al.*, 2009).

As bactérias produtoras de PHAs podem ser divididas em 2 grupos. No primeiro grupo encontram-se aquelas que necessitam limitação de algum nutriente, N, P, Mg, K, O, entre outros, e excesso de carbono para que haja síntese de PHAs. Neste grupo destacam-se *Alcaligenes eutrophus*, *Protomonas extorquens* e *Pseudomonas Oleovorans*. O outro grupo não necessita limitação de nutrientes e a síntese de PHAs ocorre ainda na fase de crescimento celular. No segundo grupo encontra-se a bactéria *Alcaligenes latus* (LEE, 1996b). A bactéria *B. megaterium* é capaz de produzir sem limitação de nutriente com produção associada ao crescimento (MCCOOL *et al.*, 1996; OMAR *et al.*, 2001; FACCIN, 2007), embora seja relatado na literatura a necessidade de limitação de nitrogênio para a produção de P(3HB) com esta bactéria (DAWES e SENIOR, 1973).

Tabela 1.3: Gêneros de micro-organismos capazes de acumular PHAs.

Acinetobacter	Escherichia	Paracoccus
Actinomycetes	Ferrobacillus	Pedomicrobium
Alcaligenes	Gamphospheria	Photobacterium
Aphanotheca	Haemophilus	Pseudomonas
Aquaspirillum	Halobacterium	Rhizobium
Asticcaulus	Hyphomicrobium	Rhodobacter
Azomonas	Lamprocystis	Rhodococcus
Azospirillum	Lampropedia	Rhodopseudomonas
Azotobacter	Leptothrix	Rhodospirillum
Bacillus	Methanomonas	Sphaerotilus
Beggiatoa	Methylobacterium	Spirillum
Beijerinckia	Methylocystis	Spirulina
Beneckea	Methylomonas	Stella
Caryophanon	Methylovibrio	Streptomyces
Caulobacter	Micrococcus	Syntrophomonas
Chloroflexus	Microcoleus	Thiobacillus
Chlorogloea	Microcystis	Thiocystis
Chromatium	Moraxella	Thiodictyon
Chromobacterium	Mycoplana	Thiopedia
Clostridium	Nitrobacter	Thiosphaera
Corynebacterium	Nitrococcus	Vibrio
Derrxia	Nocardia	Xanthobacter
Ectothiorhodospira	Oceanospirillum	Zoogloea

Muitas bactérias vêm sendo testadas para a produção de PHAs, sendo que aquelas com alto acúmulo percentual de PHA, definido como razão entre a concentração de PHA e concentração de biomassa total em massa seca expressa em porcentagem, seriam mais adequadas (LEE, 1996b). Outro parâmetro importante é a produtividade de PHA definido como gramas de PHA produzidos por litro por hora. O rendimento de PHA com respeito à fonte de carbono também deve ser alto, este é definido pela razão de quantidade de PHA produzido por quantidade de fonte de carbono consumida.

A fonte de carbono é um componente muito importante no custo de produção dos PHAs, sendo que a contribuição deste pode chegar de 28 a 50 % do custo (LEE e CHOI, 1998; BRAUNEGG *et al.*, 2004). As fontes de carbono usualmente utilizadas são glicose, sacarose e outros sacarídeos. Além disso, também é possível produzir PHAs a partir de ácidos graxos, como a produção a partir de azeite de oliva, óleo de palma, óleo de milho entre outros (SOLAIMAN *et al.*, 2006). Uma alternativa para baixar o custo é a utilização de fontes de carbono proveniente de resíduos agro-indústrias para a produção de PHAs como no caso da utilização de lactose existente no soro de leite, pentoses e hexoses dos hidrolisados de celulose e hemicelulose, melação de cana, milhocina, xarope de tâmaras, fontes de carbono existente no lodo ativado entre outros (OMAR *et al.*, 2001; BRAUNEGG *et al.*, 2004; KOLLER *et al.*, 2005; KESHAVARZ e ROY, 2010). Outra alternativa para produção de PHAs a partir de fonte de carbono mais barata e ambientalmente favorável seria o sequestro de CO₂, pois algumas espécies de Cianobactérias são capazes de produzir PHAs a partir de CO₂ (KESSLER *et al.*, 2001). O glicerol vem sendo estudado para a produção de PHAs por se tratar de uma fonte de carbono abundante e que apresentou uma queda no preço por ser produzido em abundância como subproduto da produção de biodiesel (KOLLER *et al.*, 2005; NIKEL *et al.*, 2008; DOBROTH *et al.*, 2011; POSADA *et al.*, 2011).

1.2.4 Recuperação e purificação de PHAs

Uma etapa muito importante na produção dos polihidroxialcanoatos é a remoção do biopolímero do interior da célula, uma vez que são sintetizados e armazenados em corpos de inclusão no interior dos micro-organismos. Diversas estratégias foram empregadas para extrair o polímero, sendo que a maioria emprega métodos químicos ou mecânicos ou uma mistura destes. Jacquél *et al.* (2008) apresentam uma revisão dos principais métodos empregados na extração e purificação de P(3HB).

Dentre os métodos empregados para separação do PHA e a biomassa residual pode-se destacar a extração por solvente, digestão da biomassa residual, rompimento celular por ação mecânica, extração com fluidos supercríticos e liberação espontânea.

Um resumo de algumas técnicas, bem como suas vantagens e desvantagens, é encontrado no trabalho de Posada *et al.* (2011). Os autores apresentam também uma análise de custos do emprego de três metodologias com combinações de técnicas empregadas na recuperação do polímero.

O método mais empregado é a extração por solvente. Neste método o solvente deve permear a parede celular e solubilizar o polímero que se encontra no citosol. Os principais solventes utilizados são: clorofórmio, dicloroetano, carbonato de propileno, carbonato de etileno, alcoóis contendo cadeia com 4-10 carbonos, ésteres, cetonas entre outros (RAMSAY *et al.*, 1994; KESSLER *et al.*, 2001; POSADA *et al.*, 2011). Depois de separado, o polímero solubilizado é precipitado em um não solvente, por exemplo, água ou etanol.

A digestão celular ou digestão de biomassa residual pode ser realizada química ou enzimaticamente. O objetivo do emprego deste método é digerir o material não polimérico na célula, isto é, lipídeos, carboidratos, proteínas, enzimas, etc. Na digestão química podem ser empregados surfactantes como o dodecil sulfato de sódio (SDS) e triton, detergentes e hipoclorito de sódio entre outros. A digestão enzimática utiliza enzimas para a degradação da membrana celular sem sérios danos ao grânulo de P(3HB). Podem ser usadas enzimas hidrolíticas como lisozima, proteases, fosfolipases, lecitinases entre outras (KESSLER *et al.*, 2001; KAPRITCHKOFF *et al.*, 2006; POSADA *et al.*, 2011).

Para o rompimento celular por ação mecânica pode ser utilizados o homogeneizador de alta pressão, ultrasonicador ou leito Mill (TAMER *et al.*, 1998; JACQUEL *et al.*, 2008; POSADA *et al.*, 2011). Na extração supercrítica o principal fluido utilizado é o CO₂, que possui grande eficiência na extração de lipídeos e outros contaminantes hidrofóbicos. Este método possibilita a recuperação de polímero com alta pureza (KESSLER *et al.*, 2001). Devido ao avanço da engenharia genética podem ser construídos micro-organismos capazes de liberar espontaneamente o polímero para o meio. Um exemplo é o trabalho de Hori *et al.* (2002) no qual são apresentados modificações genéticas que permitiram o rompimento espontâneo do micro-organismo no final do cultivo induzido pela exaustão de glicose do meio.

Cabe ressaltar que em geral são empregadas combinações de técnicas para extração com objetivo de aumentar a eficiência e ainda podem ser empregados pré-tratamentos como tratamento térmico (FREDRICKSON *et al.*, 1970; TAMER e MOO-YOUNG, 1998).

1.3 Biopolímeros Poli(3-hidroxitirato)

O poli(3-hidroxitirato) ou P(3HB), também chamado de poli(β -hidroxitirato), é o membro dos PHAs mais estudado e o primeiro a ser descoberto (POSADA *et al.*, 2011). Sua fórmula química é (C₄H₆O₂)_n. A análise elementar teórica do polímero mostra 55,81 % de carbono, 7,03 % de hidrogênio e 37,16 % de oxigênio em massa (DAWES e SENIOR, 1973). Quanto à solubilidade, segundo Dawes e Senior (1973), o P(3HB) é solúvel em clorofórmio, tricloroetileno, dicloroacetato, trifluoretanol, dimetilformamida, etil acetoacetato, trioleína, 1,7,7-trimetildiciclo[2.2.1]heptan-2-ona (cânfora), ácido acético glacial entre outros. É pouco solúvel em dioxano, octanol, tolueno e piridina, e insolúvel em água, metanol, etanol, acetona, éter, hexano, etil acetato e tetracloreto de carbono. Outros solventes podem ser encontrados em Terada e Marchessault (1999).

Em 1971 foi, pela primeira vez, sintetizado quimicamente o poli-(3-hidroxitirato). O resultado foi um poli(3-hidroxitirato) parcialmente estereoregular, opticamente inativo, obtido a partir da polimerização de uma mistura racêmica de β -butirolactona utilizando sistema catalítico com trietilaluminio e água (DAWES e SENIOR, 1973; BLOEMBERGEN *et al.*, 1989). Tentativas anteriores geravam P(3HB) com baixa massa molar e baixa cristalinidade. Bloembergen *et al.* (1989) obtiveram uma fração de P(3HB) isotático com

propriedades similares ao P(3HB) de origem bacteriana. Estes autores obtiveram esse poliéster a partir do mesmo sistema utilizado em 1971, porém fizeram separação posterior das frações atática e isotática do polímero e verificaram que na fração isotática as hélices direita e esquerda formada durante a polimerização ficavam em domínios cristalinos distintos (BLOEMBERGEN *et al.*, 1989).

1.3.1 Síntese de P(3HB) por micro-organismos

Para que ocorra síntese de P(3HB), inicialmente é necessário ter disponibilidade de fonte de carbono, apropriada para a síntese, no meio de cultura. Essa fonte tem que permear a parede celular e ficar disponível para que uma série de reações anabólicas ou catabólicas, ou mesmo ambas, ocorram e produzam o (R)-3-hidroxiacetil-CoA (3HB-CoA), o qual é o substrato (monômero) para a PHA sintase (também chamada PHA polimerase). Assim a PHA sintase, enzima chave para a síntese de PHAs, catalisa a formação das ligações ésteres com liberação da coenzima A formando o P(3HB) (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995; SUDESH *et al.*, 2000).

Um dos intermediários na síntese do P(3HB) é a acetil coenzima A (acetil-CoA) que é necessária para a síntese do monômero (R)-3-hidroxiacetil coenzima A (3HB-CoA). Porém, essa molécula é também o composto chave para o metabolismo celular, sendo oxidada através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) também conhecido como ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs. Acetil-CoA, intermediário central no metabolismo de todos os compostos de carbono, pode ser usado para gerar energia biologicamente útil ou utilizado para o crescimento e multiplicação (BABEL *et al.*, 2001). Desse modo a síntese de P(3HB) concorre com o TCA pela utilização da acetil-CoA.

A Figura 1.7 mostra um esquema de possíveis rotas metabólicas para a produção de acetil-CoA a partir de glicose ou glicerol, P(3HB) e biomassa. No caso de metabolização de glicose, duas vias possíveis são apresentadas a via Embden–Meyerhof–Parnas (EMP), também conhecida como glicólise ou via glicolítica, e a via Entner–Doudoroff (EDP). Ainda poderia ser metabolizada pela via da pentose fosfato (PP) (TYO *et al.*, 2010), porém esta via não é apresentada nesse diagrama.

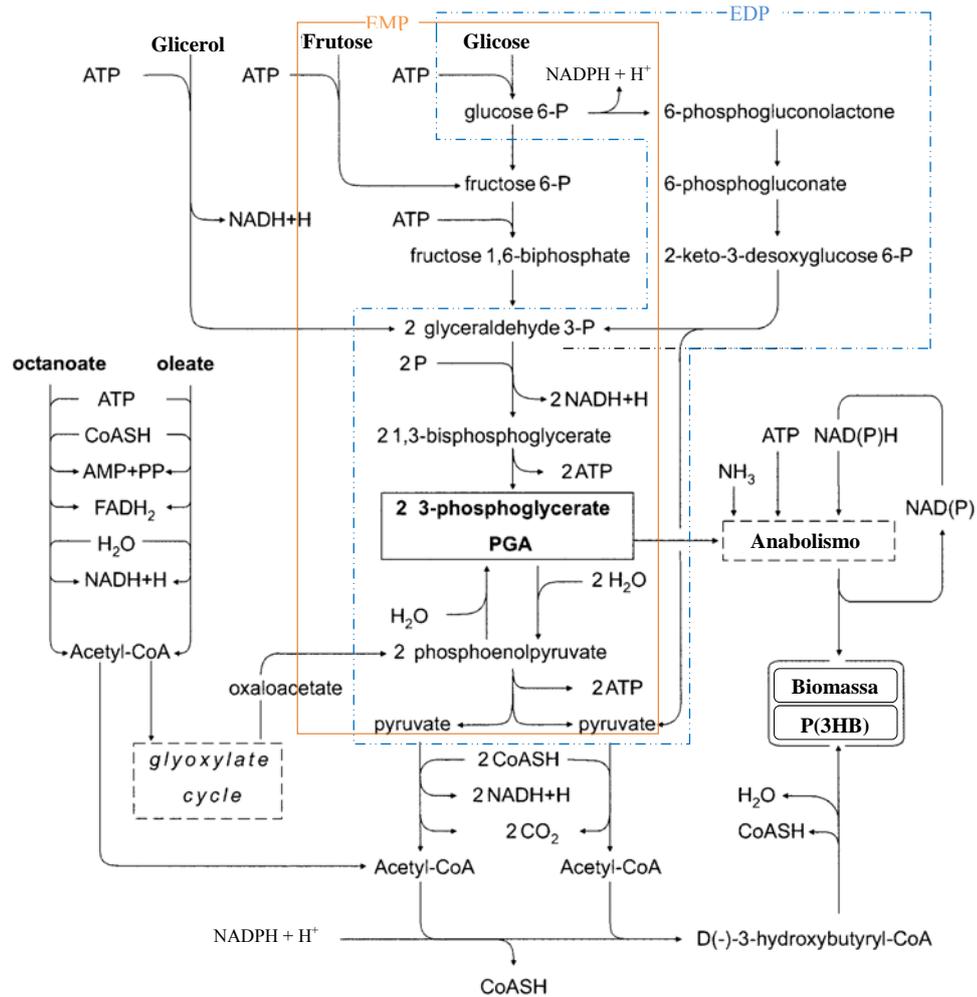


Figura 1.7: Esquema das principais rotas metabólicas para produção de biomassa residual e P(3HB) a partir de diferentes fontes de carbono (BORMANN, 2000). EMP: via Embden–Meyerhof–Parnas ou glicólise, EDP: via Entner–Doudoroff.

O P(3HB) pode ser obtido a partir de diversas fontes de carbono. A via mais conhecida é a que ocorre a partir da metabolização de açúcares, mas também é possível a obtenção do monômero pela rota de degradação de ácidos graxos ou β -oxidação e pela rota de biossíntese de ácidos graxos, todas tendo a acetil-CoA como composto intermediário. A Figura 1.8 mostra três possíveis rotas metabólicas para produção do monômero (R)-3-hidroxitiril-CoA, bem como outros monômeros que seriam provenientes de outras rotas para formação de PHAs.

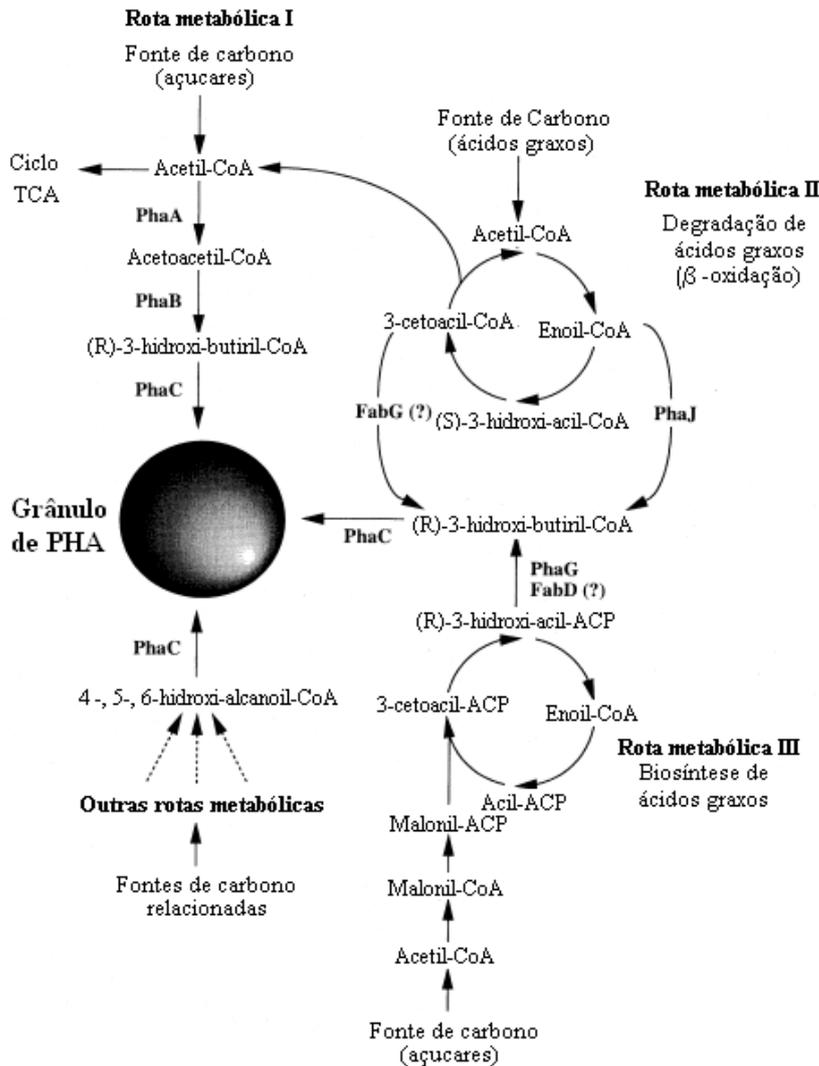


Figura 1.8: Rotas metabólicas conhecidas para suprimento do monômero (R) 3-hidroxi-butirato utilizado na síntese de P(3HB) (SUDESH *et al.*, 2000). PhaA, β -cetotiolase; PhaB, NADPH-dependente acetoacetil-CoA redutase; PhaC, PHA sintase; PhaG, 3-hidroxiacil-ACP-CoA transferase; PhaJ, (R)-enoil-CoA hidratase; FabD, malonil-CoA-ACP transacilase; FabG, 3-cetoacil-CoA redutase.

A síntese a partir de açúcares, geralmente, ocorre em 3 etapas na maioria das bactérias estudadas. A Figura 1.9 ilustra essas etapas que foram elucidadas para a *Ralstonia eutropha*. Na primeira etapa duas moléculas acetil-CoA são condensadas pela ação da enzima β -cetotiolase (acetil-CoA C transferase, EC2.3.1.9) ou PhaA gerando uma molécula acetoacetil coenzima A (acetoacetil-CoA) e liberando uma molécula de coenzima A (CoA). A próxima etapa é catalisada pela acetoacetil coenzima A redutase (hidroxibutiril-CoA desidrogenase, EC 1.1.1.36) ou PhaB, normalmente NADPH dependente, que reduz a acetoacetil-CoA à (R)-3-hidroxi-butiril coenzima A (3HB-CoA) que é o monômero da reação de polimerização. Para a realização da segunda etapa é requerido o co-fator NADPH. A reação de polimerização, 3ª etapa, é catalisada pela Pha sintase (PhaC) com liberação de mais uma coenzima A (KAWAGUCHI e DOI, 1992; TROTSENKO e BELOVA, 2000).

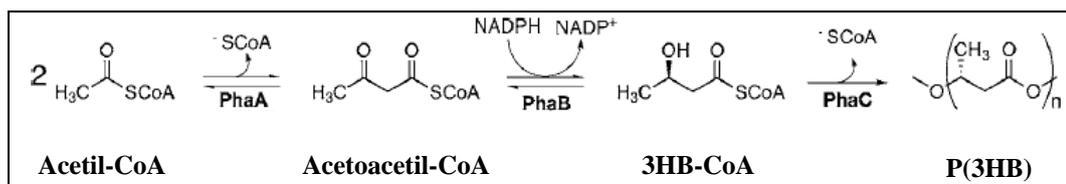


Figura 1.9: Rota metabólica da síntese de P(3HB) (STUBBE *et al.*, 2005).

A síntese de P(3HB) é favorecida quando se tem grande quantidade de Acetil-CoA e NADPH e baixa concentração de Coenzima A livre (DAWES e SENIOR, 1973). Tyo *et al.* (2010) mostraram, para *E. coli* recombinante, que a enzima acetoacetil coenzima A redutase NADPH dependente (PhaB) é responsável pelo controle da rota metabólica para produção de P(3HB). O co-fator NADPH consumido na reação de condensação de 2 acetil-CoA necessita ser regenerado em alguma outra rota metabólica para que continue a síntese de P(3HB) (YAMANE, 1993).

A síntese de P(3HB) é a única, dentre outros compostos acumulados por micro-organismos para reserva de energia, que não requer participação direta de ATP (adenosina trifosfato), isto é, não consome diretamente ATP na síntese (DAWES e SENIOR, 1973).

Cabe ressaltar que apesar de não envolver diretamente o co-fator NAD^+ nem ATP nas reações de produção de P(3HB) a partir da Acetil-CoA sempre é necessário considerar as relações de reciclagem de NAD^+/NADH e ATP/ADP , pois a falta de algum destes componentes pode afetar o fluxo de metabólitos (YAMANE, 1993).

A acetoacetil-CoA redutase é encontrada em duas formas, uma requer especificamente o co-fator NADPH e a outra NADH. A primeira catalisa a formação de (R)-3-hidroxitiril coenzima A, enquanto a NADH forma essa molécula na configuração (S). No caso de formação de (S)-3-hidroxitiril coenzima A ocorre a conversão de configuração (S) para (R) via crotonil-CoA, uma vez que a Pha sintase apresenta especificidade para o monômero na configuração R (TROTSSENKO e BELOVA, 2000). Estudos com *Azotobacter beijerinckii* mostraram que a acetoacetil coenzima A redutase (PhaB) tem preferência pelo co-fator NADPH ao invés de NADH, sendo que na presença de NADH a taxa de reação é cinco vezes menor (DAWES e SENIOR, 1973).

O metabolismo do P(3HB) é cíclico (Figura 1.10), a relação entre a síntese e degradação do P(3HB) é dada pelas condições de crescimento. Em condições desfavoráveis, em geral baixa oferta de carbono, o P(3HB) é degradado pela ação da enzima Pha depolimerase (PhaZ) formando ácido 3-hidroxitirílico que é convertido a ácido acetoacético pela ação da 3-hidroxitirilato desidrogenase NAD^+ dependente. Seguindo o ciclo teremos a formação de acetoacetil-CoA pela ação da acetoacetil-CoA sintetase, intermediário comum entre a síntese e degradação do P(3HB). A partir disto, este pode ser usado na síntese de P(3HB) ou conversão à acetil-CoA pela reação reversível novamente catalisada pela β -cetotiolase (KAWAGUCHI e DOI, 1992; SUDESH *et al.*, 2000; TROTSSENKO e BELOVA, 2000).

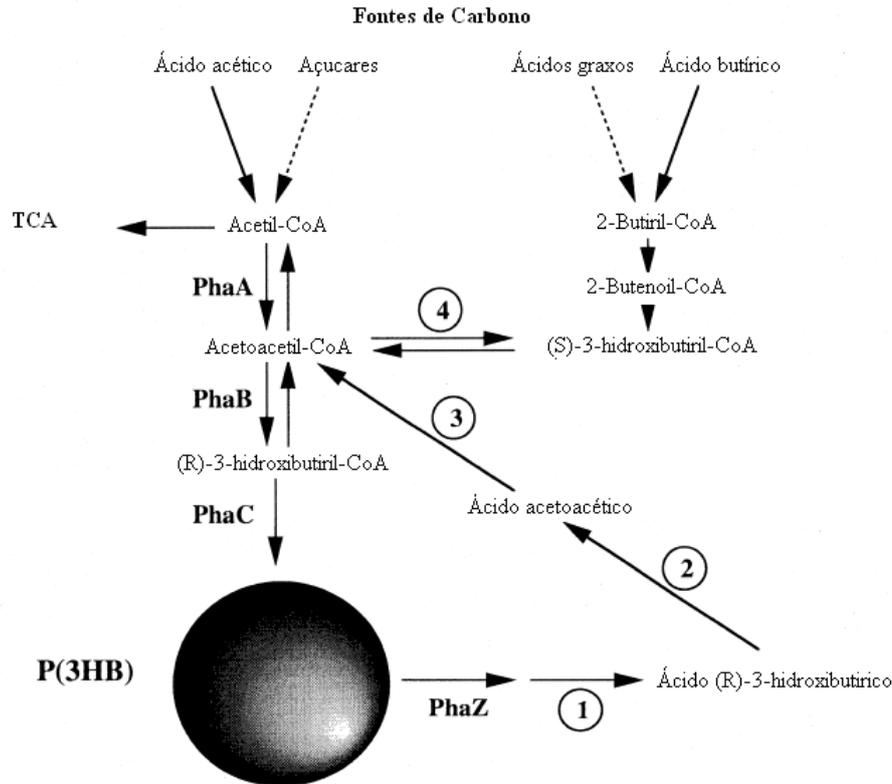
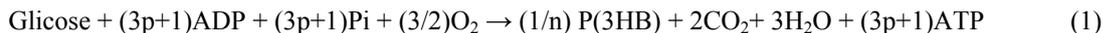


Figura 1.10: Metabolismo cíclico da biossíntese e degradação do P(3HB) em bactérias (SUDESH *et al.*, 2000). PhaA, β -cetotiolase; PhaB, NADPH-dependente acetoacetyl-CoA redutase; PhaC, PHA sintase; PhaZ, PHA depolimerase; 1, dímero hidrolase; 2, (R)-3-hidroxibutirato desidrogenase; 3, acetoacetyl-CoA sintetase; 4, NADH-dependente acetoacetyl-CoA redutase.

Conforme mencionado anteriormente, o precursor do monômero para produção de P(3HB), a acetil-CoA, é um composto chave no metabolismo celular. Acetil-CoA é completamente oxidada à CO_2 , pelo TCA, reduzindo NAD^+ , NADP^+ e FAD . Estes carreadores de elétrons na forma reduzida são posteriormente oxidados através de processos de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa para formar a força motriz de prótons e sintetizar ATP. O TCA, além de prover equivalentes redutores para a síntese de ATP, provê também precursores para biossíntese sendo, portanto, anfibólico (KIM e GADD, 2008).

O TCA é regulado pela energia na célula e pela disponibilidade de precursores de biossíntese. Além disso, o ciclo do TCA só poderá ser realizado se os co-fatores, carreadores de elétrons, forem reciclados. Sob condições aeróbias os co-fatores liberam os elétrons para o oxigênio, acceptor final de elétrons (STEPHANOPOULOS *et al.*, 1998).

São 3 os pontos de regulação do ciclo do TCA, que correspondem à inibição das enzimas citrato sintase, isocitrato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase. Para a inibição da ação destas enzimas, deve haver níveis elevados de NADH/NAD^+ (STEPHANOPOULOS *et al.*, 1998). A citrato sintase, responsável pela utilização de acetil-CoA e oxaloacetato para formação do citrato, geralmente é reprimida pelo acúmulo de NADH , ATP e 2 cetoglutarato (KIM e GADD, 2008). A Figura 1.11 ilustra o TCA com indicação dos pontos de controle do ciclo.

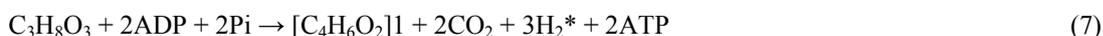
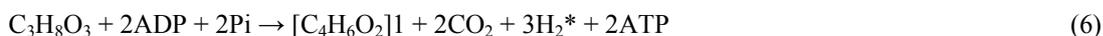
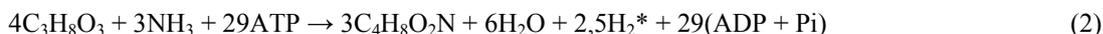


onde: ADP representa a adenosina difosfato, ATP representa a adenosina trifosfato, p é calculado e representa a razão P/O (relação entre a síntese de ATP e consumo de oxigênio) e Pi representa o grupo fosfato livre.

De acordo à reação (1) o rendimento teórico, em base mássica, da produção de P(3HB) a partir de glicose ($Y^T_{P/C}$) é igual a 0,48 (1 molécula de glicose gera 1 molécula de 3HB, monômero), para o caso onde ocorre síntese na fase estacionária. Este rendimento é o máximo valor de rendimento possível de ser obtido na produção de P(3HB) a partir de glicose quando a síntese não é associada ao crescimento uma vez que toda glicose seria utilizada na síntese de P(3HB) sem considerar a biomassa residual (YAMANE, 1993).

Yamane (1993) propõe o cálculo do rendimento teórico pela razão entre a quantidade de P(3HB) produzido e a quantidade de fonte de carbono utilizada somente para produção deste polímero. No caso de produção não associada ao crescimento, pode-se estimar a quantidade de carbono utilizada somente na fase estacionária de crescimento, desconsiderando a quantidade utilizada para manutenção celular. Para o cálculo de rendimento global da produção de P(3HB) a partir de carbono ($Y^G_{P/C}$), considera-se o total de fonte de carbono consumida durante o cultivo (YAMANE, 1993).

Bormann (2000) apresenta, baseado no esquema apresentado na Figura 1.7, reações para obtenção de P(3HB) e biomassa pelas diferentes rotas metabólicas. O autor considera a composição elementar da biomassa residual X_R representada por $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N}_1$ e sendo a composição do monômero de P(3HB) representado por $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$. Sendo a obtenção de biomassa residual representada pela expressão (2) no caso de utilização de glicerol como fonte de carbono, (3) utilização de glicose ou frutose como fonte de carbono metabolizada na via EMP e (4) utilização de glicose ou frutose como fonte de carbono metabolizada na via EDP. Também são apresentadas as reações para a obtenção de P(3HB) sendo na expressão (5) obtida a partir de glicerol via EMP, (6) a partir de glicose ou frutose como fonte de carbono metabolizada na via EMP e (7) a partir de glicose ou frutose como fonte de carbono metabolizada na via EDP.



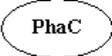
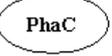
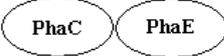
onde H_2^* representa os agentes redutores NADPH + H (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida) e FADH₂ (flavina-adenina dinucleotídeo na forma reduzida).

Bormann (2000) demonstrou que a reação de formação de biomassa residual, como já se sabe, é um processo que consome energia, evidenciado pelo consumo de ATP nas reações 2 - 4. Sendo necessária estar acoplada a outro processo que gere um excedente de energia. Já a produção de P(3HB) gera ATP e poder redutor, ou seja, aumento da concentração dos agentes redutores. Bormann (2000) sugere que a produção de P(3HB) quando associada ao crescimento pode contribuir para 2 processos metabólicos: suprimento de energia para síntese de biomassa residual e reserva de carbono e energia. Bormann (2000) concluiu que uma diminuição na fosforilação oxidativa pode ser compensada pelo aumento do poder redutor (agente oxidante) a fim de superar o déficit de energia requerida para síntese de biomassa residual. Esse estudo teórico só tem fundamento no caso de nenhuma outra via catabólica estar ativa ao metabolismo da bactéria. Como no caso de limitação de oxigênio e aumento da razão NADH₂/NAD estimulam a produção de P(3HB).

Os genes que codificam as enzimas responsáveis pela síntese do P(3HB) vêm sendo estudados ao longo dos anos (ANDERSON e DAWES, 1990; MCCOOL e CANNON, 1999; REHM e STEINBÜCHEL, 1999; MCCOOL e CANNON, 2001; SATOH *et al.*, 2002; HOFFMANN e REHM, 2004; LEE *et al.*, 2004). Rehm (2003) apresenta uma revisão sobre os genes que codificam as enzimas envolvidas na síntese de PHAs por diversos micro-organismos e sua classificação. Inicialmente as bactérias produtoras foram classificadas em 3 grupos de acordo com as características da Pha sintase quanto ao tamanho da enzima número de unidade e especificidade pelo substrato. Porém depois de estudos sobre com a *B. megaterium* verificou-se a necessidade de criar um quarto grupo (MCCOOL e CANNON, 1999; MCCOOL e CANNON, 2001).

A Tabela 1.4 apresenta as quatro classes de Pha sintase. A primeira classe é representada pela bactéria *R. eutropha*. Enzimas pertencentes à Classe I possuem uma subunidade PhaC que apresenta especificidade para monômeros de cadeia curta (por se tratar de uma polimerização o monômero é o substrato da reação para pha sintase). A bactéria *A. latus* também pertence à Classe I. A Classe II é representada pela *Pseudomonas oleovorans*. A Pha sintase que pertence a esta classe, é composta por uma subunidade, e tem especificidade para monômeros de cadeia média. As Classes III e IV são compostas por sintases formadas por 2 subunidades, sendo necessária presença de ambas para ocorrer síntese do polímero. A Pha sintase da Classe III utiliza monômeros de cadeia curta e média e é formada por 2 subunidades a PhaC e a PhaE. Esta classe é representada pela bactéria *A. vinosum*. A *B. megaterium* representa a Classe IV de Pha sintase, que apresenta preferência por monômeros de cadeia curta e é composta pelas subunidades PhaC e PhaR (REHM, 2003).

Tabela 1.4: Classificação da Pha sintase (adaptada de Valappil, Boccaccini *et al.* (2007)).

Classe	Subunidade	Ocorrência	Substratos
I	 PhaC ~ 60 – 73 kDa	<i>Ralstonia eutropha</i> + a maioria das bactérias com exceção das citadas abaixo	3HA _{SCL} -CoA [~ C ₃ -C ₅] e 4HA _{SCL} -CoA, 5HA _{SCL} -CoA, 3MA _{SCL} -CoA
II	 PhaC ~ 60 – 65 kDa	<i>Pseudomonas oleovorans</i> + todas <i>Pseudomonas</i> sp. que possuem rRNA homólogo ao grupo I	3HA _{MCL} -CoA [~ ≥C ₅]
III	 PhaC PhaE ~ 40 kDa ~ 40 kDa	<i>Allochromatium vinosum</i> <i>Thiocapsa pfennigii</i> + algumas bactérias púrpuras sulfurosas e todas as cianobactérias	3HA _{SCL} -CoA [~ C ₃ -C ₅] (3HA _{MCL} -CoA [~ C ₆ -C ₈] e 4HA-CoA, 5HA-CoA)
IV	 PhaC PhaR ~ 40 kDa ~22kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	3HA _{SCL} -CoA [~ C ₃ -C ₅]

Existem exceções para essa classificação como, por exemplo, a *Thiocapsa pfennigii*, *Aeromonas punctata*, *Pseudomonas* sp. 61-3.

A representação da organização dos genes para as proteínas relacionadas com a produção de PHAs, para as quatro classes de Pha sintase, é apresentada na Figura 1.12. Na bactéria *R. eutropha* os genes que constituem o operon *phaCAB* são responsáveis pela síntese dos PHAs, sendo formado pelos genes *phaC* (que codifica a enzima Pha sintase), *phaA* (responsável pela codificação da β-cetotiolase) e *phaB* (que codifica enzima acetoacetyl-CoA redutase). As *Pseudomonas*, pertencentes à Classe II, possuem 2 genes diferentes que codificam a Pha sintase, sendo estes separados pelo gene *phaZ*, que codifica a Pha depolimerase intracelular. Além disso, possuem o gene *phaD* que codifica uma proteína com função desconhecida. Bactérias que possuem Pha sintase pertencentes à Classe III possuem o gene *phaC* e *phaE* ligados diretamente. Na *A. vinosum* os genes *phaA* e *phaB*, que codificam a β-cetotiolase e acetoacetyl-CoA redutase, respectivamente, estão localizados em lados opostos em relação aos genes da pha sintase (REHM, 2003).

O cluster responsável pela síntese de P(3HB) pela *B. megaterium*, contém os genes *phaP*, *phaQ*, *phaR*, *phaB* e *phaC*, sendo que os *phaP* e *phaQ* constituem um operon bicistrônico e são transcritos em direção contrária ao operon *phaRBC* (operon tricistrônico) constituídos pelos genes *phaR*, *phaB* e *phaC* como mostra a Figura 1.12 para classe IV (MCCOOL e CANNON, 1999; MCCOOL e CANNON, 2001; REHM, 2003; LEE *et al.*, 2004). Desetty *et al.* (2008) mostraram que a *Bacillus thuringiensis* R1, possui uma sequência de genes muito similar a da *B. megaterium* contendo os mesmos genes *phaP*, *phaQ*, *phaR*, *phaB* e *phaC*. Satoh *et al.* (2002) estudaram o operon *phaRBC* da *Bacillus* sp. INT005 que concluíram ser similar à da *B. megaterium*, porém não mencionam os genes *phaQ* e *phaP*.

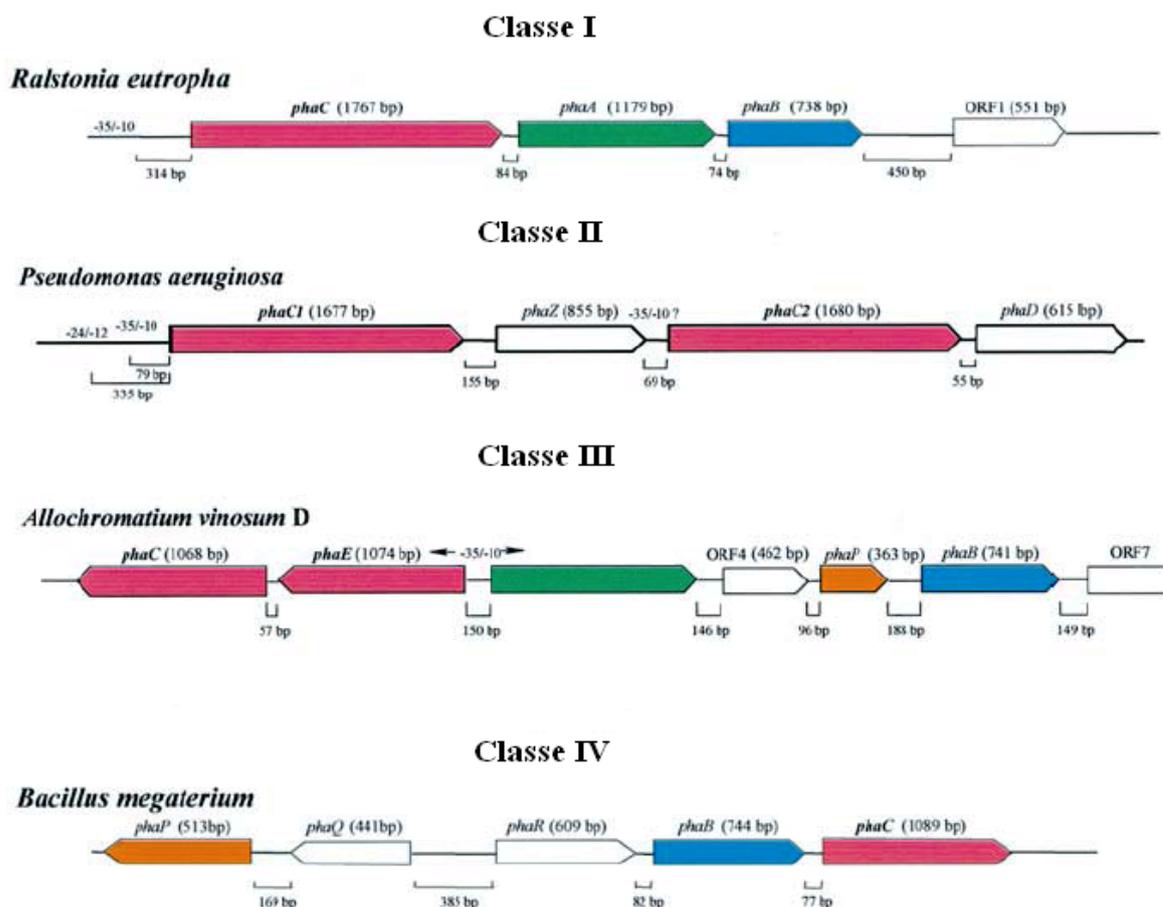


Figura 1.12: Representação da organização dos genes que codificam proteínas responsáveis pela síntese de PHAs (REHM, 2003).

Na *B. megaterium* as proteínas PhaR e PhaC, codificadas pelos genes *phaR* e *phaC*, são responsáveis pela etapa de polimerização do monômero. Sendo que se não houver a presença simultânea das duas proteínas não ocorre síntese de PHA. A PhaR parece ser a proteína responsável pela ativação da PhaC (MCCOOL e CANNON, 2001).

A proteína PhaB da *B. megaterium*, codificada pelo gene *phaB*, responsável por suprir o substrato para a Pha-sintase, apresenta similaridade com outras PhaB encontradas em bactérias produtoras de PHAs, porém apresenta maior similaridade com FabG (proteína relacionada a degradação de ácidos graxos ou β -oxidação) (MCCOOL e CANNON, 1999). Experimentos com *B. megaterium* PHA05 (mutante PHA negativo) onde foi adicionado um plasmídeo contendo o cluster dos genes *pha* com o gene *phaB* deletado, mostrou a importância desse gene, uma vez que não houve síntese de P(3HB) com a deleção. Contudo, se o plasmídeo não tiver esse gene deletado ocorre a síntese de P(3HB) na *B. megaterium* PHA05 (MCCOOL e CANNON, 2001). Existem evidências que na *Bacillus* sp. INT005 a PhaB supre a PHA sintase a partir de intermediários do ciclo da β -oxidação (TAGUCHI *et al.*, 2001; SATOH *et al.*, 2002).

O gene *phaP* codifica a proteína PhaP, fasina, que é extremamente hidrofílica. Esta proteína é encontrada nos corpos de inclusão contendo PHA na *B. megaterium*. Mccool e Cannon (1999) sugerem que esta proteína pode ser material de reserva utilizado como fonte

de aminoácidos. Além disso, a PhaP pode estar envolvida na estabilização do grânulo hidrofóbico de PHA situado no citoplasma celular hidrofílico (SUDESH *et al.*, 2000; ZINN *et al.*, 2001). A PhaQ, codificada pelo gene *phaQ*, é a proteína responsável pelo controle transcricional dos genes *phaQ* e *phaP*. A PhaQ exerce regulação negativa impedindo a transcrição dos genes. Quando inicia a síntese de P(3HB), a PhaQ libera a transcrição sendo então considerada então uma proteína repressora sensível ao P(3HB) (LEE *et al.*, 2004). Deste modo é possível considerar que o P(3HB) induz a expressão do *phaP* através do sistema regulatório da PhaQ.

O gene *phaA* que em outras classes codifica a enzima PhaA (β -cetotiolase) não aparece neste conjunto, sendo não elucidada a ausência do *phaA*. O suposto cluster dos genes *pha* da *B. megaterium* foi clonado e testado na *E. coli* (não produtora de PHA) e na *Pseudomonas putida* GPp104 PhaC⁻ mutante no trabalho de McCool e Cannon (1999). Uma vez que a *E. coli* não possui a enzima PhaA, não foi possível produzir quantidade significativa de PHA com esta bactéria contendo o cluster dos genes *pha* da *B. megaterium*. Já o teste com a *P. putida* mutante, na qual não é requerida a PhaA, houve acúmulo de PHA mesmo em meio que a cepa selvagem não é capaz de sintetizar PHA. Esse teste mostrou que o *cluster* dos genes *pha* da *B. megaterium* é funcional, mesmo sem o gene *phaA* (MCCOOL e CANNON, 1999). Dessety *et al.* (2008) também verificaram a ausência do gene *phaA* cluster dos genes *pha* da *B. thuringiensis* R1. Para tornar possível a produção de PHA pela *E. coli* recombinante os autores tiveram que complementar a sequência do cluster dos genes *pha* da *B. thuringiensis* R1 com o gene *phaA* da *R. eutropha* (DESETTY *et al.*, 2008).

Os corpos de inclusão de PHA no citoplasma/citosol são compostos por um centro hidrofóbico contendo PHA na forma amorfa cercado por uma membrana formada por uma monocamada de fosfolípídeos contendo proteínas catabólicas e não catabólicas. As proteínas catabólicas são as Pha polimerase (PhaC) e Pha depolimerase intracelular (PhaZ), enquanto que as não catabólicas são as fasinas (PhaP) (SUDESH *et al.*, 2000). A Figura 1.13 mostra a representação do grânulo de PHA (A) e microscopia eletrônica da bactéria *R. eutropha* contendo grânulos de PHA (B).

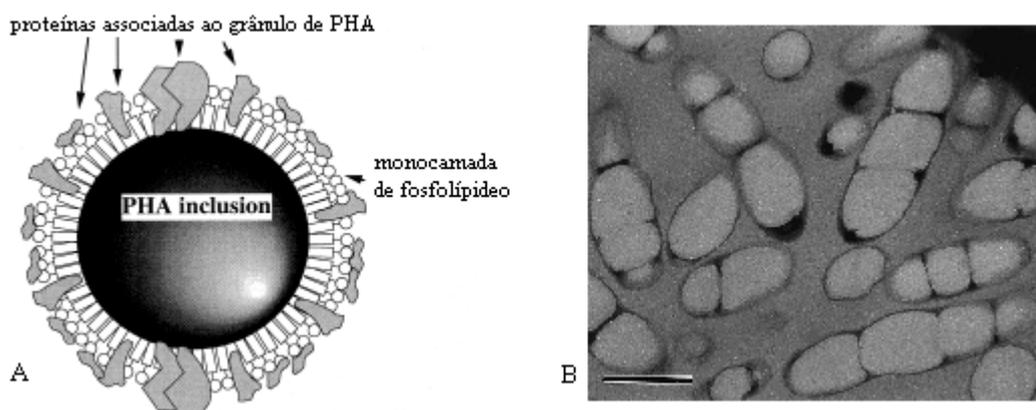


Figura 1.13: Representação do grânulo de PHA (A) e microscopia eletrônica da bactéria *Ralstonia eutropha* contendo grânulos de PHA (B) onde a barra representa 0,5 μ m (SUDESH *et al.*, 2000).

1.3.2 Produção de P(3HB) pelo gênero *Bacillus*

As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* possuem características interessantes para aplicações industriais como tolerância a alta temperatura e alta pressão osmótica. Sob condições adequadas apresentam rápido crescimento e são capazes de crescer em diversas fontes baratas de carbono (WU *et al.*, 2001). São bastante empregadas na produção industrial, sobretudo na produção de enzimas e proteínas. A *B. megaterium* é amplamente utilizada na produção industrial da vitamina B₁₂, penicilina amidase (enzima utilizada na produção de antibióticos sintéticos) entre outras (VARY, 1994). Contudo não é muito utilizada na produção de PHAs, principalmente por consumir a reserva de biopolímero para fins de esporulação, levando a um baixo percentual de acúmulo (WU *et al.*, 2001). Muitos estudos vêm sendo realizados na tentativa de aumentar o acúmulo de PHA por esta bactéria e testando fontes de carbono alternativas e mais baratas.

As bactérias do gênero *Bacillus* são formadoras de esporos, tanto mesófilos quanto termófilos. Esporos possuem uma parede espessa impermeável que protege o material genético mesmo em condições extremas. Sob condições favoráveis ao crescimento, os esporos germinam levando a formação de uma nova célula vegetativa. A formação do endoesporo, formado dentro da célula-mãe, está associada a condições desfavoráveis para o crescimento vegetativo, o estímulo mais comum na natureza é a limitação de nutrientes (FLICKINGER e DREW, 1999; GOULD e RICHARD, 1999; ALBERTS, 2008). O processo de esporulação envolve sete estágios morfológicos culminando na lise da célula-mãe com liberação do esporo maduro aproximadamente 7 h a 8 h após o início do processo de esporulação (VARY, 1994; FLICKINGER e DREW, 1999).

A *B. megaterium* é uma bactéria Gram-positiva, capaz de utilizar amônia como fonte de nitrogênio, não necessita suplementação do meio de cultura com fatores de crescimento e não apresenta crescimento em anaerobiose (KNIGHT e PROOM, 1950). Contudo, White (1972) sugere que a *B. megaterium* NCIB 9376, similar a DSMZ 32^T, pode necessitar de suplementação de L-treonina e L-valina para crescimento em meio mínimo.

Segundo Wu *et al.* (2001), os fatores que normalmente aumentam a produção de PHAs em outras bactérias, limitação de nutrientes (nitrogênio e fósforo, por exemplo) ou baixa oferta de oxigênio, no caso da *Bacillus* sp. JMa5, induzem a esporulação reduzindo a quantidade de PHB acumulado.

Segundo Slepecky e Law (1961), a produção de PHA na *B. megaterium* não é obrigatória para a formação de esporo, porém se este polímero estiver presente, este poderá ser consumido durante o processo de esporulação. Os autores reportaram que se as condições não são favoráveis para a utilização rápida de polímero, as células lentamente utilizarão o polímero como uma reserva de energia e fonte de carbono e não são propensas a esporular. No entanto, se as condições para a sua utilização rápida são favoráveis, os organismos rapidamente utilizam esta fonte de nutriente endógena para energia requerida no processo de esporulação. Além disso, verificaram que a adição de acetato ao meio aumenta a quantidade de P(3HB) acumulado. Neste estudo não foi encontrado P(3HB) nos esporos.

Macrae e Wilkison (1958, *Apud* (SLEPECKY e LAW, 1961)) mostraram que a síntese de P(3HB) e a quebra das cadeias de P(3HB) possuem pH ótimo em torno de 7,5. Segundo Slepecky e Law (1961) altas concentrações de glicose e acetato são condições favoráveis ao acúmulo de P(3HB), mas também levam a acidificação do meio.

Na bactéria *Bacillus cereus* o P(3HB) também é consumido durante a esporulação, e não foi encontrado P(3HB) nos esporos maduros. O acúmulo de polímero na célula durante os estágios iniciais de esporulação parece estar relacionada ao pH do meio, onde o maior acúmulo de P(3HB) ocorre quando o pH está entre 6,2 e 6,4 (NAKATA, 1963).

Chen *et al.* (2010) mostraram a regulação da expressão dos genes envolvidos na síntese de P(3HB), genes *phaR*, *phaB* e *phaC*, pelo *Spo0A* na bactéria *B. thuringiensis*. O fator de transcrição *Spo0A* desempenha papel central no início da esporulação em bacilos, além de controlar outros eventos como formação de biofilmes entre outros. Os autores mostraram que na ausência do *Spo0A* a *B. thuringiensis* não foi capaz de acumular P(3HB). Para verificar a influência da capacidade de esporulação os autores testaram cepa mutante que perdeu a capacidade de esporulação, ainda assim, na presença da *Spo0A*, produziu P(3HB), mostrando que a síntese de P(3HB) não está diretamente associada à formação do esporo nesta bactéria, mas regulada pelo mesmo fator *Spo0A*.

Wu *et al.* (2001), trabalhando com a *Bacillus* sp. JMa5, verificaram que a aeração é um parâmetro importante para a produção de P(3HB) e biomassa. O aumento da aeração aumenta a produção de biomassa enquanto que a diminuição da aeração facilita o acúmulo de P(3HB). Contudo, uma taxa de aeração muito baixa pode induzir à esporulação com conseqüente consumo de P(3HB).

Com finalidade de analisar a especificidade da *PhaA* sintase da *Bacillus* sp. INT005, Tajima *et al.* (2003) cultivaram esta bactéria em meio mínimo sem limitação de nitrogênio com diferentes fontes de carbono. Os meios testados continham como fonte de carbono açúcar (glicose) ou algum dos seguintes ácidos graxos (butirato, valerato, hexanoato, octanoato, decanoato, 4-hidroxibutanoato). Em todos os cultivos houve crescimento celular com acúmulo de P(3HB) (no caso de crescimento em meio contendo butirato) ou copolímeros contendo 3HB (nos demais meios testados). O maior acúmulo, 64,5 %, foi obtido em meio contendo octanoato produzindo poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) (P(3HB-co-3HHx)), maior que o cultivo contendo glicose o qual apresentou 32 % de acúmulo desse copolímero na célula. No cultivo utilizando butirato como fonte de carbono, os autores testaram a utilização conjunta de inibidor do ciclo da β -oxidação (o ácido acrílico). Sem utilização de ácido acrílico, o acúmulo de P(3HB) na célula atingido foi 31,5 % enquanto que com a utilização o acúmulo aumentou para 41,7 %. Esse resultado evidencia que a *PhaB*, desse micro-organismo, utiliza intermediários do ciclo da β -oxidação para suprir a *Pha* sintase (SATOH *et al.*, 2002; TAJIMA *et al.*, 2003).

Mccool *et al.* (1996) verificaram em seus experimentos que a *B. megaterium* apresentou uma diminuição no volume de PHA em relação à biomassa total durante a fase *lag* de crescimento. Na fase exponencial e início da fase estacionária aumentou o percentual de

acúmulo, sendo a maior taxa obtida no final da fase exponencial e na fase estacionária diminuiu a taxa de acúmulo, porém o percentual de polímero continuou aumentando. Os autores sugerem que o acúmulo de PHA ocorre durante o ciclo de crescimento e que é um processo que ocorre simultaneamente ao TCA.

Continuando o estudo com a *B. megaterium*, Mccool e Cannon (1999) verificaram também o consumo da proteína PhaP, proteína localizada na membrana superficial do grânulo de polímero, numa taxa parecida com a descrita para o PHA, com a diferença do consumo desta proteína também na fase estacionária, o que seria consistente com o consumo desta proteína como fonte de aminoácidos. Com esse resultado os autores sugeriram que o acúmulo de PHA na *B. megaterium* pode ter a múltipla função fonte de carbono, aminoácidos e poder redutor.

Em trabalho de Faccin (2007) foram realizados experimentos em incubadora orbital variando a razão carbono:nitrogênio com objetivo de aumentar a produção de polímero sem que seja desperdiçada grande quantidade de fonte de carbono. A melhor condição obtida foi para uma razão carbono:nitrogênio igual a 8 com acúmulo de polímero cerca de 70 % em relação à biomassa seca. Foi observado que em experimentos com limitação de nitrogênio ocorreu consumo de polímero. Experimentos em biorreator com volume útil de 4 litros e controle de pH obtiveram acúmulo menor, cerca de 28 % em relação a biomassa seca.

Experimentos em frasco agitado com a *B. megaterium* usando xarope de tâmaras ou melaço de beterraba como fontes de carbono possibilitaram um maior acúmulo de P(3HB), respectivamente 52 % e 50 %, do que quando foi utilizados açúcares simples como fonte, tais como sacarose e glicose que permitiram acúmulo de, respectivamente, 5 % e 33 % segundo o trabalho de Omar *et al.* (2001). Ao testar a fonte de nitrogênio juntamente com a milhocina como fonte de carbono, esses autores verificaram que o cloreto de amônio possibilitou um maior acúmulo comparado a outras fontes de nitrogênio testadas. Ao realizar experimentos em escala maior, biorreator com volume de 30 litros, a produção de polímero mostrou ser associada ao crescimento. No experimento em escala maior, os autores verificaram que, possivelmente, devido à limitação de nitrogênio ocorreu esporulação com consequente consumo de P(3HB), levando a um menor acúmulo comparado ao obtido em frasco agitado.

Gouda *et al.* (2001) verificaram o crescimento e produção de PHA na *B. megaterium* em diversas fontes de carbono e nitrogênio. Primeiramente testaram fontes de carbono com tempo de 48 horas de cultivo em frasco agitado e verificaram que, em termos de crescimento celular, o maior rendimento foi obtido com maltose seguido de sacarose e melaço de cana de açúcar, enquanto que o maior acúmulo de PHA foi obtido usando-se glicose (45,6 %), seguido por melaço de cana de açúcar (44,6 %). Quando foi testado o melaço em diferentes quantidades, os autores observaram que o crescimento celular aumentou quando foi usado 3 % de melaço de cana de açúcar no meio de cultura. O teste de diferentes fontes de nitrogênio, mais uma vez mostrou que o cloreto de amônia prove o maior crescimento celular e acúmulo de 40,1 % P(3HB). A utilização de 3 % milhocina no meio de cultura, fonte de nitrogênio alternativa mais barata, possibilitou acúmulo de 49,12 % com menor crescimento celular comparado ao obtido com cloreto de amônia como fonte de nitrogênio. Vijayendra *et*

al. (2007) também trabalharam com *B. megaterium* usando milhocina como fonte de nitrogênio. Estes autores fizeram a otimização do meio de cultura, analisaram a concentração de inóculo, sacarose (fonte de carbono), milhocina e sais de fosfato (sódio e potássio). Observaram que um inóculo grande favorece a formação de biomassa enquanto que um inóculo menor desfavorece a formação de biomassa mas favorece a formação de polímero. Verificaram também que uma maior concentração de sais de fosfato diminui o acúmulo de polímero, e segundo os autores a limitação de fosfato, juntamente com limitação de nitrogênio, aumentaria a produção de polímero. O maior acúmulo de P(3HB), obtido após 72 horas de cultivo, foi de 51,2 %.

Full *et al.* (2006) trabalharam com diversos bacilos isolados de solos ou lagos. Um destes bacilos, chamado de CL1, acumulou 90,9 % de PHA em relação à biomassa total quando utilizado glicose como fonte de carbono sem necessidade de limitação de nutrientes. Este bacilo também foi capaz de crescer em rafinose, trissacarídeo formado por glicose frutose e galactose, com acúmulo de 89,7 % de PHA. Os autores constataram que a cepa CL1, por análise comparativa de 16S rRNA, pertence a um subtipo de *Bacillus*, com características semelhantes as da *B. megaterium*, diferenciando-se pelo fato de a *B. megaterium* ser estritamente aeróbia, enquanto que a CL1 apresentou capacidade de crescer em anaerobiose (FULL *et al.*, 2006).

Kulpreecha *et al.* (2009) trabalharam com cultivo de *B. megaterium* em melaço de cana como fonte de carbono e uréia como fonte de nitrogênio. No experimento em biorreator batelada, em 12 horas de cultivo, o acúmulo de polímero alcançado foi de 61,6 % alcançando 8,8 g·L⁻¹ de célula com produtividade de polímero igual a 0,45 g·L⁻¹·h⁻¹. Já com cultivo na condição de batelada alimentada com estratégia de pH-stat iniciando a alimentação em 8 horas de cultivo o crescimento celular foi maior, 72,6 g·L⁻¹ em 24 horas de cultivo. O acúmulo percentual de polímero diminuiu nesta condição, sendo de 42,1 %, mas a produtividade de P(3HB) foi maior, 1,27 g·h⁻¹·L⁻¹. Os autores verificaram também a influência do oxigênio dissolvido (DO) no meio de cultivo durante a batelada. Testaram cultivos com controle em 40 %, 60 % e 80 % de oxigênio dissolvido, sendo que o cultivo com 40 % de oxigênio apresentou o pior resultado, 47 % de polímero acumulado, enquanto que para 60 e 80 % de oxigênio dissolvido o acúmulo de polímero foi em torno de 60 % sem diferença significativa entre estes 2 cultivos.

Pandiam *et al.* (2010) utilizaram a *B. megaterium* SRKP-3 em seus estudos e obtiveram satisfatória produção de polímero usando resíduos lácteos como fonte de carbono, farelo de arroz como fonte de nitrogênio e água do mar suprindo sais e micronutrientes.

Prabhu *et al.* (2010) isolaram a *Bacillus sp.* NQ-11/A2 de sedimentos marinhos e mostraram a capacidade de produção de PHA desta cepa a partir de diversas fontes de carbono como xilose, arabinose, glicose, frutose, galactose, lactose, sacarose, maltose celubiose, trialose, glicerol, manitol entre outros, mostrando assim a capacidade de não só metabolizar diversas fontes de carbono como também produzir biopolímeros.

A produção de PHA por bactéria isolada de amostra de esgoto municipal, identificada como *B. megaterium* OU303A, foi avaliada por Reddy *et al.* (2009). Experimentos em frasco agitado em estufa orbital utilizando glicerol ou glicose como fonte de carbono mostraram um bom acúmulo de polímero, respectivamente, 62,3 % e 58,6 % de PHA em relação à biomassa total. É importante ressaltar que utilizando glicose como fonte de carbono foi obtido copolímero poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) sem adição de precursor, ácido propiônico, normalmente empregado para a produção deste copolímero. Otari e Ghosh (2009) também demonstraram a capacidade da *B. megaterium* NCIM 2475 sintetizar o copolímero a partir de uma única fonte de carbono, neste caso, sacarose.

Em cultivos com *B. cereus* SPV a maior produção de P(3HB) foi obtida durante a fase de crescimento estacionária, 72 horas de cultivo, sem degradação do polímero mesmo após 120 horas de cultivo. A partir de 70 horas de cultivo o pH atingiu um valor baixo (4,5) e segundo os autores, o valor baixo de pH estaria relacionado ao não consumo de polímero (VALAPPIL, PEIRIS *et al.*, 2007). Esse resultado está de acordo com o obtido por Kominék e Halvorson (1965) também trabalhando com *B. cereus* verificaram que o metabolismo do P(3HB) é afetado pela concentração de íons hidrogênio. Quando o meio de cultivo foi mantido num valor mais alto de pH, o acúmulo de P(3HB) não foi favorecido, enquanto que num pH baixo, o consumo do polímero foi suprimido e a formação de esporo foi inibida.

Para haver acúmulo de PHA em *B. cereus* é necessária a limitação de algum nutriente (VALAPPIL, PEIRIS *et al.*, 2007; VALAPPIL *et al.*, 2008). Valappil *et al.* (2008) testaram limitações de diferentes nutrientes para a produção de PHAs em *B. cereus*. A limitação de nitrogênio, sulfato e fosfato levaram a produção de P(3HB), mas a limitação de potássio levou a produção de copolímero poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) a partir de fonte simples de carbono, glicose.

A *B. megaterium* subespécie *globigii* foi capaz de produzir copolímero contendo até 6 monômeros diferentes. As unidades de β -hidroxi-butirato compreendem aproximadamente 95 % da composição do copolímero, que contém ainda outros monômeros contendo de 4 a 8 carbonos como, por exemplo, β -hidroxi-heptanoato, β -hidroxi-valerato e outros (FINDLAY e WHITE, 1983)

Philip *et al.* (2009) investigaram a influência da rotação e pH do meio de cultura na produção de P(3HB) por *B. cereus* SPV. Os autores fizeram cultivos em biorreator com volume útil de 2 litros com rotações iguais a 50 rpm, 125 rpm, 250 rpm e 500 rpm sem controle de pH do meio, sendo o pH inicial igual a 6,8. Nas rotações de 50 rpm e 500 rpm não houve formação de P(3HB). O maior acúmulo de P(3HB), 34 %, foi obtido no experimento com rotação igual a 125 rpm, sendo obtido 29 % de acúmulo de P(3HB) quando a rotação era 250 rpm. Nesses dois últimos cultivos, 125 rpm e 250 rpm, o pH diminuiu durante o cultivo alcançando o valor de 4,5. Além disso, não foi observado o consumo de P(3HB) no final do cultivo. Para testar a influencia do pH, os autores realizaram experimentos, com rotação de 125 rpm, com controle de pH nos valores de 3, 6,8 e 10. O cultivo que apresentou maior acúmulo foi com pH controlado em 6,8, atingindo 23 % de P(3HB) em 25 horas com

posterior consumo de polímero, valor menor do que o obtido no experimento sem controle de pH. Os autores sugerem que o baixo valor de pH inibe a degradação interna do P(3HB).

López et al. (2012) reportaram acúmulo de P(3HB) próximo a 60% em *B. megaterium* em cultivo com baixa disponibilidade de oxigênio, percentual de oxigênio dissolvido controlado em 20%, utilizando tanto glicerol quanto glicose como fonte de carbono. Também foi reportado que uma razão alta de carbono:nitrogênio resultou em menor acúmulo de P(3HB).

1.4 Modelagem do Bioprocesso

A produção de P(3HB) por micro-organismos envolve complexas vias metabólicas e é influenciada pelas condições do cultivo e pela composição do meio de cultura (STEINBÜCHEL, 2001; LUENGO *et al.*, 2003). Conseqüentemente, a otimização da produção de P(3HB) não é uma questão trivial e a disponibilidade de modelos adequados para representar o processo torna-se um requisito fundamental para determinar as condições que permitam maximizar a quantidade de polímero produzido. Dependendo da bactéria que é utilizada, diferentes modelos podem ser necessários para representar a produção de P(3HB). Isto é particularmente relevante quando se utiliza *B. megaterium*, uma vez que esta bactéria apresenta comportamento diferente das comumente empregadas como, por exemplo, consumo do biopolímero quando ocorre limitação nitrogênio (MCCOOL *et al.*, 1996; FACCIN, 2007).

Bioprocessos possuem complexas interações dos fenômenos físico-químicos, bioquímicos e genéticos e geralmente são modelados matematicamente com suposições simplificadas. Assim, os modelos disponíveis para esses tipos de processos podem representar, satisfatoriamente, apenas um número limitado de variáveis (WIECHERT, 2002; KOLLER *et al.*, 2006; DHURJATI e MAHADEVAN, 2008).

Existem muitos trabalhos na literatura sobre modelagem de P(3HB) (SONNLEITNER *et al.*, 1979; LUONG *et al.*, 1988; YOO e KIM, 1994; RAJE e SRIVASTAVA, 1998; KHANNA e SRIVASTAVA, 2005b; SOMASHEKARA *et al.*, 2009; PENLOGLOU *et al.*, 2010). Yoo e Kim (1994) utilizaram modelo cibernético para a modelagem da produção de biopolímeros por *A. latus* (*Azohydromonas lata*), assumindo que a produção de biopolímeros é regulada por mecanismos enzimáticos. Este modelo é capaz de prever a produção de P(3HB), mas requer alguns parâmetros, tais como o nível da enzima inicial (enzima representativa na regulação da rota metabólica de interesse), que não são facilmente determináveis experimentalmente.

Raje e Srivastava (1998) propuseram uma expressão para a taxa de produção de polímero, por *Alcaligenes eutrophus* (atualmente *Cupriviadus necator*), considerando que esta pode ser tanto associada quanto não associada ao crescimento celular e também consideraram

um termo de inibição pelo produto. Khanna e Srivastava (2005b) apresentaram uma revisão sobre modelagem da produção de biopolímero, apresentando expressões para a taxa de crescimento específico. Eles propuseram um modelo para produção de P(3HB) por *R. eutropha* (atualmente *Cupriviadus necator*), em que a taxa específica de crescimento leva em consideração a limitação e inibição por ambos os substratos (carbono e nitrogênio). Extensões destes modelos para cultivo em batelada alimentada também são encontrados na literatura (RAJE e SRIVASTAVA, 1998; PATWARDHAN e SRIVASTAVA, 2004; SHAHHOSSEINI, 2004).

Somashekara *et al.* (2009) apresentaram a modelagem da produção de P(3HB) por *Bacillus flexus*. Os autores representaram a taxa de crescimento celular através de uma simplificação no modelo de Monod, para baixas concentrações de substrato, sendo a taxa linearmente proporcional ao substrato (nitrogênio) e a biomassa.

O pH do meio desempenha um papel fundamental na fisiologia do micro-organismo e a consideração do pH como variável pode ser facilmente encontrado na literatura (ÅKERBERG *et al.*, 1998; ROSS *et al.*, 2003; KAPTAN ÖLMEZ e ARAN, 2005; ÇELEKLI *et al.*, 2009). No trabalho de Åkerberg *et al.* (1998) é considerada a influência do pH no termo da taxa de crescimento específica para a produção de ácido láctico. No entanto, os modelos apresentados na literatura para a produção P(3HB) não levam a variável pH em consideração, provavelmente porque a maioria dos dados experimentais utilizados para a sua validação são obtidos em condições de pH controlado. Experimentos sem controle de pH mostraram que, mesmo sem limitação no substrato, o crescimento celular foi inibido em baixos valores de pH (BEAULIEU *et al.*, 1995).

1.5 Referências Bibliográficas

ÅKERBERG, C.; HOFVENDAHL, K.; ZACCHI, G.; HAHN-HÄGERDAL, B. Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 49, n. 6, p. 682-690, 1998.

ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell*. 5th. ed. New York: Garland Science, 2008.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 54, n. 4, p. 450-472, 1990.

AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, n. 2, p. 111-122, 2004.

BABEL, W.; ACKERMANN, J.-U.; BREUER, U.; STEINBÜCHEL, A. Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB)Biopolyesters: Springer Berlin / Heidelberg, 2001. p. 125-157. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology).

- BEAULIEU, M.; BEAULIEU, Y.; MELINARD, J.; PANDIAN, S.; GOULET, J. Influence of Ammonium Salts and Cane Molasses on Growth of *Alcaligenes eutrophus* and Production of Polyhydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 61, n. 1, p. 165-169, 1995.
- BLOEMBERGEN, S.; HOLDEN, D. A.; BLUHM, T. L.; HAMER, G. K.; MARCHESSAULT, R. H. Stereoregularity in synthetic β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate homopolymers. *Macromolecules*, v. 22, n. 4, p. 1656-1663, 1989.
- BORMANN, E.-J. Stoichiometrically calculated yields of the growth-associated production of polyhydroxybutyrate in bacteria. *Biotechnology Letters*, v. 22, n. 18, p. 1437-1442, 2000.
- BRAUNEGG, G.; BONA, R.; KOLLER, M. Sustainable Polymer Production. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, v. 43, n. 6, p. 1779 - 1793, 2004.
- BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, v. 65, n. 2-3, p. 127-161, 1998.
- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. *Bioquímica*. 4^o. ed.: Thomson, 2006.
- ÇELEKLI, A.; YAVUZATMACA, M.; BOZKURT, H. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 14, p. 3625-3629, 2009.
- CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, v. 23, n. 7, p. 1273-1335, 1998.
- CHEN, H. J.; PAN, S. C.; SHAW, G. C. Identification and Characterization of a Novel Intracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase from *Bacillus megaterium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 16, p. 5290-5299, 2009.
- CHEN, H. J.; TSAI, T. K.; PAN, S. C.; LIN, J. S.; TSENG, C. L.; SHAW, G. C. The master transcription factor Spo0A is required for poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) accumulation and expression of genes involved in PHB biosynthesis in *Bacillus thuringiensis*. *Fems Microbiology Letters*, v. 304, n. 1, p. 74-81, 2010.
- DAWES, E. A.; SENIOR, P. J. The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology*: Academic Press, 1973. p. 135-266.
- DESETTY, R.; MAHAJAN, V.; KHAN, B.; RAWAL, S. Isolation and heterologous expression of PHA synthesising genes from *Bacillus thuringiensis* R1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 9, p. 1769-1774, 2008.
- DHURJATI, P.; MAHADEVAN, R. Systems Biology: The synergistic interplay between biology and mathematics. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 86, n. 2, p. 127-141, 2008.
- DOBROTH, Z. T.; HU, S.; COATS, E. R.; MCDONALD, A. G. Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 3, p. 3352-3359, 2011.
- FACCIN, D. J. L. *Cultivo da bactéria Bacillus megaterium para a produção do biopolímero poli(3-hidroxibutirato) e modelagem matemática do bioprocesso*. (2007). 105 f. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2007.

FINDLAY, R. H.; WHITE, D. C. Polymeric Beta-Hydroxyalkanoates from Environmental Samples and *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 45, n. 1, p. 71-78, 1983.

FLICKINGER, M. C.; DREW, S. W. *The encyclopedia of bioprocess technology : fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. New York: John Wiley & Sons, 1999.

FLIEGER, M.; KANTOROVÁ, M.; PRELL, A.; ŘEZANKA, T.; VOTRUBA, J. Biodegradable plastics from renewable sources. *Folia Microbiologica*, v. 48, n. 1, p. 27-44, 2003.

FREDRICKSON, A. G.; MEGEE III, R. D.; TSUCHIYA, H. M.; PERLMAN, D. Mathematical Models for Fermentation Processes. *Advances in Applied Microbiology*: Academic Press, 1970. p. 419-465.

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

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

GOULD, G. W.; RICHARD, K. R. BACTERIA | Bacterial Endospores *Encyclopedia of Food Microbiology*. Oxford: Elsevier, 1999. p. 168-173.

HOFFMANN, N.; REHM, B. H. A. Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 237, n. 1, p. 1-7, 2004.

HORI; KANEKO; TANJI; XING; UNNO. Construction of self-disruptive *Bacillus megaterium* in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, n. 2, p. 211-216, 2002.

JACQUEL, N.; LO, C.-W.; WEI, Y.-H.; WU, H.-S.; WANG, S. S. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, n. 1, p. 15-27, 2008.

JENDROSSEK, D. Microbial Degradation of Polyesters. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 71, p. 293-325, 2001.

JENDROSSEK, D.; HANDRICK, R. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates*. *Annual Review of Microbiology*, v. 56, n. 1, p. 403-432, 2002.

JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H. G. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 46, n. 5, p. 451-463, 1996.

KAPRITCHKOFF, F. M.; VIOTTI, A. P.; ALLI, R. C. P.; ZUCCOLO, M.; PRADELLA, J. G. C.; MAIORANO, A. E.; MIRANDA, E. A.; BONOMI, A. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*, v. 122, n. 4, p. 453-462, 2006.

KAPTAN ÖLMEZ, H.; ARAN, N. Modeling the growth kinetics of *Bacillus cereus* as a function of temperature, pH, sodium lactate and sodium chloride concentrations. *International Journal of Food Microbiology*, v. 98, n. 2, p. 135-143, 2005.

- KAWAGUCHI, Y.; DOI, Y. Kinetics and Mechanism of Synthesis and Degradation of Poly(3-Hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. *Macromolecules*, v. 25, n. 9, p. 2324-2329, 1992.
- KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, v. 13, n. 3, p. 321-326, 2010.
- KESSLER, B.; WEUSTHUIS, R.; WITHOLT, B.; EGGINK, G. Production of Microbial Polyesters: Fermentation and Downstream Processes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 71, p. 159-182, 2001.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 2, p. 607-619, 2005a.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. A Simple Structured Mathematical Model for Biopolymer (PHB) Production. *Biotechnology Progress*, v. 21, n. 3, p. 830-838, 2005b.
- KIM, B. H.; GADD, G. M. *Bacterial physiology and metabolism*. Cambridge University Press, 2008.
- KNIGHT, B. C. J. G.; PROOM, H. A Comparative Survey of the Nutrition and Physiology of Mesophilic Species in the Genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology*, v. 4, n. 3, p. 508-538, 1950.
- KOLLER, M.; BONA, R.; BRAUNEGG, G.; HERMANN, C.; HORVAT, P.; KROUTIL, M.; MARTINZ, J.; NETO, J.; PEREIRA, L.; VARILA, P. Production of Polyhydroxyalkanoates from Agricultural Waste and Surplus Materials. *Biomacromolecules*, v. 6, n. 2, p. 561-565, 2005.
- KOLLER, M.; HORVAT, P.; HESSE, P.; BONA, R.; KUTSCHERA, C.; ATLIĆ, A.; BRAUNEGG, G. Assessment of formal and low structured kinetic modeling of polyhydroxyalkanoate synthesis from complex substrates. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 29, n. 5, p. 367-377, 2006.
- KOMINEK, L. A.; HALVORSON, H. O. Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, v. 90, n. 5, p. 1251-1259, 1965.
- KULPREECHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N. 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. 240-245, 2009.
- LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, n. 1, p. 1-14, 1996a.
- LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, v. 14, n. 11, p. 431-438, 1996b.
- LEE, S. Y.; CHOI, J.-I. Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. *Polymer Degradation and Stability*, v. 59, n. 1-3, p. 387-393, 1998.
- LEE, T.-R.; LIN, J.-S.; WANG, S.-S.; SHAW, G.-C. PhaQ, a New Class of Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB)-Responsive Repressor, Regulates *phaQ* and *phaP* (Phasin) Expression in *Bacillus megaterium* through Interaction with PHB. *J. Bacteriol.*, v. 186, n. 10, p. 3015-3021, 2004.

- LENZ; ROBERT, W.; MARCHESSAULT; ROBERT, H. *Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology*. Washington, DC, ETATS-UNIS: American Chemical Society, 2005.
- LÓPEZ, J.; NARANJO, J.; HIGUITA, J.; CUBITTO, M.; CARDONA, C.; VILLAR, M. Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 17, n. 2, p. 250-258, 2012.
- LUENGO, J. M.; GARCÍA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G.; OLIVERA, E. R. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, n. 3, p. 251-260, 2003.
- LUONG, J. H. T.; MULCHANDANI, A.; LEDUY, A. Kinetics of biopolymer synthesis: A revisit. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, n. 6, p. 326-332, 1988.
- MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 63, n. 1, p. 21-53, 1999.
- MATAVULJ, M.; MOLITORIS, H.-P. Biodegradation of polyhydroxyalkanoate-based plastic (BIOPOL) under different environmental conditions I. Weightloss of substrate. *Hoppea*, v. 61, p. 735-749, 2000.
- MCCOOL, G. J.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate Inclusion Body-Associated Proteins and Coding Region in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.*, v. 181, n. 2, p. 585-592, 1999.
- MCCOOL, G. J.; CANNON, M. C. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 14, p. 4235-4243, 2001.
- MCCOOL, G. J.; FERNANDEZ, T.; LI, N.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 138, n. 1, p. 41-48, 1996.
- MERRICK, J. M.; DOUDOROFF, M. Depolymerization of Poly- β -Hydroxybutyrate by an Intracellular Enzyme System. *J. Bacteriol.*, v. 88, n. 1, p. 60-71, 1964.
- NAKATA, H. M. Effect of pH on intermediates produced during growth and sporulation of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.*, v. 86, n. 3, p. 577-581, 1963.
- NIKEL, P.; PETTINARI, M.; GALVAGNO, M.; MÉNDEZ, B. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol by a recombinant *Escherichia coli* mutant in fed-batch microaerobic cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 77, n. 6, p. 1337-1343, 2008.
- OMAR, S.; RAYES, A.; EQAAB, A.; VOß, I.; STEINBÜCHEL, A. 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.
- OTARI, S. V.; GHOSH, J. S. Production and Characterization of the Polymer Polyhydroxy Butyrate-co-polyhydroxy Valerate by *Bacillus megaterium* NCIM 2475. *Current Research Journal of Biological Sciences*, v. 1, n. 2, p. 23-26, 2009.
- PANDIAN, S. R.; DEEPAK, V.; KALISHWARALAL, K.; RAMESHKUMAR, N.; JEYARAJ, M.; GURUNATHAN, S. 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. 705-711, 2010.

- PATWARDHAN, P. R.; SRIVASTAVA, A. K. Model-based fed-batch cultivation of *R. eutropha* for enhanced biopolymer production. *Biochemical Engineering Journal*, v. 20, n. 1, p. 21-28, 2004.
- PENLOGLOU, G.; ROUSSOS, A.; CHATZIDOUKAS, C.; KIPARISSIDES, C. A combined metabolic/polymerization kinetic model on the microbial production of poly(3-hydroxybutyrate). *New Biotechnology*, v. 27, n. 4, p. 358-367, 2010.
- PHILIP, S.; SENGUPTA, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Effect of impeller speed and pH on the production of Poly(3-hydroxybutyrate) using *Bacillus cereus* SPV. *Biomacromolecules*, v. 10, n. 4, p. 691-699, 2009.
- POSADA, J. A.; NARANJO, J. M.; LÓPEZ, J. A.; HIGUITA, J. C.; CARDONA, C. A. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 1, p. 310-317, 2011.
- PRABHU, N. N.; SANTIMANO, M. C.; MAVINKURVE, S.; BHOSLE, S. N.; GARG, S. Native granule associated short chain length polyhydroxyalkanoate synthase from a marine derived *Bacillus* sp NQ-11/A2. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 97, n. 1, p. 41-50, 2010.
- RAJE, P.; SRIVASTAVA, A. K. Updated mathematical model and fed-batch strategies for poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) production by *Alcaligenes eutrophus*. *Bioresource Technology*, v. 64, n. 3, p. 185-192, 1998.
- RAMSAY, J. A.; BERGER, E.; VOYER, R.; CHAVARIE, C.; RAMSAY, B. A. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnology Techniques*, v. 8, n. 8, p. 589-594, 1994.
- REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, v. 87, n. 2, p. 137-146, 2003.
- REDDY, S.; THIRUMALA, M.; MAHMOOD, S. A novel *Bacillus* sp. accumulating poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from a single carbon substrate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 36, n. 6, p. 837-843, 2009.
- REHM, B. H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem J*, v. 376, n. 1, p. 15-33, 2003.
- REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 25, n. 1-3, p. 3-19, 1999.
- ROSS, T.; RATKOWSKY, D. A.; MELLEFONT, L. A.; MCMEEKIN, T. A. Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 82, n. 1, p. 33-43, 2003.
- SATO, Y.; MINAMOTO, N.; TAJIMA, K.; MUNEKATA, M. Polyhydroxyalkanoate synthase from *Bacillus* sp. INT005 is composed of PhaC and PhaR. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94, n. 4, p. 343-350, 2002.
- SHAHHOSSEINI, S. Simulation and optimisation of PHB production in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 8, p. 963-969, 2004.

- SHEN, L.; HAUFE, J.; PATEL, M. K. *Product overview and market projection of emerging bio-based plastics. PRO-BIT 2009*. Copernicus Institute for Sustainable Development and Innovation Utrecht University. June. 2009
- SLEPECKY, R. A.; LAW, J. H. Synthesis and degradation of poly- β -hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.*, v. 82, n. 1, p. 37-42, 1961.
- SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 71, n. 6, p. 783-789, 2006.
- SOMASHEKARA, D. M.; K.RASTOGI, N.; RAMACHANDRIAH, S. T. A simple kinetic model for growth and biosynthesis of polyhydroxyalkanoate in *Bacillus flexus*. *New Biotechnology*, v. 26, n. 1-2, p. 92-98, 2009.
- SONNLEITNER, B.; HEINZLE, E.; BRAUNEGG, G.; LAFFERTY, R. M. Formal kinetics of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) production in *Alcaligenes eutrophus* H 16 and *Mycoplana rubra* R 14 with respect to the dissolved oxygen tension in ammonium-limited batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 7, n. 1, p. 1-10, 1979.
- STEINBÜCHEL, A. Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. *Macromolecular Bioscience*, v. 1, n. 1, p. 1-24, 2001.
- STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, v. 128, n. 3, p. 219-228, 1995.
- STEPHANOPOULOS, G. N.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN, J. Review of Cellular Metabolism. *Metabolic Engineering*. San Diego: Academic Press, 1998. p. 21-79.
- STUBBE, J.; TIAN, J.; HE, A.; SINSKEY, A. J.; LAWRENCE, A. G.; LIU, P. Nontemplate-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. *Annual review of biochemistry*, v. 74, p. 433-80, 2005.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, v. 25, n. 10, p. 1503-1555, 2000.
- SUDESH, K.; GAN, Z.; MAEHARA, A.; DOI, Y. Surface structure, morphology and stability of polyhydroxyalkanoate inclusions characterised by atomic force microscopy. *Polymer Degradation and Stability*, v. 77, n. 1, p. 77-85, 2002.
- SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants -- A review. *Biotechnology Advances*, v. 25, n. 2, p. 148-175, 2007.
- TAGUCHI, S.; MAEHARA, A.; TAKASE, K.; NAKAHARA, M.; NAKAMURA, H.; DOI, Y. Analysis of mutational effects of a polyhydroxybutyrate (PHB) polymerase on bacterial PHB accumulation using an in vivo assay system. *FEMS Microbiology Letters*, v. 198, n. 1, p. 65-71, 2001.
- TAJIMA, K.; IGARI, T.; NISHIMURA, D.; NAKAMURA, M.; SATOH, Y.; MUNEKATA, M. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. INT005 accumulating polyhydroxyalkanoate (PHA) from gas field soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 95, n. 1, p. 77-81, 2003.

TAMER, I. M.; MOO-YOUNG, M. Optimization of poly(β -hydroxybutyric acid) recovery from *Alcaligenes latus*: combined mechanical and chemical treatments. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 19, n. 6, p. 459-468, 1998.

TAMER, I. M.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Disruption of *Alcaligenes latus* for Recovery of Poly(β -hydroxybutyric acid): Comparison of High-Pressure Homogenization, Bead Milling, and Chemically Induced Lysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 37, n. 5, p. 1807-1814, 1998.

TERADA, M.; MARCHESSAULT, R. H. Determination of solubility parameters for poly(3-hydroxyalkanoates). *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 25, n. 1-3, p. 207-215, 1999.

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

TROTSSENKO, Y. A.; BELOVA, L. L. Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) and Its Regulation in Bacteria. *Microbiology*, v. 69, n. 6, p. 635-645, 2000.

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

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

VALAPPIL, S. P.; PEIRIS, D.; LANGLEY, G. J.; HEMIMAN, J. M.; BOCCACCINI, A. R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. *Journal of Biotechnology*, v. 127, n. 3, p. 475-487, 2007.

VALAPPIL, S. P.; RAI, R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Bacillus cereus* SPV under varied limiting conditions and an insight into the biosynthetic genes involved. *Journal of Applied Microbiology*, v. 104, n. 6, p. 1624-1635, 2008.

VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 6, p. 2285-2289, 2004.

VARY, P. S. Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology*, v. 140, n. 5, p. 1001-1013, 1994.

VERLINDEN, R. A. J.; HILL, D. J.; KENWARD, M. A.; WILLIAMS, C. D.; RADECKA, I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, n. 6, p. 1437-1449, 2007.

VIJAYENDRA, S.; RASTOGI, N.; SHAMALA, T.; ANIL KUMAR, P.; KSHAMA, L.; JOSHI, G. Optimization of polyhydroxybutyrate production by *Bacillus* sp. CFR 256 with corn steep liquor as a nitrogen source. *Indian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 2, p. 170-175, 2007.

WHITE, P. J. The Nutrition of *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus*. *J Gen Microbiol*, v. 71, n. 3, p. 505-514, 1972.

- WIECHERT, W. Modeling and simulation: tools for metabolic engineering. *Journal of Biotechnology*, v. 94, n. 1, p. 37-63, 2002.
- WU, Q.; HUANG, H.; HU, G.; CHEN, J.; HO, K. P.; CHEN, G.-Q. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 80, n. 2, p. 111-118, 2001.
- XIE, C.-H.; YOKOTA, A. Reclassification of *Alcaligenes latus* strains IAM 12599T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas lata* gen. nov., comb. nov., *Azohydromonas australica* sp. nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, n. 6, p. 2419-2425, 2005.
- YAMANE, T. Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: A theoretical study. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 41, n. 1, p. 165-170, 1993.
- YOO, S.; KIM, W.-S. Cybernetic model for synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 43, n. 11, p. 1043-1051, 1994.
- YU, J.; SHANG-TIAN, Y. Microbial Production of Bioplastics from Renewable Resources. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 585-610.
- 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, 2001.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi a bactéria *Bacillus megaterium* DSMZ 32^T cedida pelo Laboratório de Bioprocessos da COPPE/UFRJ pelo Prof. D.Sc Tito Lívio Moitinho Alves. A bactéria utilizada foi previamente identificada por análise de DNAr 16S realizada pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CQPBA) da UNICAMP.

Esta bactéria é estocada em micro tubos tipo Eppendorf em solução contendo 20 % de glicerol que é utilizado como agente crio protetor e são mantidas congeladas a -18 °C. Este estoque é renovado a cada 6 meses.

2.2 Meio de Cultura

Nos experimentos foi empregado meio mineral, conforme descrito em Wang e Lee (1997), acrescido de fonte de carbono e fonte de nitrogênio. Na Tabela 2.1 é apresentada a composição do meio, enquanto na Tabela 2.2 detalha-se a composição da solução de micronutrientes utilizada.

As fontes de carbono utilizadas, separadamente, foram sacarose e glicerol dependendo do experimento realizado. Sais de amônio foram utilizados, separadamente, como fonte de nitrogênio. Os sais utilizados foram: cloreto, citrato, fosfato, sulfato ou nitrato de amônio.

Tabela 2.1: Meio mineral utilizado nos cultivos.

Componente	Composição
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,008 g·L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄	3,6 g·L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g·L ⁻¹
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g·L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01 g·L ⁻¹
Ácido Cítrico	0,1 g·L ⁻¹
Solução de micronutrientes	1 mL·L ⁻¹

Tabela 2.2: Solução de micronutrientes.

Componente	Composição (mg·L⁻¹)
H ₃ BO ₃	300
CoCl ₂ .6H ₂ O	200
ZnSO ₄ .7H ₂ O	30
MnCl ₂ .4H ₂ O	30
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	30
NiSO ₄ .7H ₂ O	30
CuSO ₄ .5H ₂ O	10

2.3 Avaliação da Influência da Fonte de Nitrogênio na Produção de P(3HB) e Biomassa.

Foram realizados experimentos com a finalidade de avaliar a influência da fonte de nitrogênio na produção de P(3HB) e biomassa utilizando sacarose ou glicerol, separadamente, como fonte de carbono. Foram testados 5 sais de amônio como fontes de nitrogênio para cada fonte de carbono utilizada.

Os sais de amônio testados foram: cloreto de amônio, citrato de amônio, sulfato de amônio, fosfato de amônio e nitrato de amônio. A Tabela 2.3 mostra as concentrações das fontes de nitrogênio (FN) e carbono (FC) utilizadas em cada ensaio. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Em trabalho anterior foi verificado a razão carbono/nitrogênio mais adequada para a produção de P(3HB) por *B. megaterium*, utilizando sacarose como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio sendo verificada maior produção na razão igual a 8 (FACCIN, 2007). Essa razão foi utilizada para os cálculos de concentração das fontes de carbono e nitrogênio. As concentrações das fontes de nitrogênio e carbono foram calculadas a

fim de manter o mesmo número de mols iniciais de amônio e carbono, respectivamente, entre os testes realizados.

Tabela 2.3: Concentrações das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas nos experimentos.

Fontes de Carbono (FC)	Concentração (g.L ⁻¹)
Sacarose	16,0
Glicerol	17,2
Fontes de Nitrogênio (FN)	Concentração (g.L ⁻¹)
Cloreto de amônio	1,6
Citrato de amônio	3,4
Sulfato de amônio	2,0
Fosfato de amônio	2,0
Nitrato de amônio	2,4

Os experimentos foram realizados em estufa incubadora rotatória, em frascos cônicos de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo, com temperatura e agitação controlados em 30°C e 160 rpm, respectivamente. Os dados de biomassa e acúmulo de polímero apresentados foram obtidos no tempo de 20 horas de cultivo.

Para a realização dos experimentos, as soluções foram preparadas, colocadas em frascos cônicos limpos e então esterilizadas em autoclave por 15 minutos na temperatura de 121 °C.

A reativação da bactéria, inóculo, foi realizada em cultivo em frasco cônico contendo meio mineral com 30 g·L⁻¹ de sacarose e 5 g·L⁻¹ de sulfato de amônio em estufa incubadora rotatória, 160 rpm e temperatura de 30 °C, por um período de 18 horas. Após este período foi adicionado ao cultivo, em cada experimento, 2 % desse inóculo em relação ao volume do meio de cultivo.

Com os dados experimentais obtidos realizou-se análise da variância (ANOVA) e o Teste de Tukey, ambos com 5% de significância.

2.4 Experimentos em Biorreator de 5L

A realização dos cultivos em escala maior foi efetuada em biorreator experimental de 5 L. O equipamento é fabricado pela B. Braun Biotech International Co., Alemanha, e é vendido com o nome comercial BIOSTAT[®] B, Figura 2.1. O equipamento consiste em um vaso de vidro com capacidade útil de 4 L e está acoplado a um sistema de controle digital, sendo possível o controle de algumas variáveis de processo, tais como temperatura, agitação, pH e concentração de oxigênio dissolvido. Neste equipamento é possível estipular uma determinada aeração, mas esta não pode ser controlada automaticamente. Este sistema está

conectado a um computador que recebe e envia sinais para realização aquisição de dados e controle do equipamento, usando o software MATLAB como interface.



Figura 2.1: Biorreator de 5L com unidade de controle acoplada.

A esterilização do biorreator é feita em 2 etapas. Primeiro autoclava-se o biorreator fechado com água destilada por 30 minutos na temperatura de 121 °C. Depois a água é descartada e adiciona-se o meio de cultura a ser utilizado, fecha-se todo o sistema e autoclava-se por 20 minutos. A fonte de nitrogênio é autoclavada separadamente e só é adicionada ao biorreator minutos antes de iniciar o cultivo.

2.4.1 Experimentos sem controle de pH

Experimentos realizados por Faccin (2007) mostraram uma diminuição do acúmulo de P(3HB) nos experimentos realizados em biorreator de 5 L com controle de pH (30 % de P(3HB) em relação a biomassa) quando comparados aos experimentos realizados em estufa incubadora rotatória onde foi obtido cerca de 70 % de acúmulo de P(3HB). Assim com o objetivo de testar a influência do pH nos cultivos em biorreator de 5 L, foram realizados experimentos sem controle de pH, uma vez que esta variável não pode ser controlada nos ensaios em estufa incubadora rotatória.

No experimento em biorreator o pH não foi controlado. A temperatura foi mantida constante em 30 °C, a aeração utilizada foi de 4 L·min⁻¹ (1 vvm) e o percentual de oxigênio dissolvido (DO) foi controlado pela variação na rotação do impelidor a fim de manter o valor de DO maior que 40 %. O cultivo em biorreator teve duração de 12 horas, sendo coletada amostra a cada hora.

A reativação das bactérias para inóculo no biorreator é realizada em duas etapas. Em ambas as etapas é utilizado cultivo em meio mineral com concentração de sacarose de

16 g·L⁻¹ e de sulfato de amônio de 2 g·L⁻¹ em estufa incubadora rotatória 160 rpm e 30 °C. Na primeira etapa, pré-inóculo, são adicionados 2 mL de cultura-estoque de *B. megaterium* para cada 100 mL de meio de cultivo e incubado por 18 horas. Na segunda etapa, inoculo, são adicionados 2 mL do pré-inóculo para cada 100 mL de meio de cultivo e incubado por 5 horas, para atingir-se crescimento exponencial. Este inóculo é transferido ao biorreator também na proporção de 2 mL para cada 100 mL de meio de cultivo.

2.4.2 Experimentos em diferentes rotações

Com o objetivo de avaliar a influencia da taxa de transferência de oxigênio na produção de P(3HB) e biomassa foram realizados experimentos em biorreator de 5 L, em seis rotações diferentes (rotações controladas em 100 rpm, 200 rpm, 300 rpm, 400 rpm, 500 rpm e 600 rpm). A temperatura foi controlada em 30 °C, a aeração em 4 L·min⁻¹, o pH e o DO não foram controlados, apenas medidos. Os experimentos foram realizados no mínimo em duplicata.

O término do cultivo variou dependendo da agitação utilizada em cada cultivo, isso porque só era encerrado o cultivo quando o percentual de oxigênio dissolvido chegava a 100 %. O inóculo seguiu o mesmo procedimento descrito na Seção 3.4.1.

2.5 Métodos Analíticos

2.5.1 Determinação de biomassa

A determinação da biomassa total (X) foi realizada por medidas gravimétricas (massa seca). Amostras em duplicata (10 mL a 60 mL) são coletadas dos cultivos, centrifugadas durante 15 minutos a 3500×g, lavadas e colocadas em estufa a vácuo a 75 °C até atingirem massa constante. A massa de cada frasco vazio é medida previamente. O valor de biomassa total é correspondente ao valor pesado contendo células mais polímero menos o valor do frasco vazio, considerando o volume coletado. Como o biopolímero é acumulado internamente, a biomassa residual (R) é calculada diminuindo-se da biomassa total a quantidade de polímero obtida.

2.5.2 Determinação de poli(3-hidroxi-butirato)

A quantidade de P(3HB) é determinada através do método descrito por Riis e Mai (1988). O método consiste na quebra do polímero por meio de propanólise com subsequente quantificação utilizando cromatografia gasosa. Pesa-se aproximadamente 40 mg de células secas em um frasco, adicionam-se 2 mL de 1,2-dicloroetano, 2 mL de n-propanol acidificado (4 partes de n-propanol para 1 parte de ácido clorídrico) e 2 µL de solução de padrão interno,

composto por 2 g de ácido benzóico em 50 mL de n-propanol. O frasco, hermeticamente fechado, é deixado em banho a 100 °C por duas horas com agitação intermitente. Posteriormente, ele é resfriado até atingir a temperatura ambiente e são adicionados 4 mL de água destilada. Da fase orgânica resultante é obtido o cromatograma. É necessário construir uma curva de calibração, correlacionando-se as áreas de massas conhecidas de P(3HB) padrão (Sigma-Aldrich), com a área do padrão interno. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso da marca Perkin Elmer, com detector de ionização de chama com uma coluna capilar PE-WAX 30 m × 0,25 mm.

Para cada experimento, uma curva de calibração foi feita para diminuir os erros devido às possíveis variações na temperatura do banho. Com o valor obtido em gramas de polímero e células totais, obtém-se a percentagem de polímero acumulado na célula sendo calculado pela Equação 2.1.

$$\%PHB = \frac{PHB}{X_T} \cdot 100 \quad (2.1)$$

2.5.3 Determinação de sacarose e glicerol

A sacarose e o glicerol foram quantificados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), Perkin Elmer série 200, coluna Rezex-RHM 300 mm x 7,8 mm, utilizando, como fase móvel, água padrão HPLC, à temperatura de 80 °C e vazão de 0,6 mL·min⁻¹. O HPLC é acoplado a um computador com o software TotalChrom 3.0, o qual realiza a integração das áreas ou altura dos picos. A coluna utilizada hidrolisa a sacarose em glicose e frutose. O valor da sacarose é obtido pela soma da glicose mais frutose.

2.5.4 Determinação de nitrogênio amoniacal

O nitrogênio amoniacal foi determinado pelo método indofenol (WEATHERBURN, 1967), o qual se baseia na formação de uma coloração azul, reação de Berthelot, resultante da reação do íon amônia com hipoclorito de sódio e compostos fenólicos na presença de nitroprussiato de sódio, que é o catalisador. Para a análise utiliza-se 100 µL de amostra previamente diluída. Adicionam-se 5 mL do reagente A (5 g de fenol e 25 mg de nitroprussiato de sódio para 500 mL de água deionizada) e 5 mL do reagente B (2,5 g de hidróxido de sódio e 4,2 mL de hipoclorito de sódio, completando o volume para 500 mL), nesta ordem para garantir a estabilidade da cor. Os frascos foram deixados por 20 min em um banho a 37 °C no escuro. A cor azul foi medida em espectrofotômetro a 625 nm. O intervalo linear de detecção é de 0,5 µg a 6 µg de nitrogênio da amônia. A curva padrão foi obtida utilizando concentrações de 0,05 g·L⁻¹ a 0,3 g·L⁻¹ de sulfato de amônio, respeitando a linearidade. A curva padrão é refeita a cada análise para diminuir o erro da análise. As quantidades de nitrogênio foram calculadas diretamente da quantidade de sulfato de amônio medido, através da relação das massas molares destas espécies. Para os demais sais de amônio utilizados seguiu-se o mesmo método, sendo feita curva padrão para cada sal.

2.5.6 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de massa (k_La)

A determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) foi feita durante os cultivos utilizando o método dinâmico, com dados obtidos no trecho ascendente da curva de concentração de oxigênio dissolvido (DO) (POULIOT *et al.*, 2000; SCHIRMER-MICHEL *et al.*, 2009). As medidas de DO foram realizadas utilizando um eletrodo polarográfico conectado ao biorreator. Para a realização das medidas a agitação e aeração são desligados durante um curto período do cultivo. Neste período o DO vai diminuindo até um nível seguro, para evitar mudanças no metabolismo celular (BANDYOPADHYAY *et al.*, 1967). Depois são reativadas a agitação e aeração. A cada 5 segundos são coletados dados de DO durante a queda e a subida do DO. Para o cálculo de k_La foram usados os dados no trecho de subida da concentração de oxigênio dissolvido.

Através da equação Equação 2.2, obtida a partir do balanço de massa de oxigênio dissolvido, é possível estimar o valor do k_La , como o coeficiente angular da região linear da curva de $\ln((C_i - C_0)/(C_i - C))$ versus $t - t_0$ (SCHIRMER-MICHEL *et al.*, 2009).

$$\ln\left(\frac{C_i - C_0}{C_i - C}\right) = k_La \cdot (t - t_0) \quad (2.2)$$

onde t_0 é o tempo no qual foi retomada a agitação e aeração, t é o tempo total num determinado instante e C_i , C_0 e C são, respectivamente, as concentração de oxigênio dissolvido no início (antes de ser desligada a aeração), no momento onde é retomada a agitação e aeração (tempo t_0) e no tempo t .

2.6 Estimação de Parâmetros do Modelo para Produção de P(3HB)

Os dados experimentais utilizados para a estimação dos parâmetros dos modelos foram de experimentos realizados em biorreator de 5 L com e sem controle de pH publicados no trabalho de Faccin *et al.* (2009), apresentado no Capítulo 5. Os experimentos foram realizados em duplicatas. O resultado entre as duplicatas foi utilizado para o cálculo da variância experimental.

A estimação dos parâmetros do modelo foi feita utilizando o software EMSO (SOARES e SECCHI, 2003), utilizando o método dos poliedros flexíveis (NELDER e MEAD, 1965). A função objetivo utilizada é representada pela Equação 2.3

$$FObj = \sum_j \sum_i \left(\frac{(C_{i,j} - \tilde{C}_{i,j})^2}{\sigma_j^2} \right) \quad (2.3)$$

onde $C_{i,j}$ e $\tilde{C}_{i,j}$ representam, respectivamente, os valores experimental e predito pelo modelo da concentração da espécie j (com $j = X, P, S$ ou N e sendo que para modelos BiopRhyp_H e

BiopRhyp_Hf, j representa também H (ou pH)) no i -ésimo ponto experimental e σ_j^2 é o variância experimental para a concentração de cada espécie j . Os valores de $\tilde{C}_{i,j}$, necessários nos passos intermediários da estimação de parâmetros e na simulação final, foram obtidos utilizando o software EMSO com integrador DASSLC para a resolução do sistema de equações algébrico-diferenciais (SECCHI, 2008).

Para verificar a adequação dos modelos aos dados experimentais, foi calculado, além da função objetivo, o coeficiente de determinação (R^2), o erro médio quadrático (MSE) e teste F . Para o teste F , baseado diretamente nas variâncias experimentais, utilizou-se a Equação 2.4 para representar F_0 . O F tabelado (F_{TAB}) ou $F_{crítico}$ foi obtido de tabelas estatísticas de distribuição de probabilidade F com 95% de significância.

$$F_0 = \frac{\tilde{\sigma}^{*2}}{\sigma^{*2}} = \frac{\frac{1}{(NE - NP)V} \sum_j^V \sum_i^{NE} (C_{i,j}^* - \tilde{C}_{i,j}^*)^2}{\frac{1}{V} \sum_j^V \sigma_j^{*2}} \quad (2.4)$$

onde $\tilde{\sigma}^{*2}$ é a variância normalizada com base na estimativa do modelo, σ^{*2} é a variância experimental normalizada, V é o número de variáveis, NE representa o número de pontos experimentais para cada variável e NP o número de parâmetros do modelo, $C_{i,j}^*$ e $\tilde{C}_{i,j}^*$ representam as concentrações experimentais e previstas pelo modelo para cada variável em um dado ponto normalizadas pelo maior valor experimental de cada variável.

2.7 Referências Bibliográficas

BANDYOPADHYAY, B.; HUMPHREY, A. E.; TAGUCHI, H. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 9, n. 4, p. 533-544, 1967.

FACCIN, D. J. L. *Cultivo da bactéria Bacillus megaterium para a produção do biopolímero poli(3-hidroxibutirato) e modelagem matemática do bioprocesso*. (2007). 105 f. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2007.

FACCIN, D. J. L.; MARTINS, I.; CARDOZO, N. S. M.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z.; ALVES, T. L. M.; GAMBETTA, R.; SECCHI, A. R. Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 84, n. 12, p. 1756-1761, 2009.

NELDER, J. A.; MEAD, R. A Simplex Method for Function Minimization. *The Computer Journal*, v. 7, n. 4, p. 308-313, 1965.

POULIOT, K.; THIBAUT, J.; GARNIER, A.; ACUÑA LEIVA, G. KLa Evaluation during the course of fermentation using data reconciliation techniques. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 23, n. 6, p. 565-573, 2000.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography A*, v. 445, p. 285-289, 1988.

SCHIRMER-MICHEL, Â. C.; FLÔRES, S. H.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Effect of oxygen transfer rates on alcohols production by *Candida guilliermondii* cultivated on soybean hull hydrolysate. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 84, n. 2, p. 223-228, 2009.

SECCHI, A. R. *User's Manual - Version 3.5. Pacote computacional para a solução de sistemas de equações algébrico-diferenciais.* 2008. Disponível em: <<http://www.enq.ufrgs.br/enqlib/numeric/numeric.html>>.

SOARES, R. D. P.; SECCHI, A. R. EMSO: A new environment for modelling, simulation and optimisation. *Computer Aided Chemical Engineering*, v. 14, n. C, p. 947-952, 2003.

WANG, F. L.; 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. 3703-3706, 1997.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, v. 39, n. 8, p. 971-974, 1967.

Introdução aos capítulos 3, 4, 5 e 6

Os Capítulos 3, 4, 5 e 6 estão apresentados na forma de artigo científico. Em cada um são apresentados introdução e materiais e métodos pertinentes a cada artigo, juntamente com resultados e conclusão.

No Capítulo 3 é apresentado o Artigo 1 - **Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*** (publicado no periódico *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 84, n. 12, p. 1756-1761, 2009. DOI:10.1002/jctb.2240). Neste trabalho foi realizada a otimização da razão carbono:nitrogênio com o objetivo de aumentar a produção de P(3HB), os experimentos foram realizados em estufa incubadora rotatória e obteve-se um acúmulo de polímero cerca de 70% em relação a massa seca de célula. Com as condições otimizadas realizou-se experimentos em biorreator em escala de bancada com controle de pH, porém neste experimento obteve-se 28% de acúmulo de polímero. Este trabalho teve a maior parte dos experimentos realizada durante o mestrado. No entanto, os experimentos em biorreator sem controle de pH, nas mesmas condições dos experimentos realizados em estufa incubadora rotatória (mestrado), fizeram parte do trabalho de doutorado. Nestes experimentos obteve-se acúmulo de 34%, indicando, portanto, um maior acúmulo quando o pH não é controlado.

O Artigo 2 - **Modeling P(3HB) production by *Bacillus megaterium*** (publicado no periódico *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 87, n. 3, p. 325-333, 2012. DOI: 10.1002/jctb.2713) é apresentado no Capítulo 4. Neste artigo foi realizada a modelagem da produção de P(3HB) por *B. megaterium*. Quatro modelos foram propostos sendo que se diferenciam nas expressões para a velocidade específica de crescimento e para a taxa de produção de polímero. A introdução de um fator de correção para a taxa de produção de polímero e o termo relacionado à influência do ion H^+ no crescimento mostrou ser importante para a descrição deste bioprocesso. Os parâmetros foram estimados com dados experimentais obtidos em experimentos com e sem controle de pH, apresentados no artigo do Capítulo 3.

O Capítulo 5 traz o Artigo 3 – **Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium***. Neste trabalho foram realizados experimentos para verificar a influência do oxigênio na produção de P(3HB). Foram realizados experimentos em diferentes rotações com objetivo de verificar se a diminuição na disponibilidade de oxigênio possibilitaria aumento na produção de P(3HB) com o objetivo de aproximar o acúmulo àquele obtido em estufa incubadora rotatória,

apresentado no Capítulo 3. Esse artigo será submetido a um periódico internacional com classificação A1 no Qualis/CAPES.

O Artigo 4 - **Avaliação da influência da fonte de nitrogênio e carbono na produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium*** (trabalho publicado nos Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM 2011) está apresentado no Capítulo 6. Neste trabalho, estuda-se a influência da fonte de nitrogênio na produção de polímero e biomassa em duas fontes de carbono diferentes com o objetivo de aumentar a produção de P(3HB) por *B. megaterium*.

Capítulo 3

Artigo 1 - Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*

Este artigo está publicado no periódico *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 84, n. 12, p. 1756-1761, 2009. DOI:10.1002/jctb.2240.

Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*

Débora Jung Luvizetto Faccin,^a Ivana Martins,^a Nilo Sérgio Medeiros Cardozo,^a Rosane Rech,^b Marco Antônio Záchia Ayub,^b Tito Lívio Moitinho Alves,^c Rossano Gambetta^d and Argimiro Resende Secchi^{c*}

Abstract

BACKGROUND: The aim of this research was the optimization of poly(3-hydroxybutyrate) – P(3HB) – production in submerged cultures of *Bacillus megaterium* in a mineral medium using sucrose as carbon source and nitrogen as the limiting substrate. Small-scale experiments were carried out in shake flasks at 30 °C and 160 rpm in order to evaluate the best initial sucrose concentration and carbon:nitrogen ratio to maximize biomass accumulation and biopolymer production. An objective function in terms of residual sucrose and P(3HB) production was proposed in order to optimize the amount of carbon source used and the production of P(3HB).

RESULTS: High production of P(3HB) was obtained, with approximately 70% (CDW) accumulation in cells without nitrogen limitation and strongly correlated with the pH of the culture. Scaling-up the system to cultures in a bioreactor, with or without pH control, a reduction of P(3HB) accumulation (around 30% CDW) was observed when compared with shaker cultures, suggesting a possible role of oxygen limitation as a stress signaling for P(3HB) synthesis.

CONCLUSIONS: Results of our experiments showed that *Bacillus megaterium* was able to produce P(3HB) at one of the highest production rates so far reported for this bacterium, making this microorganism very interesting for industrial applications. Comparisons of shaker and bench-scale bioreactor experiments show both the importance of pH and aeration strategies. It is likely that complex aeration strategies linked to cell metabolism will be necessary for further developments using this bacterium.

Keywords: biopolymers; poly(3-hydroxybutyrate); *Bacillus megaterium*; optimization

* Correspondence to: Argimiro Resende Secchi, COPPE-Chemical Engineering Program, Federal University of Rio de Janeiro, CT - G-116, CEP: 21941-972, CxP. 68502, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: arge@peq.coppe.ufrj.br

^a Chemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c COPPE-Chemical Engineering Program, Federal University of Rio de Janeiro, CT - G-116, CEP: 21941-972, CxP. 68502, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Research & Development, Quattor S.A., Rua Joaquim Floriano, 960, 14º, Itaim Bibi, São Paulo, SP, 04534-004, Brazil

3.1 Introduction

Plastics have been regarded as ideal materials for the production of various consumer products because of their durability and inherent resistance to degradation. However, these same qualities are sources of environmental and waste management problems. These problems have created much interest in the development of biopolymers that can be used to produce biodegradable plastic goods (FULL *et al.*, 2006).

On disposal, biopolymers are completely degraded to water, carbon dioxide, and under anaerobic conditions, to methane by microorganisms in various environments such as soil, sea and lake water, and sewage (LEE, 1996a; SUDESH *et al.*, 2000; LUENGO *et al.*, 2003; REDDY *et al.*, 2003).

Among biopolymers, polyhydroxyalkanoates (PHAs) are considered to be strong candidates for biodegradable polymer applications because they combine biodegradability with mechanical properties similar to those of various synthetic thermoplastics and elastomers currently in use.

PHAs are polyesters synthesized by many Gram-positive and Gram-negative bacteria and are accumulated as discrete granules in the cytoplasm of cells as energy source. By polymerizing soluble intermediates into insoluble molecules, the cell does not undergo alterations of its osmotic state and leakage of these valuable compounds out of the cell is prevented. Consequently, the nutrient sources will remain available at a relatively low maintenance cost and with an assured return on investment (LEE, 1996b; MADISON and HUISMAN, 1999).

The accumulation of PHA in some bacteria occurs when growth is limited by a nutrient other than carbon. In this case, bacteria require the limitation of an essential nutrient such as N, P, Mg, K, O or S for efficient synthesis of PHA from an excess carbon source. There are also bacteria that do not require nutrient limitation for PHA synthesis, and can accumulate polymer during growth (LEE, 1996b; BRAUNEGG *et al.*, 1998).

Poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB), is the most studied PHA, showing a partially crystalline structure and with material properties similar to polypropylene (LEE, 1996a; SUDESH *et al.*, 2000; LUENGO *et al.*, 2003; REDDY *et al.*, 2003).

P(3HB) was first identified and isolated from a culture of *Bacillus megaterium* by Lemoigne in 1926.(MADISON and HUISMAN, 1999; VALAPPIL *et al.*, 2007) *Bacillus* strains have some interesting characteristics for industrial applications, such as fast growth in many cheap substrates, tolerates high temperatures, and high osmotic pressures. However, in this bacterium polymers accumulate maximally just prior to sporulation, being degraded during this process. This fact is a setback for the development of any economically viable biotechnological process for the production of P(3HB) (WU *et al.*, 2001; FULL *et al.*, 2006; VALAPPIL *et al.*, 2007). Wu *et al.* (2001) showed that it was difficult to promote PHB

formation in *Bacillus* strains using standard methods of cultivation such as high carbon:nitrogen and carbon:phosphorus ratios, or low oxygen supply, since all these methods induced cell sporulation (WU *et al.*, 2001).

In this context, the aim of this research was the optimization of P(3HB) production in submerged cultures of *B. megaterium* using mineral medium with sucrose as carbon source and nitrogen as limiting substrate. The C:N ratio, the minimal amount of carbon source necessary to produce P(3HB) as defined by an objective function, and the effect of scaling-up from shaker to bioreactor were investigated.

3.2 Materials and Methods

Microorganism and culture media

Bacillus megaterium DSM 32^T was used in this study. The strain was preserved frozen after cultivation in mineral salts medium, mixed with 20% glycerol (v/v). It was activated in two subsequent pre-cultures (18 h and 5 h) before cultivation. Culture mineral salts medium had the following composition: KH_2PO_4 1.5 g L⁻¹; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 9 g L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g L⁻¹; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g L⁻¹; citric acid, 0.1 g L⁻¹, supplemented with 1 mL of trace elements solution ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g L⁻¹; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g L⁻¹; H_3BO_4 , 0.3 g L⁻¹; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g L⁻¹; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g L⁻¹ (NH_4)₆Mo₇O₂₄·H₂O, 0.03 g L⁻¹; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g L⁻¹; $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g L⁻¹). Medium pH was adjusted to 7.0 with 2 mol L⁻¹ NaOH or 2 mol L⁻¹ H₃PO₄. Sucrose and ammonium sulphate were supplemented according to the experimental design.

Shake flask cultivation

In order to evaluate the effects of initial sucrose concentration (S_i) and carbon:nitrogen ratio (C:N) on cell concentration and polymer accumulation, shake flask cultivations were carried out according to a central composite design of experiments (DOE) with three replications at the central point. The levels of the coded (X_1 and X_2) and uncoded (S_i and C:N, respectively) variables are presented in Table 3.1, as well as nitrogen source (NS) concentration used to give the desired C:N. It is important to mention that here C:N represents the w/w carbon:nitrogen ratio; for comparison the correspondent molar ratios, (C:N) molar, are also given in Table 3.1. 250 mL shake flasks containing 50 mL of culture medium and 2 mL of a pre-culture as inoculum were incubated at 30 °C and 160 rpm. Samples were collected at 4, 8, 12, 16, 20 and 24 h. Experimental results were analyzed using the software STATISTICA 7.0 (Statsoft) and the optimal operating condition was obtained using the software MATLAB R2007a (Mathworks).

Bench-scale Bioreactor cultivation

Bench-scale bioreactor cultivations were performed in a 5 L Biostat B (Braun Biotech, Melsungen, Germany) with 4 L of culture medium and 80 mL of a pre-culture as inoculum. The initial carbon and nitrogen source concentrations (sucrose 16 g L^{-1} ; ammonium sulphate 2 g L^{-1}) were chosen according to the optimal point of the surface response obtained in the DOE performed in shaker flasks. Temperature was kept at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ and pH was maintained at 7.0 by adding 2 mol L^{-1} NaOH or 2 mol L^{-1} H_3PO_4 . Air was supplied at flow rate of 4 L min^{-1} and stirrer speed was varied from 400 to 700 rpm to keep oxygen concentration above 40% of saturation. Bench-scale bioreactor cultivations without pH control, but keeping the other conditions unchanged, were also carried out. Analytical procedures cell dry weight (CDW) was evaluated for 10 – 40 mL samples of culture. The cell suspension was centrifuged at 2500 g for 20 min at $4 \text{ }^\circ\text{C}$, washed with distilled water, transferred to pre-weighed flasks and dried at $80 \text{ }^\circ\text{C}$ until constant weight. Residual biomass was estimated subtracting PHB content from CDW. PHB content was determined by gas chromatography (GC) as described by Riis and Mai (1988). About 40 mg of dried biomass powder was suspended in 2 mL of 1,2-dichloroethane, 2 mL of a 1:4 v/v hydrochloric acid propanol solution and 200 μL standard solution (4% w/v benzoic acid in propanol), and incubated at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ for 2 h. After cooling to room temperature, 4 mL of distilled water was added and the samples were shaken for 30 s. The organic phase was directly analyzed in a GC Shimadzu (Kyoto, Japan) 14 B (FID detector, capillary column: Carbowax 60 m \times 0.25 mm, CPWAX52CB - Varian, Palo Alto, CA, USA). Pure poly(3-hydroxybutyrate) (Aldrich, Sigma-AldrichCo, St. Louis, MO, USA) was used as reference. Sucrose was analyzed by the phenol-sulfuric acid method (DUBOIS *et al.*, 1956) and by high performance liquid chromatography (HPLC) using a Rezex-RHM (300 mm \times 7.8 mm) column at $80 \text{ }^\circ\text{C}$ and RI detector (Phenomenex Torrance, CA, USA). Nitrogen was determined by the phenol-hypochlorite reaction (WEATHERBURN, 1967). All analytical procedures were done in duplicate.

Table 3.1: Central composite design of experiments.

EXP	X1 (S)	X2 (C:N)	S_i (g L^{-1})	C:N	$(\text{C:N})_{\text{molar}}$	NS (g L^{-1})
1	1	1	44	22	8.5	2.00
2	1	-1	44	8	3.1	5.50
3	-1	1	16	22	8.5	0.73
4	-1	-1	16	8	3.1	2.00
5	0	-1.41	30	5	1.9	6.00
6	0	1.41	30	25	9.6	1.20
7	-1.41	0	10	15	5.8	0.67
8	1.41	0	50	15	5.8	3.33
9a	0	0	30	15	5.8	2.00
9b	0	0	30	15	5.8	2.00
9c	0	0	30	15	5.8	2.00

3.3 Results and Discussion

Shake flask experiments

Figure 3.1 shows the kinetics of P(3HB) accumulation, nitrogen concentration and pH variation obtained in shaker experiments carried out according to the DOE of Table 3.1. Except for experiments 3 and 7, P(3HB) accumulation inside the cell increased during 20 h of cultivation (Figure 3.1a), achieving around 70% of CDW, even without nitrogen limitation (Figure 3.1b). Experiments 3 and 7 showed the lowest values of polymer accumulation, around 35% of CDW at 9 h of cultivation. These results are in accordance with those of Omar *et al.* (2001) and McCool *et al.* (1996), indicating that *B. megaterium* shows a different behavior from that of bacteria commonly used for biopolymer production, such as *Cupriavidus necator* (*R. eutropha*), which requires nitrogen limitation to produce large amounts of P(3HB). The lowest values of polymer accumulation were observed in the experiments with nitrogen limitation (experiments 3 and 7).

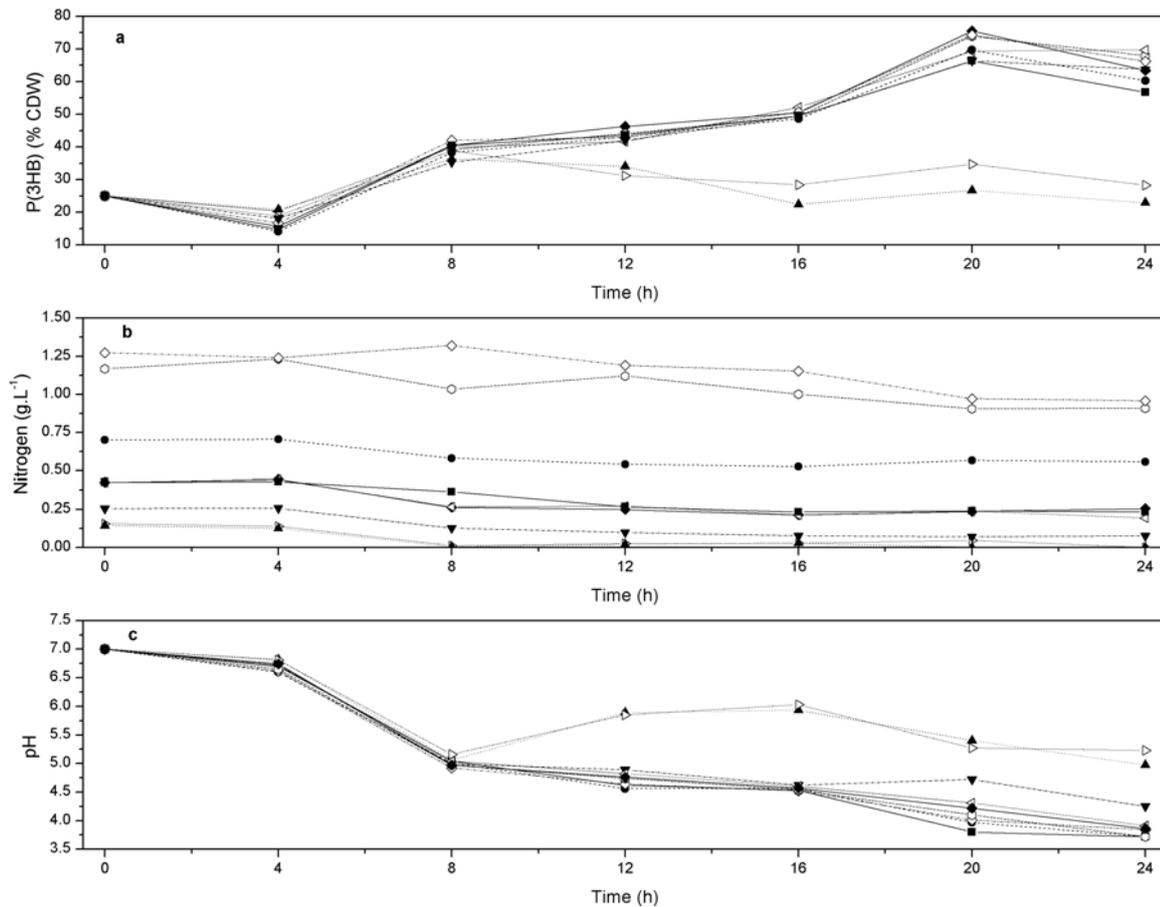


Figure 3.1: Time course of (a) polymer accumulation (% CDW) and (b) nitrogen concentration and (c) pH in the culture —■ exp 1 (S = 44; C:N = 22; FN = 2), ---● exp 2 (S = 44; C:N = 8; FN = 5.5), ---▲ exp 3 (S = 16; C:N = 22; N = 0.73), ---▼ exp 4 (S = 16; C:N = 8; FN = 2), ---◇ exp 5 (S = 30; C:N = 5; FN = 6), ---◁ exp 6 (S = 30; C:N = 25; FN = 1.2), ---▷ exp 7 (S = 10; C:N = 15; FN = 0.67), ---○ exp 8 (S = 50; C:N = 15; FN = 3.33) e —◆ exp 9 (S = 30; C:N = 15; FN = 2).

For the experiments that showed high polymer accumulation, pH of the medium (Figure 3.1c) decreased, reaching values around 4, while for experiments 3 and 7, with low polymer accumulation, pH was close to 5. These results indicate a possible correlation between pH and polymer accumulation by the cell, which are confirmed by the correlation coefficients in Table 3.2, where strong correlation between accumulated P(3HB) and pH of the medium was observed, with correlation coefficients close to one, except for experiments 3 and 7. Since cell growth generally leads to acidification of the culture medium, strong correlation between residual biomass and pH would also be expected. Based on this assumption the low correlation found between these variables (Table 3.2) could be attributed to cell growth inhibition due to the low pH levels reached after approximately 16 h of culture.

Table 3.2: Values of correlations coefficients between pH and percent of polymer accumulated and residual biomass to pH.

EXP	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH-P(3HB) (% CDW)	-0.96	-0.93	-0.79	-0.86	-0.94	-0.93	-0.49	-0.95	-0.95
pH- X_R (g L ⁻¹)	-0.62	0.42	-0.66	-0.80	-0.62	-0.75	-0.68	-0.72	-0.84

Based on the results of P(3HB) accumulation in Figure 3.1a, 20 h of cultivation (the time at which maximum production was obtained) was chosen to perform analyses of the results obtained during the DOE. Figure 2 shows response surface plots for the effects of initial carbon:nitrogen ratio and initial sucrose concentration on total biomass, sucrose and nitrogen concentrations, and biopolymer accumulation (%CDW). In all statistical calculations, a 95% confidence level was used and the equations that describe these response surfaces showed good coefficients of determination (R^2) (Table 3.3). Figure 3.2a shows that an increase in initial sucrose concentration increased total biomass and that at high sucrose concentration there is no influence of carbon:nitrogen ratio on total biomass. Moreover, high C:N combined with low initial sucrose concentration (EXP 3 and EXP 7) resulted in low biomass concentration probably due to nitrogen limitation.

Table 3.3: Response surface equations and coefficient of determination.

Response surface equations	R^2
$X_T = 7.35 - 0.0018 \cdot S_i^2 - 0.3919 \cdot (C:N) + 0.0111 \cdot S_i \cdot (C:N)$	0.80
$P = 54.3 - 0.043 \cdot S_i^2 + 2.182 \cdot S_i - 3.548 \cdot (C:N) + 0.092 \cdot S_i \cdot (C:N)$	0.92
$S = 20 - 0.0555 \cdot (C:N)^2 + 0.8116 \cdot S_i + 1.8588 \cdot C:N$	0.99
$N = 0.398 + 0.0025 \cdot (C:N)^2 + 0.033 \cdot S_i - 0.0774 \cdot (C:N) - 0.00122 \cdot S_i \cdot (C:N)$	0.98

X_T : total biomass; S_i : initial sucrose; (C:N): carbon:nitrogen ratio, P: P(3HB), S: sucrose; N: nitrogen;

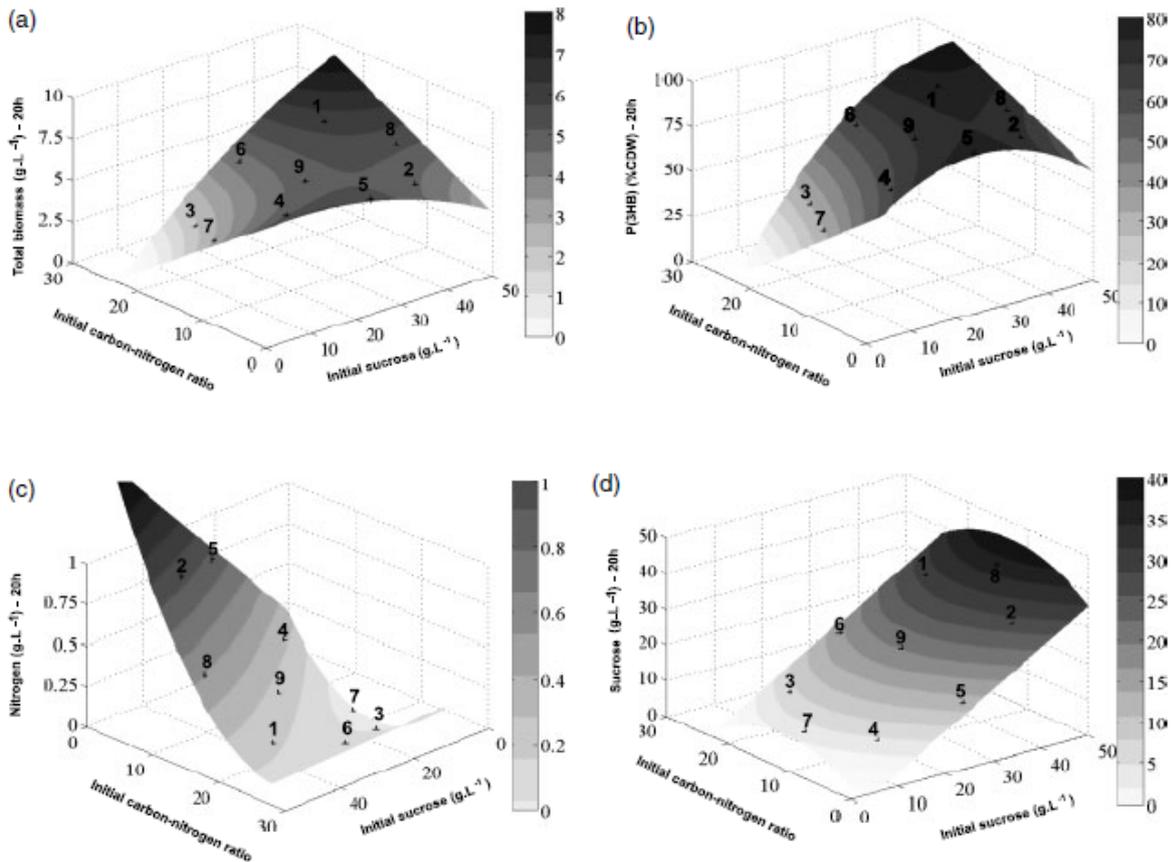


Figure 3.2: Response surface plots for the effects of initial carbon:nitrogen ratio and initial sucrose concentration on (a) total biomass, (b) biopolymer (%CDW), (c) nitrogen and (d) sucrose measured at 20 hours of cultivation.

It can be seen in Figure 3.2b that polymer accumulation increased with initial sucrose concentration up to 30 g.L^{-1} but above this concentration there was no further increase in polymer accumulation and little influence of C:N ratio. Figure 3.2c shows that residual nitrogen increased as C:N was decreased, and for the smallest carbon:nitrogen ratios nitrogen source was completely (EXP 3 and EXP 7) or almost completely exhausted (EXP 1 and EXP 6), especially for low initial sucrose concentrations. Similar results were obtained for sucrose, i.e. minimum residual sucrose occurred at low initial sucrose concentrations. Figure 3.2d shows that, in most experiments, considerable amounts of sucrose remained in the culture medium, representing a waste of this substrate. The final sucrose concentration was higher than 10 g L^{-1} in all experiments, except for 3, 4, and 7, where it was between 2 and 4 g L^{-1} .

Aiming to obtain high polymer production combined with low sucrose concentration remaining in the culture medium, the following objective function was formulated:

$$F_{Obj}(S_i, C:N) = (1-w) \cdot S(S_i, C:N) - w \left(\frac{P(S_i, C:N) \cdot X_T(S_i, C:N)}{100} \right) \quad (1)$$

where S , P and X_T are the values of sucrose concentration, biopolymer production and biomass accumulation predicted by the response surface equations (Table 3.3) and w is a weighting factor that defines the relative contributions of the minimization of sucrose remaining and of the maximization of biopolymer production and biomass accumulation for the optimization problem.

The plot of the objective function against the independent variables, S_i and C:N ratio, is shown in Figure 3.3. The optimal point, using $w = 0.5$, was found to be close to values obtained in experiment 4 ($S_i = 16 \text{ g L}^{-1}$ and C:N = 8). Consequently, the conditions of experiment 4 were chosen to carry out experiments in a bench-scale bioreactor.

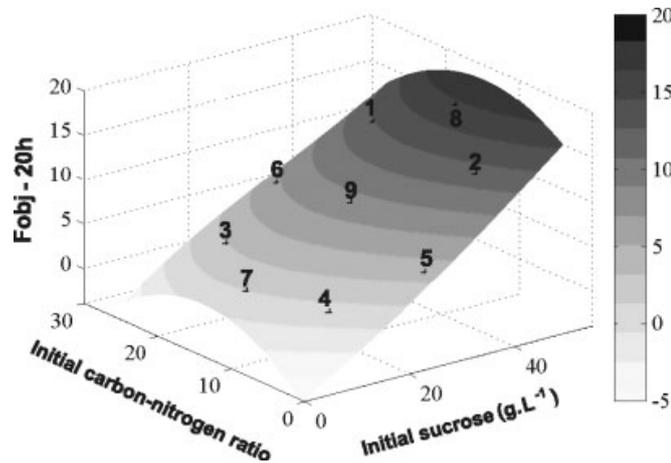


Figure 3.3: Plot of the objective function, indicating the location of the nine experiments.

Bench-scale bioreactor

In this system, two environmental situations were tested: cultivation without pH control and with pH controlled at 7.0. Both sets of experiments were carried out in duplicate. Since good reproducibility was achieved, only the mean values of the duplicates are shown. Evolution of pH and dissolved oxygen curves for both experiments are shown in Figure 3.4. In the experiment without pH control, cell growth stopped at around 12 h of cultivation (Figure 3.5), which is clearly indicated by the return of oxygen concentration to its saturation level, suggesting the interruption of cell metabolism. P(3HB) accumulation, which is obtained from the ratio between polymer and total biomass as cell dry weight, was higher in the experiment without pH control.

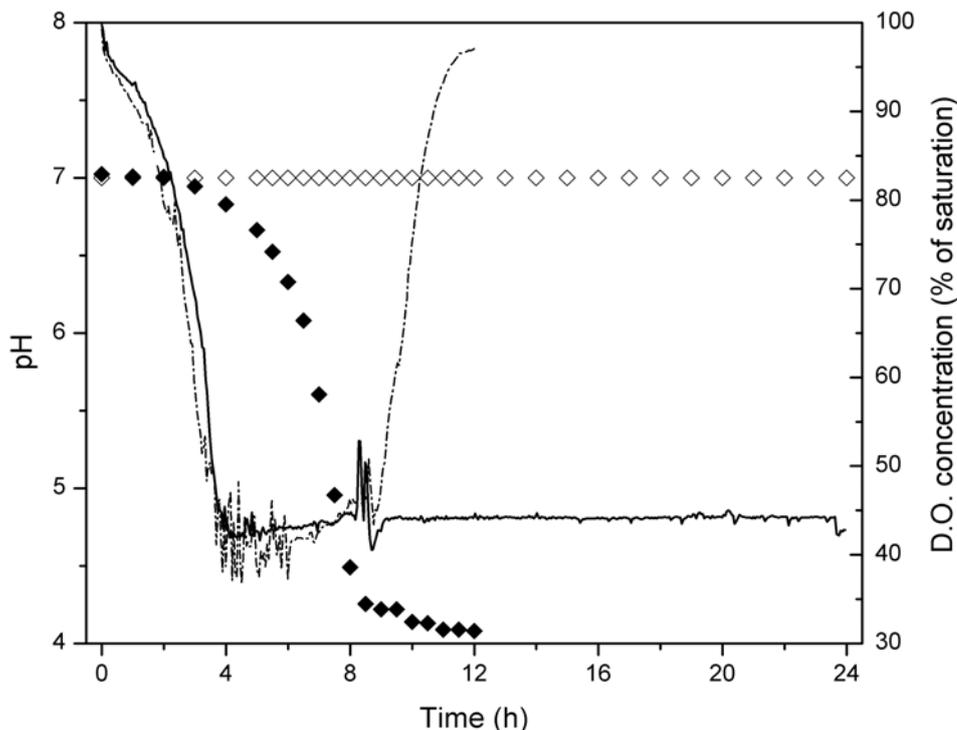


Figure 3.4: Time course of pH (\diamond with control, \blacklozenge without control) and dissolved oxygen (— with control, - - - without control).

Taking into account that in this experiment there was no limitation of either sucrose or nitrogen, cell growth interruption could be attributed to the low final pH (Figure 3.4). However, in the experiment with controlled pH, limitation of nitrogen occurred (Figure 3.6), which could explain the consumption of polymer by cells. The start of polymer consumption is clearly marked by an oxygen perturbation of the system (Figure 3.4). This fact is another indication of the different metabolism of *B. megaterium* in relation to other bacteria such as *Ralstonia eutropha*, which increases polymer production under nitrogen limitation. McCool and Cannon (1999) suggest that PHA inclusion bodies in *B. megaterium* may not only be used as carbon sources but also as a source of building blocks for amino acids synthesis.

Another important observation is the lower polymer accumulation in bioreactor experiments than those obtained in shake flasks, even when the same process conditions, i.e. cultivation without pH control, was used. Similar results were also observed by Omar *et al.* (2001) In the shaker, with its oxygen limitation, cells might undergo an alternative metabolism, shifting the TCA cycle via acetyl-CoA and proceeding to 3HB biopolymer formation instead of cells formed under fully aerated conditions (VALAPPIL *et al.*, 2007). It is also very likely that the aeration condition in the bioreactor allowed *B. megaterium* to grow at the expense of P(3HB).

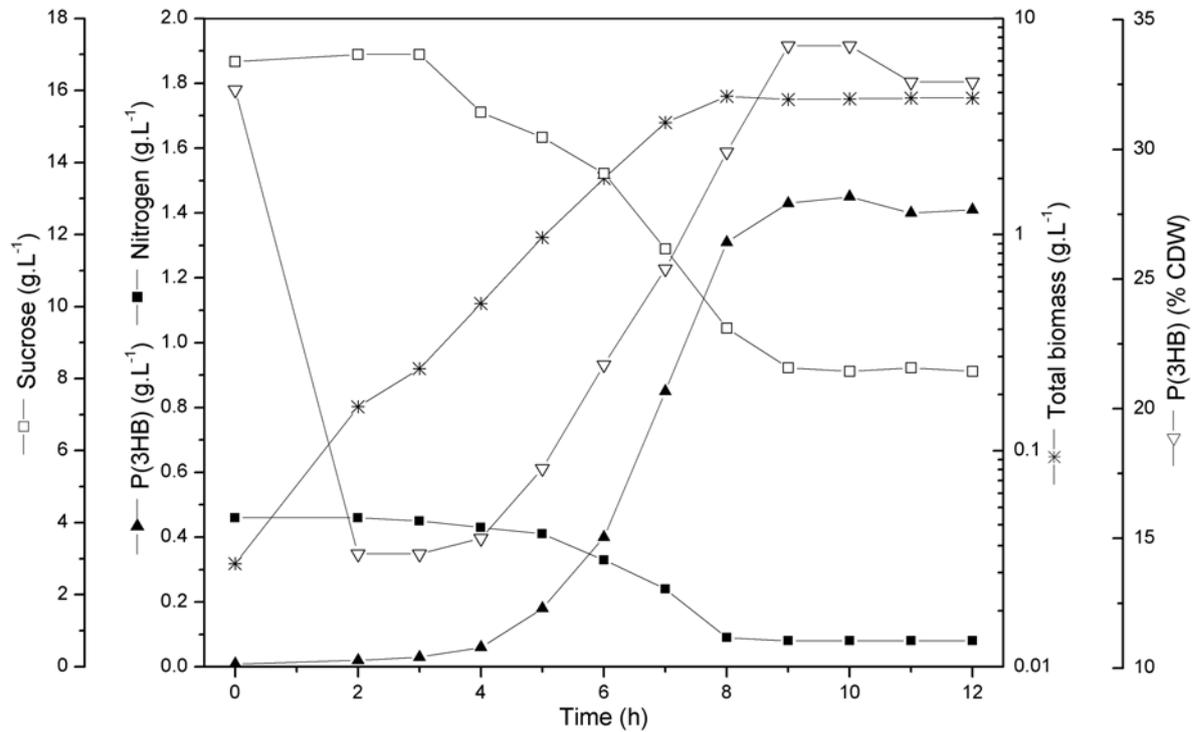


Figure 3.5: Time course of total biomass biopolymer concentration, biopolymer accumulation (%CDW), sucrose concentration and nitrogen concentration in the culture without pH control.

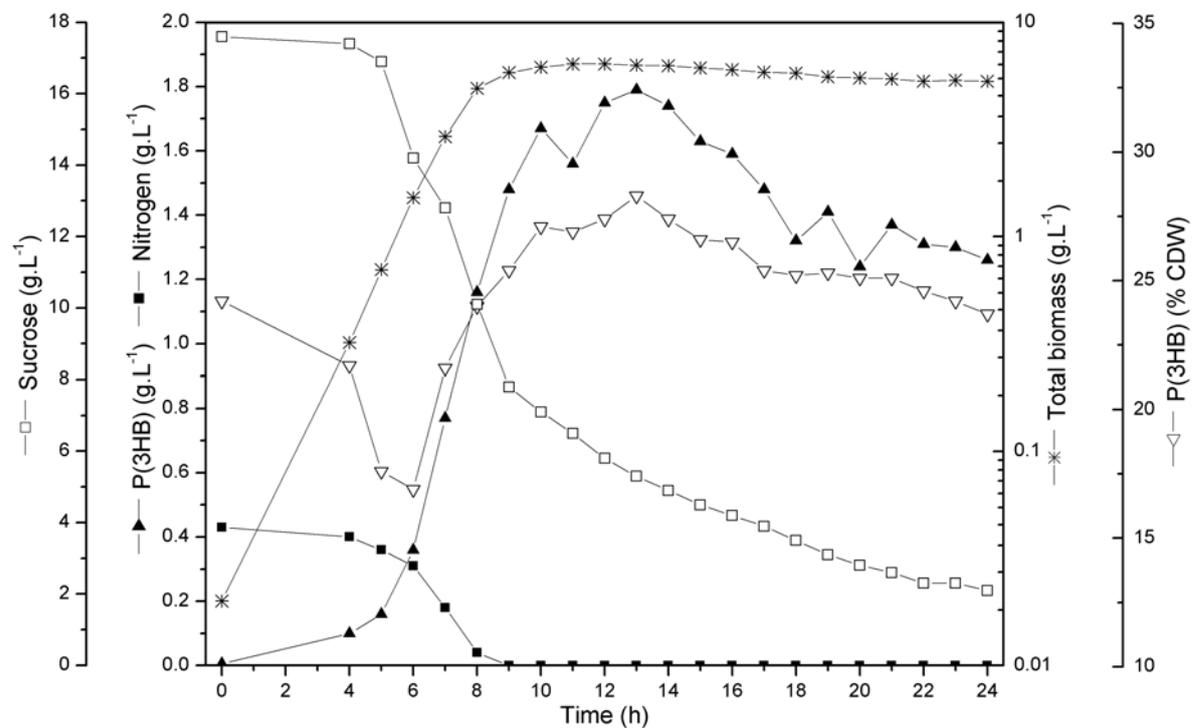


Figure 3.6: Time course of total biomass biopolymer concentration, biopolymer accumulation (%CDW), sucrose concentration and nitrogen concentration in the culture with pH control.

3.4 Conclusions

Results of small-scale experiments carried out in shake flasks showed that *Bacillus megaterium* was able to produce large amounts of P(3HB), reaching polymer accumulation around 70% CDW without nitrogen limitation, which is one of the highest production levels so far reported for this bacterium, making this microorganism very interesting for industrial applications. Through minimization of a objective function based on the statistical model obtained from these experiments, the optimal culture conditions were found to be the combination of 16 g L⁻¹ of sucrose and a carbon:nitrogen ratio of 8. Comparisons of shaker and bench-scale bioreactor experiments show both the importance of pH and aeration strategies, but these variables must be further studied in order to improve P(3HB) production in larger systems. It is likely that complex aeration strategies linked to cell metabolism will be required for further developments using this bacterium.

3.5 Acknowledgements

The authors wish to thank MCT/CNPq for financial support.

3.6 References

- BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, v. 65, n. 2-3, p. 127-161, 1998.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- FULL, T. D.; JUNG, D. O.; MADIGAN, M. T. Production of poly- β -hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. *Letters in Applied Microbiology*, v. 43, p. 377-384, 2006.
- LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, n. 1, p. 1-14, 1996a.
- LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, v. 14, n. 11, p. 431-438, 1996b.
- LUENGO, J. M.; GARCÍA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G.; OLIVERA, E. R. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, n. 3, p. 251-260, 2003.

- MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 63, n. 1, p. 21-53, 1999.
- MCCOOL, G. J.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate Inclusion Body-Associated Proteins and Coding Region in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.*, v. 181, n. 2, p. 585-592, 1999.
- MCCOOL, G. J.; FERNANDEZ, T.; LI, N.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 138, n. 1, p. 41-48, 1996.
- OMAR, S.; RAYES, A.; EQAAB, A.; VOß, I.; STEINBÜCHEL, A. 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.
- REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, v. 87, n. 2, p. 137-146, 2003.
- RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography A*, v. 445, p. 285-289, 1988.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, v. 25, n. 10, p. 1503-1555, 2000.
- VALAPPIL, S. P.; BOCCACCINI, A. R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 91, n. 1, p. 1-17, 2007.
- WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, v. 39, n. 8, p. 971-974, 1967.
- WU, Q.; HUANG, H.; HU, G.; CHEN, J.; HO, K. P.; CHEN, G.-Q. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 80, n. 2, p. 111-118, 2001.

Capítulo 4

Artigo 2 - Modeling of P(3HB) production by *Bacillus megaterium*

Este artigo está publicado no periódico *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. DOI: 10.1002/jctb.2713

Modeling of P(3HB) production by *Bacillus megaterium*

Débora Jung Luvizetto Faccin^a, Mariana Pacheco Corrêa^a, Rosane Rech^b, Marco Antônio Záchia Ayub^b, Argimiro Resende Secchi^c, Nilo Sérgio Medeiros Cardozo^{a*}.

Abstract

BACKGROUND: The poly(3-hydroxybutyrate) – P(3HB) – is a polyester synthesized by many bacteria and stored as an energy reserve material in the cell cytoplasm as water-insoluble inclusions. The aim of this research was to present a mathematical modeling approach in order to describe the culture kinetics of the bacterium *Bacillus megaterium* for the production of poly(3-hydroxybutyrate).

RESULTS: Four different models were proposed, differing in the expressions used for specific growth and polymer production rates. The predictions of these models were compared with experimental data and against the results of other models reported in the literature.

CONCLUSION: Analysis of the experimental data under controlled and uncontrolled pH conditions showed that the inclusion of a correction factor for products formation, as well as a term related to the influence of H⁺ cations, are important for the correct modeling of this bioprocess. Compared with earlier models reported in the literature the proposed models show better fitting, with less or equal number of parameters, and provide parameters estimates with much lower variability.

Keywords: Poly(3-hydroxybutyrate); biopolymer; modeling; *Bacillus megaterium*.

*Corresponding author. Tel.: +55 51 33084075; Fax: +55 51 33083277. E-mail address: nilo@enq.ufrgs.br (N.S.M. Cardozo)

^aChemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

^bFood Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul.

^cCOPPE-Chemical Engineering Program, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

4.1 Notation

α	growth-associated rate constant in sucrose consumption equations in the Khanna–Srivastava and proposed models	$g_{\text{sucrose}}(g_{\text{residual biomass}})^{-1}$
γ	non-growth-associated rate constant in sucrose consumption equations in the Khanna–Srivastava and proposed models	$g_{\text{sucrose}}(g_{\text{residual biomass}}h)^{-1}$
ϕ	correction factor for biopolymer formation rate	--
μ_m	maximum specific growth rate	h^{-1}
μ	specific growth rate	h^{-1}
μ_1	specific growth rate for Monod growth kinetics of the Raje-Srivastava model	h^{-1}
μ_2	specific growth rate for sigmoid growth of the Raje-Srivastava model	h^{-1}
eN	exponent term for nitrogen inhibition of the Khanna-Srivastava model	--
eS	exponent term for sucrose inhibition of the Khanna-Srivastava model	--
H	H^+ concentration	$g_H \cdot L^{-1}$
H_m	maximum H^+ concentration in the proposed models	$g_H \cdot L^{-1}$
k_0	growth-associated product formation constant in the Raje-Srivastava model	$g_{P(3HB)}(g_{\text{residual biomass}})^{-1}$
k_1	growth-associated product formation constant of the Khanna-Srivastava, Mulchandani and proposed models	$g_{P(3HB)}(g_{\text{residual biomass}})^{-1}$
k_{1H}	constant in specific growth rate equation of the proposed models	$g_H \cdot L^{-1}$
k_2	non-growth-associated product formation constant of the Khanna-Srivastava, Mulchandani and proposed models	$g_{P(3HB)}(g_{\text{residual biomass}}h)^{-1}$
k_{2H}	constant in specific growth rate equation of the proposed models	$L(g_H)^{-1}$
k_3	constants in nitrogen consumption equation of the Mulchandani and Raje-Srivastava models	$g_{\text{nitrogen}}(g_{\text{residual biomass}})^{-1}$
k_4	non-growth-associated product formation constant in the Raje-Srivastava model	$g_{P(3HB)}(g_{\text{residual biomass}}h)^{-1}$
k_5	constant for inhibition due to high product concentration in Raje-Srivastava model	h^{-1}
k_6	constant in carbon consumption equation of the Mulchandani and Raje-Srivastava models	$g_{\text{sucrose}}(g_{\text{residual biomass}}h)^{-1}$
k_7	constant in carbon consumption equation of the Mulchandani and Raje-Srivastava models	$g_{\text{sucrose}}(g_{\text{residual biomass}})^{-1}$
k_8	constant in carbon consumption equation of the Mulchandani and Raje-Srivastava models	$g_{\text{sucrose}}(g_{P(3HB)})^{-1}$
k_d	cell dead rate	h^{-1}
k_H	constant in H^+ equation of the proposed models	$L(g_{P(3HB)})^{-1}$
K_{NS}	saturation constant based on nitrogen concentration of the Khanna-Srivastava and proposed model	$g_{\text{nitrogen}} \cdot L^{-1}$
k_{p1}	constant in H^+ equation of the proposed models	$L(g_{\text{biomass}})^{-1}$
k_{p2}	constant in H^+ equation of the proposed models	$L(g_{\text{biomass}}h)^{-1}$
$k_{p1'}$	constant in H^+ equation of the proposed models	$L(g_{\text{residual biomass}})^{-1}$
$k_{p2'}$	constant in H^+ equation of the proposed models	$L(g_{\text{residual biomass}}h)^{-1}$

K_{PS}	constant in the Raje-Srivastava model	$g_{\text{nitrogen}} \cdot L^{-1}$
K_{SI}	saturation constant for Monod growth term in the Raje-Srivastava model	$g_{\text{nitrogen}} \cdot L^{-1}$
K_{S2}	saturation constant for sigmoid growth term in the Raje-Srivastava model	$g_{\text{nitrogen}} \cdot L^{-1}$
K_S	saturation constant for Monod growth term in the Mulchandani model	$g_{\text{nitrogen}} (g_{\text{sucrose}})^{-1}$
K_{SS}	saturation constant based on sucrose concentration of the Khanna-Srivastava and proposed models	$g_{\text{sucrose}} \cdot L^{-1}$
m	exponential constant for sigmoid growth term in the Raje-Srivastava model	--
m_N	maintenance coefficient of the Khanna-Srivastava model	$g_{\text{nitrogen}} (g_{\text{residual biomass}} h)^{-1}$
N	nitrogen concentration	$g_{\text{nitrogen}} \cdot L^{-1}$
n	exponent in inhibition term in the Mulchandani and Raje-Srivastava models	--
Nm	nitrogen concentration at which there is complete inhibition in the Khanna-Srivastava model	$g_{\text{nitrogen}} \cdot L^{-1}$
nN	constant in equation of specific growth rate of the Khanna-Srivastava model	--
nS	constant in equation of specific growth rate of the Khanna-Srivastava model	--
NS_M	is the maximum value of Nitrogen/Carbon at which the specific growth rate becomes zero in the Mulchandani and Raje-Srivastava models	$g_{\text{nitrogen}} (g_{\text{sucrose}})^{-1}$
P	biopolymer concentration	$g_{P(3HB)} \cdot L^{-1}$
pH	pH of the medium	--
S	sucrose concentration	$g_{\text{sucrose}} \cdot L^{-1}$
S_m	sucrose concentration at which there is complete inhibition in the Khanna-Srivastava model	$g_{\text{sucrose}} \cdot L^{-1}$
T	Time	h
X	total biomass concentration	$g_{\text{biomass}} \cdot L^{-1}$
X_R	residual biomass concentration	$g_{\text{residual biomass}} \cdot L^{-1}$
X_{Rhalf}	concentration of X_R component when the rate of product accumulation decrease on half in the proposed models	$g_{\text{residual biomass}} \cdot L^{-1}$
X_{Rmin}	minimum concentration of X_R component after which product accumulation starts of the Raje-Srivastava model	$g_{\text{residual biomass}} \cdot L^{-1}$
$Y_{XR/N}$	biomass yield based on nitrogen in the proposed model	$g_{\text{residual biomass}} (g_{\text{nitrogen}})^{-1}$

4.2 Introduction

The great consumption of plastic materials, mainly as disposable items, and the growing concern about solid waste management, are attracting attention to biodegradable polymers. Poly(3-hydroxybutyrate), or P(3HB), is a biopolyester that belongs to this class of materials and has received special attention for presenting mechanical properties similar to those of polypropylene (LEE, 1996).

P(3HB) is produced intracellularly as inclusion bodies by many bacteria in order to store carbon and energy. The production of P(3HB) by microorganisms, as usually occurs in bioprocesses, involves complex metabolic pathways and is highly influenced by the conditions of the culture and media compositions (STEINBÜCHEL, 2001; LUENGO *et al.*, 2003). Consequently, optimization of the production of P(3HB) is not a trivial issue and the availability of adequate models to represent the process becomes a key requirement to determine the conditions maximizing the amount of polymer produced. Depending on the specific bacterium that is used, different models can be required for the production of P(3HB). This is particularly relevant when using *Bacillus megaterium* because this bacterium exhibits unique behaviors presenting, for instance, consumption of the biopolymer under nitrogen limitations (MCCOOL *et al.*, 1996; FACCIN *et al.*, 2009).

Bioprocesses, with their complex interactions of physicochemical, biochemical, and genetic phenomena, are usually mathematically modeled on simplified assumptions. Thus, the available models for these types of processes could satisfactorily represent only a limited number of variables (WIECHERT, 2002; KOLLER *et al.*, 2006; DHURJATI and MAHADEVAN, 2008).

There are many reports in the literature about modeling of batch biopolymers production (SONNLEITNER *et al.*, 1979; LUONG *et al.*, 1988; YOO and KIM, 1994; RAJE and SRIVASTAVA, 1998; KHANNA and SRIVASTAVA, 2005; SOMASHEKARA *et al.*, 2009; PENLOGLOU *et al.*, 2010). Yoo and Kim (1994) presented a cybernetic modeling approach to biopolymers production by *Alcaligenes latus* (*Azohydromonas lata*), assuming that the production of biopolymers is regulated by enzymatic mechanisms. This model is able to predict the production of P(3HB), but requires some parameters, such as the initial enzyme level, which are not easily experimentally determinable.

Raje and Srivastava (1998) proposed an expression for the rate of biopolymer production by *Ralstonia eutropha* where growth and non-growth associated productions and inhibition due to high product concentration are considered. Khanna and Srivastava (2005) presented a review on modeling biopolymer production, presenting expressions for the specific growth rate. They proposed a model for P(3HB) production by *R. eutropha* in which the specific growth rate takes into consideration the limitation and inhibition by both substrates (carbon and nitrogen). Extensions of these models to fed-batch culture are also found in the literature (RAJE and SRIVASTAVA, 1998; PATWARDHAN and SRIVASTAVA, 2004; SHAHHOSSEINI, 2004).

It is well known that the pH of cultures play a key role in the physiology of microorganism, and models that include pH as variable can be found for some metabolic products (ÅKERBERG *et al.*, 1998; ROSS *et al.*, 2003; KAPTAN ÖLMEZ and ARAN, 2005; ÇELEKLI *et al.*, 2009). However, the models presented in the literature for P(3HB) production do not take this variable into consideration, probably because most of the experimental data used for their validation are generated under controlled pH conditions. Experiments with uncontrolled pH showed that even with no substrate limitation cell growth is hindered at low pHs (BEAULIEU *et al.*, 1995; FACCIN *et al.*, 2009).

The aim of this research was to present a mathematical modeling approach to describe the culture kinetics of the bacterium *Bacillus megaterium* for the production of the biopolymer P(3HB). This new mathematical approach proposes different models varying the expressions used for specific growth and polymer production rates. These models are analyzed taking into consideration experimental data obtained using bioreactors and is also compared with the results of other models reported in the literature.

4.3 Modeling and Parameter

Mathematical models from the literature

Three P(3HB) production models from the literature were analyzed: the Raje-Srivastava model (RAJE and SRIVASTAVA, 1998; KHANNA and SRIVASTAVA, 2005); the Khanna-Srivastava model (KHANNA and SRIVASTAVA, 2005) and the Mulchandani model (RAJE and SRIVASTAVA, 1998; KHANNA and SRIVASTAVA, 2005). Expressions for these models in terms of specific growth rate (μ) and mass balance for residual biomass (X_R), polymer accumulated (P), sucrose (S), and nitrogen (N) are shown in Table 4.1. The expressions used in these models for the specific growth rate are modifications of the Monod equation (MONOD, 1949).

It is important to note that the residual biomass (X_R) is not usually directly determined. It is obtained from the experimental measures of total biomass (X) and polymer concentration (P), according to the following relation (RAJE and SRIVASTAVA, 1998);

$$X = X_R + P \quad (11)$$

Table 4.1: Description of the three models from the literature used in this work.

Mulchandani model	
Residual Biomass: $\frac{dX_R}{dt} = \mu \cdot X_R$ (1)	Sucrose: $\frac{dS}{dt} = -\left(k_7 \cdot \frac{dX_R}{dt} + k_8 \cdot \frac{dP}{dt} + k_6 \cdot X_R\right)$ (3)
P(3HB): $\frac{dP}{dt} = k_1 \cdot \mu \cdot X_R + k_2 \cdot X_R$ (2)	Nitrogen: $\frac{dN}{dt} = -k_3 \cdot \mu \cdot X_R$ (4)
specific growth rate: $\mu = \left(\mu_m \cdot \frac{(N/S)}{K_S + (N/S)}\right) \cdot \left(1 - \left(\frac{(N/S)}{NS_M}\right)^n\right)$ (5)	
Raje-Srivastava model	
Residual Biomass: $\frac{dX_R}{dt} = \mu \cdot X_R$ (1)	Sucrose: $\frac{dS}{dt} = -\left(k_7 \cdot \frac{dX_R}{dt} + k_8 \cdot \frac{dP}{dt} + k_6 \cdot X_R\right)$ (3)
P(3HB): $\frac{dP}{dt} = (k_4 \cdot (X_R - X_{Rmin}) - k_5 \cdot P) \cdot \frac{K_{PS}}{K_{PS} + N} + k_0 \cdot \frac{dX_R}{dt}$ (6)	Nitrogen: $\frac{dN}{dt} = -k_3 \cdot \mu \cdot X_R$ (4)
specific growth rate: $\mu = \left(\mu_1 \cdot \frac{N}{K_{S1} + N} + \mu_2 \cdot \frac{\left(\frac{N}{K_{S2}}\right)^m}{1 + \left(\frac{N}{K_{S2}}\right)^m}\right) \cdot \left(1 - \left(\frac{N/S}{NS_M}\right)^n\right)$ (7)	
Khanna-Srivastava model	
Residual Biomass: $\frac{dX_R}{dt} = \mu \cdot X_R$ (1)	Sucrose: $\frac{dS}{dt} = -(\alpha \cdot \mu + \gamma)X_R$ (8)
P(3HB): $\frac{dP}{dt} = k_1 \cdot \mu \cdot X_R + k_2 \cdot X_R$ (2)	Nitrogen: $\frac{dN}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{X/N}} + m_N\right) \cdot X_R$ (9)
specific growth rate: $\mu = \mu_m \left[\frac{(S)^{nS}}{(K_{SS})^{nS} + (S)^{nS}}\right] \cdot \left[\frac{(N)^{nN}}{(K_{NS})^{nN} + (N)^{nN}}\right] \cdot \left[1 - \left(\frac{S}{S_m}\right)^{eS}\right] \cdot \left[1 - \left(\frac{N}{N_m}\right)^{eN}\right]$ (10)	

Models proposed in this research for the production of P(3HB) by *Bacillus megaterium*

Taking as starting point the basic formulation of the models described in Table 4.1, the following modifications were proposed in an attempt to better represent the characteristics of the production of P(3HB) by *Bacillus megaterium*: i) change of the expression for the specific growth rate (μ); ii) introduction of a correction factor (ϕ) for products formation (P and H) rates; and iii) introduction of a term for cell death in the expression for residual biomass formation. Varying the combination of these modifications, four different models were proposed. The general formulation, which is shown in Table 4.2, is the same for the four models, basically differing in the definition of the variables μ and ϕ . The specific expressions used for each model are presented in Table 4.3.

Table 4.2: General formulation of the proposed models for production of P(3HB).

Residual biomass	$\frac{dX_R}{dt} = (\mu - k_d) \cdot X_R$	(12)
P(3HB)	$\frac{dP}{dt} = (k_1 \cdot \mu \cdot \phi + k_2) \cdot X_R$	(13)
Sucrose	$\frac{dS}{dt} = -(\alpha \cdot \mu + \gamma) \cdot X_R$	(8)
Nitrogen	$\frac{dN}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{XR/N}} \cdot X_R$	(4)

Table 4.3: Expression for specific growth rate (μ) and correction factor for biopolymer formation rate (ϕ) used in the proposed models.

Model name	Specific growth rate		Correction factor for production formation	
Biop	$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_{SS} + S} \right) \cdot \left(\frac{N}{K_{NS} + N} \right)$	(14)	$\phi = 1$	(18)
BiopRhyp	$\mu = \mu_{Biop} = \mu_m \cdot \left(\frac{N}{K_{NS} + N} \right)$	(15)	$\phi = \frac{X_R}{X_R + X_{R\ half}}$	(19)
BiopRhyp_H	$\mu = \mu_{Biop} \cdot \left(1 - \frac{H}{H_m} \right)$	(16)	$\phi = \frac{X_R}{X_R + X_{R\ half}}$	(19)
BiopRhyp_Hf	$\mu = \mu_{Biop} \cdot \left(1 + \left(\frac{k_{IH}}{H} \right) + k_{2H} \cdot H \right)^{-1}$	(17)	$\phi = \frac{X_R}{X_R + X_{R\ half}}$	(19)

The expression for specific growth rate in the Biop model (Equation 14) is basically a modified Monod model (FREDRICKSON *et al.*, 1970) including sucrose and nitrogen as limiting substrates and having no substrate inhibition. In the BiopRhyp a Monod model equation is used to represent the specific growth rate (μ_{Biop} ; Equation 15), not including sucrose limitation. This approach is meant to reduce the number of parameters of the model by taking advantage of the fact that biopolymer accumulation occurs when the carbon source is available in excess (LEE, 1996; REHM, 2003), i.e., under no limitation of this nutrient. The BiopRhyp_H and BiopRhyp_Hf models are also based on this assumption, since they include the contribution of μ_{Biop} for the specific growth rate. However, these models present an additional contribution for the specific growth rate related to the influence of the pH. In BiopRhyp_H this contribution is based on the Ghose and Tyagi model (MULCHANDANI and LUONG, 1989) for product inhibition, and accounts for inhibition by the H^+ cations. In BiopRhyp_Hf the influence of the concentration of H^+ cations is modeled according to the formulation presented by Akerberg *et al.* (1998) for lactic acid production. Regarding the parameter ϕ , in the Biop model no correction factor for products formation was included

($\phi = 1$) for the polymer formation equation, while in BiopRhyp, BiopRhyp_H, and BiopRhyp_Hf models the correction factor for products formation was included (Equation 19). This hyperbolic correction is based on the experimental observation that the production of P(3HB) by *B. megaterium* can be seen as a two-stage process in terms of the ratio between residual biomass and polymer formation rates. In the first stage, the residual biomass production rate is greater than polymer formation, while in the second stage the polymer formation rate increases until reaching a maximal value (MCCOOL *et al.*, 1996; FACCIN *et al.*, 2009).

For models that consider the influence of pH (BiopRhyp_H and BiopRhyp_Hf), an additional kinetic equation is required besides those of Table 4.2, in order to describe the mass balance for H^+ cations. Since no related information was found in the literature, several functional forms for this kinetic expression were tested in a preliminary step. These functional forms are presented in later, where the results obtained with each form are presented.

Parameter estimation

Parameter estimation was carried out with the software EMSO (SOARES and SECCHI, 2003), using the Flexible Polyhedron method (NELDER and MEAD, 1965). The following objective function was used:

$$FObj = \sum_j \sum_i \left((C_{i,j} - \tilde{C}_{i,j})^2 / \sigma_j^2 \right)$$

where $C_{i,j}$ and $\tilde{C}_{i,j}$ are the experimental and the model-predicted values, respectively, of the j -th species concentration (with $j = X, P, S, N$, and, for BiopRhyp_H and BiopRhyp_Hf models, H) in the i -th experimental point, and σ_j^2 is the experimental variance in the concentration of the j -th species. Both in the intermediate steps of the parameter estimation procedure and in the final simulations, the values of $\tilde{C}_{i,j}$ were obtained using the DASSLC integrator (SECCHI, 2008) to solve the differential-algebraic system of equations resulting of Tables 6.1-6.3.

The experimental data used for parameter estimation were previously published by the authors (FACCIN *et al.*, 2009), and were obtained in submerged bioreactor cultures of *B. megaterium* DSM 32^T in a mineral medium with addition of sucrose and ammonium sulphate as carbon and nitrogen sources, respectively. The available variables were: total biomass (X), biopolymer concentration (P), sucrose concentration (S), nitrogen concentration (N), and pH of the medium (pH). All experiments were performed in fully controlled 5 L bench-scale Biostat B (Braun Biotech, Germany) bioreactors, with each different culture condition being tested both with and without pH control. Both set of experiments were carried out in duplicates. The results of each duplicate were used in order to estimate experimental variance. In the controlled pH cultures the pH was maintained at 7.0 (FACCIN *et al.*, 2009).

The coefficient of determination (R^2), the mean squared error (MSE) and F-tests were used to compare the goodness of fit of the tested models. Since all experiments were performed in duplicate, the F-test was based directly on the experimental variances, with F_0 calculated as:

$$F_0 = \frac{\tilde{\sigma}^{*2}}{\sigma^{*2}} = \frac{\frac{1}{(NE - NP)V} \sum_j^V \sum_i^{NE} (C_{i,j}^* - \tilde{C}_{i,j}^*)^2}{\frac{1}{V} \sum_j^V \sigma_j^{*2}}$$

where $\tilde{\sigma}^{*2}$ is the normalized model based estimate for the experimental variance, σ^{*2} is the normalized experimental variance, V is the number of variables, NE and NP are, respectively, the number of experimental points for each variable and the number of parameters of the considered model. Both $\tilde{\sigma}^{*2}$ and σ^{*2} were calculated using the maximal values of each variable as normalizing factor. The critical values for the F -test statistic were taken from the F probability distribution for 95% confidence (F_{TAB}).

4.4 Results and Discussion

Parameter estimation with experimental data obtained under controlled pH

The results of the parameter estimation based on data from the experiments with controlled pH are shown in Table 4.4, expressed as $\alpha_i \pm \sigma_{\alpha_i}$ where α_i represents each estimated parameter and σ_{α_i} the respective standard deviation. For this set of data fitting, only the models from the literature and Biop and BiopRhyp were used, since it was performed under fixed pH. The values of F_0 , F_{TAB} and F_0/F_{TAB} ratio for the F-test statistic are also presented in Table 4.4. Additionally, Figure 4.1 shows the comparison between the experimental data and the predictions of the different models with the parameters present in Table 4.4, while the corresponding values of R^2 and MSE obtained for each variable are shown in Table 4.5.

It must be noticed that for all models that included the parameter k_2 , good fit was obtained only when allowing this parameter to assume negative values. This is in agreement with the fact that *B. megaterium* DSM 32^T can consume biopolymer as carbon source when nitrogen limitation or cell sporulation occurs. Therefore, the negative values of k_2 are consequence of the competition between polymer production and consumption by the bacterium.

Table 4.4: Results for the parameters estimation with experimental data from controlled pH cultures.

	<i>unit</i>	Biop	BiopRhyp	Raje-Srivastava	Khanna-Srivastava	Mulchandani
α	$\text{g}_{\text{sucrose}}(\text{g}_{\text{residual biomass}})^{-1}$	$2.0221 \pm 9.22 \times 10^{-2}$	$2.0131 \pm 9.14 \times 10^{-2}$	----	$2.2617 \pm 9.35 \times 10^{-2}$	----
γ	$\text{g}_{\text{sucrose}}(\text{g}_{\text{residual biomass h}})^{-1}$	$0.0799 \pm 5.87 \times 10^{-3}$	$0.0809 \pm 5.88 \times 10^{-3}$	----	$0.0802 \pm 6.02 \times 10^{-3}$	----
μ_1	h^{-1}	----	----	$0.7969 \pm 7.25 \times 10^{-1}$	----	----
μ_2	h^{-1}	----	----	$0.7466 \pm 1.71 \times 10^{-3}$	----	----
μ_m	h^{-1}	$1.3567 \pm 1.55 \times 10^{-1}$	$1.5068 \pm 1.94 \times 10^{-2}$	----	$0.9944 \pm 3.64 \times 10^{-3}$	$3.1003 \pm 2.88 \times 10^{-1}$
eN		----	----	----	$2.4659 \pm 8.10 \times 10^{-6}$	----
eS		----	----	----	$3.3865 \pm 3.76 \times 10^{-8}$	----
k_0	$\text{g}_{\text{P(3HB)}}(\text{g}_{\text{residual biomass}})^{-1}$	----	----	$0.4302 \pm 9.40 \times 10^{-1}$	----	----
k_1	$\text{g}_{\text{P(3HB)}}(\text{g}_{\text{residual biomass}})^{-1}$	$0.3955 \pm 2.28 \times 10^{-2}$	$0.7806 \pm 1.29 \times 10^{-1}$	----	$0.4723 \pm 1.67 \times 10^{-2}$	$0.4678 \pm 1.59 \times 10^{-2}$
k_2	$\text{g}_{\text{P(3HB)}}(\text{g}_{\text{residual biomass h}})^{-1}$	$-0.0084 \pm 1.38 \times 10^{-3}$	$-0.0099 \pm 1.42 \times 10^{-3}$	----	$-0.0123 \pm 1.19 \times 10^{-3}$	$-0.0118 \pm 1.19 \times 10^{-3}$
k_3	$\text{g}_{\text{nitrogen}}(\text{g}_{\text{residual biomass}})^{-1}$	----	----	$0.1035 \pm 1.38 \times 10^{-3}$	----	$0.10011.38 \times 10^{-3}$
k_4	$\text{g}_{\text{P(3HB)}}(\text{g}_{\text{residual biomass h}})^{-1}$	----	----	$-0.00019 \pm 1.02 \times 10^{-1}$	----	----
k_5	h^{-1}	----	----	$0.0018 \pm 8.69 \times 10^{-2}$	----	----
k_6	$\text{g}_{\text{sucrose}}(\text{g}_{\text{residual biomass h}})^{-1}$	----	----	$0.0850 \pm 5.09 \times 10^{-2}$	----	$0.1136 \pm 1.39 \times 10^{-4}$
k_7	$\text{g}_{\text{sucrose}}(\text{g}_{\text{residual biomass}})^{-1}$	----	----	$2.0663 \pm 3.26 \times 10^{-0}$	----	$0.9894 \pm 7.08 \times 10^{-5}$
k_8	$\text{g}_{\text{sucrose}}(\text{g}_{\text{P(3HB)}})^{-1}$	----	----	$0.6391 \pm 7.65 \times 10^{-0}$	----	$2.6840 \pm 1.53 \times 10^{-6}$
k_d	h^{-1}	$0.0110 \pm 2.65 \times 10^{-3}$	$0.0108 \pm 2.62 \times 10^{-3}$	----	----	----
K_{PS}	$\text{g}_{\text{nitrogen}} \text{L}^{-1}$	----	----	$0.0084 \pm 5.86 \times 10^{-1}$	----	----
K_{S1}	$\text{g}_{\text{nitrogen}} \text{L}^{-1}$	----	----	$0.2031 \pm 8.18 \times 10^{-0}$	----	----
K_{S2}	$\text{g}_{\text{nitrogen}} \text{L}^{-1}$	----	----	$2.2964 \pm 8.20 \times 10^{-3}$	----	----
K_S	$\text{g}_{\text{nitrogen}}(\text{g}_{\text{sucrose}})^{-1}$	----	----	----	----	$0.0734 \pm 3.37 \times 10^{-1}$
K_{NS}	$\text{g}_{\text{nitrogen}} \text{L}^{-1}$	$0.2871 \pm 5.54 \times 10^{-2}$	$0.3594 \pm 7.64 \times 10^{-3}$	----	$0.1531 \pm 2.15 \times 10^{-3}$	----
K_{SS}	$\text{g}_{\text{sucrose}} \text{L}^{-1}$	$0.1634 \pm 4.70 \times 10^{+0}$	----	----	$0.9617 \pm 2.57 \times 10^{-5}$	----
m		----	----	$0.5448 \pm 3.92 \times 10^{+0}$	----	----
m_N	$\text{g}_{\text{nitrogen}}(\text{g}_{\text{residual biomass h}})^{-1}$	----	----	----	$1.73 \times 10^{-6} \pm 2.57 \times 10^{-5}$	----
n		----	----	----	----	$2.5731 \pm 1.79 \times 10^{-2}$
N_m	$\text{g}_{\text{nitrogen}} \text{L}^{-1}$	----	----	----	$6.9923 \pm 3.13 \times 10^{-7}$	----
n_N		----	----	$2.4311 \pm 1.08 \times 10^{-3}$	$1.2461 \pm 1.71 \times 10^{-2}$	----
n_S		----	----	----	$1.8181 \pm 1.46 \times 10^{-5}$	----
NS_M	$\text{g}_{\text{nitrogen}}(\text{g}_{\text{sucrose}})^{-1}$	----	----	$0.4160 \pm 9.53 \times 10^{-2}$	----	$1.6933 \pm 1.11 \times 10^{-3}$
S_m	$\text{g}_{\text{sucrose}} \text{L}^{-1}$	----	----	----	$77.2854 \pm 1.31 \times 10^{+10}$	----
X_{Rhalf}	$\text{g}_{\text{residual biomass}} \text{L}^{-1}$	----	----	$0.0377 \pm 2.70 \times 10^{-1}$	----	----
X_{Rmin}	$\text{g}_{\text{residual biomass}} \text{L}^{-1}$	----	$1.6000 \pm 4.72 \times 10^{-1}$	----	----	----
$Y_{XR/N}$	$\text{g}_{\text{residual biomass}}(\text{g}_{\text{nitrogen}})^{-1}$	$11.0873 \pm 2.82 \times 10^{-1}$	$11.0511 \pm 2.76 \times 10^{-1}$	----	$10.0117 \pm 1.34 \times 10^{-1}$	----
FObj		0.7218	0.6318	0.7278	0.8315	0.8488
F_0		0.209	0.130	0.407	0.550	0.272
F_{TAB}		0.392	0.392	0.368	0.360	0.390
F_0/F_{TAB}		0.533	0.332	1.106	1.528	0.697

In terms of general predictive behavior, it can be noticed that the BiopRhyp model provided a slightly better fitting, as shown by its lower value of objective function at the end of the parameter estimation procedure. The goodness of fit of this model is confirmed by its performance in the F -test, presenting a model based variance of the same order of the experimental error ($F_0 < F_{TAB}$ for 95% confidence) and the lowest F_0/F_{TAB} ratio among all tested models. Except for sucrose concentration, for which all models presented basically the same fitting quality (Table 4.5 and Figure 4.1b), the BiopRhyp model also presented the best fitting when considering the predictions of the individual variables, as can be seen from the values of R^2 and MSE presented in Table 4.5. The main difference between the five models considered is in the prediction of polymer concentration (Figure 4.1a), where BiopRhyp and Raje-Srivastava models presented values of R^2 higher than the other three models and only

the BiopRhyp model seems to be capable of reproducing the actual form of the observed curve for percentage accumulation of P(3HB) (Figure 4.1c). This indicates that the correction factor for products formation introduced for biopolymer formation adequately describes the changes in the ratio (polymer production rate)/(biomass formation rate) that occur during the production of P(3HB) by *B. megaterium* DSM 32^T.

Besides best fitting with less parameters than other tested models, the BiopRhyp model also presented the lowest values of standard deviation for the estimated parameters (Table 4.4). While all the other models presented at least one parameter with percentage standard deviation greater than 100 %, for the BiopRhyp model no parameter with standard deviation higher than 30 % was found. It is also important to mention that for the models reported in the literature, extremely high values of percentage standard deviations were found for some parameters, which indicates that the observed information matrix is nearly singular (MCLEOD, 1999). In the case of Raje-Srivastava and Khanna-Srivastava models, this observation can be attributed to the large number of parameters that were considered. For the Mulchandani model this behavior was probably related to the lack of adequacy of the model.

Table 4.5: Values of coefficient of determination (R²) and mean squared error (MSE) for controlled pH cultures.

		<i>X</i>	<i>P</i>	<i>S</i>	<i>N</i>
Biop	R ²	0.9956	0.9656	0.9935	0.9790
	MSE	0.0293	0.0190	0.2834	0.0007
BiopRhyp	R ²	0.9965	0.9853	0.9930	0.9836
	MSE	0.0235	0.0081	0.3057	0.0005
Raje-Srivastava	R ²	0.9878	0.9812	0.9934	0.9690
	MSE	0.1775	0.0224	0.6245	0.0022
Khanna-Srivastava	R ²	0.9924	0.9517	0.9928	0.9817
	MSE	0.0942	0.0494	0.5818	0.0011
Mulchandani	R ²	0.9920	0.9523	0.9924	0.9826
	MSE	0.0580	0.0284	0.3575	0.0006

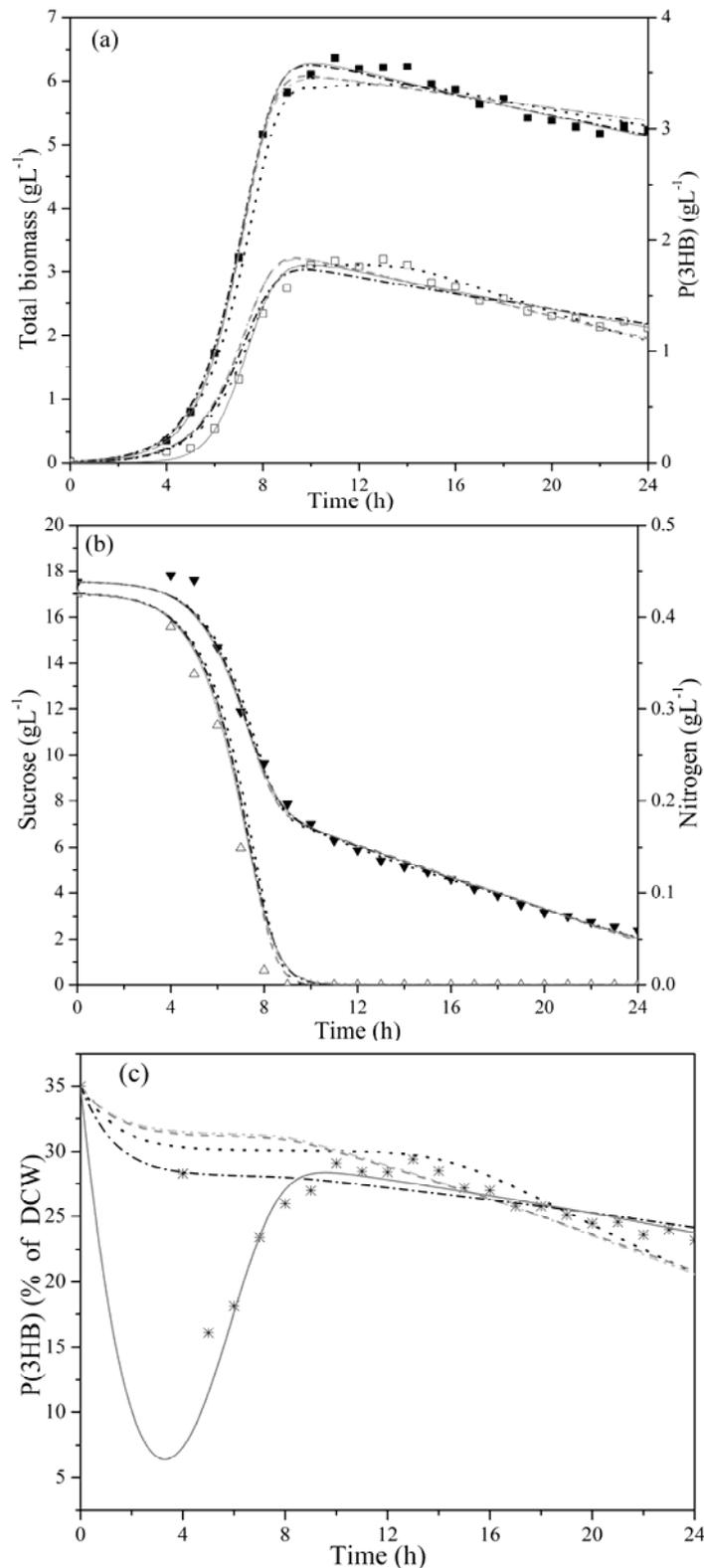


Figure 4.1: Comparison between experimental data and simulated curves of (a) total biomass and P(3HB), (b) sucrose and nitrogen concentrations, and (c) percentage of P(3HB) in relation to dry cell weight (DCW) for controlled pH tests. Experimental data: total biomass (■), P(3HB) (□), Sucrose (▼), and nitrogen (△) concentrations (g.L⁻¹) and the percentage of P(3HB) accumulation in relation to DCW (*). Models: Mulchandani (---), Raje-Srivastava (·····), Khanna-Srivastava (— · — · — ·), Biop (— · — · — ·), and BiopRhyp (—).

Parameter estimation with experimental data from uncontrolled pH bioreactor experiments

Selection of the kinetic model for H

Table 4.6 shows the different expressions tested for the description of the rate of increase of the concentration of cations H^+ in the culture medium together with the values of the objective function and the F_0/F_{TAB} ratio obtained with each expression. The main differences in the tested expressions are related to the following issues: i) which species are predominant for the acidification of the medium (P(3HB), residual biomass, or both); ii) introduction of a correction factor for products formation; and iii) kinetic order with respect to the concentration of cations H^+ .

Data of Table 4.6 show that the kinetic expression represented by Equation (24) provides the best fit of the experimental data. Therefore, this expression was used for the subsequent tests with the models BiopRhyp_H and BiopRhyp_Hf.

Table 4.6: Comparison of fitting ability among the expressions tested to describe the kinetics of cations H^+ formation.

Kinetic expression for cations H^+	BiopRhyp_H		BiopRhyp_Hf	
	Objective Function	F_0/F_{TAB}	Objective Function	F_0/F_{TAB}
$\frac{dH}{dt} = (k_{ph1} \cdot \mu + k_{ph2}) \cdot X$ (20)	5.47	6.83	5.17	11.09
$\frac{dH}{dt} = H \cdot (k_{p1} \cdot \mu + k_{p2}) \cdot X$ (21)	1.27	1.10	1.39	1.49
$\frac{dH}{dt} = H \cdot (k_{p1} \cdot \mu \cdot \phi + k_{p2}) \cdot X$ (22)	1.08	1.04	1.12	1.45
$\frac{dH}{dt} = H \cdot (k_{p1'} \cdot \mu \cdot \phi + k_{p2'}) \cdot X_R$ (23)	1.11	1.04	1.17	1.52
$\frac{dH}{dt} = H \cdot (k_{p1} \cdot \mu \cdot \phi) \cdot X$ (24)	1.14	0.71	1.12	0.85
$\frac{dH}{dt} = H \cdot k_H \cdot \frac{dP}{dt}$ (25)	1.24	0.62	1.46	1.12

Comparison of performance among the models BiopRhyp, BiopRhyp_H and BiopRhyp_Hf

Since the BiopRhyp model was shown to provide the best fitting and more accurate parameters, it was selected for the subsequent analysis along with its two variants, the models BiopRhyp_H and BiopRhyp_Hf. The results of the estimation of parameters using data from the experiments without pH control and the values of F_0 , F_{TAB} and F_0/F_{TAB} ratio for the F -test statistic are shown in Table 4.7. The comparison between the experimental data and the predictions of the different models with the estimated parameters are presented in Figure 4.2, while the respective values of coefficient of determination (R^2) and mean squared error (MSE) for each variable are shown in Table 4.8.

In the comparison between the two models that included the influence of the concentration of H^+ cations, lower values of percentage standard deviation (Table 4.7) and higher values of coefficient of determination (Table 4.8) were obtained with the BiopRhyp_H model for all variables. Therefore, it can be suggested that this model describes the system under study more accurately than the BiopRhyp_Hf, despite presenting a lower number of parameters.

Table 4.7: Results for the parameters estimation using experimental data from uncontrolled pH cultures.

	<i>unit</i>	BiopRhyp	BiopRhyp_H	BiopRhyp_Hf
α	$g_{\text{sucrose}}(g_{\text{residual biomass}})^{-1}$	$1.7499 \pm 1.96 \times 10^{-1}$	$1.7438 \pm 1.14 \times 10^{-1}$	$1.7537 \pm 2.94 \times 10^{-1}$
γ	$g_{\text{sucrose}}(g_{\text{residual biomass}} \cdot h)^{-1}$	$0.0672 \pm 1.33 \times 10^{-1}$	$0.0874 \pm 4.60 \times 10^{-2}$	$1.3318 \times 10^{-5} \pm 3.74 \times 10^{-2}$
μ_m	h^{-1}	$1.0011 \pm 4.44 \times 10^{-2}$	$1.0780 \pm 4.75 \times 10^{-2}$	$1.3287 \pm 6.04 \times 10^{-2}$
k_1	$g_{P(3HB)}(g_{\text{residual biomass}})^{-1}$	$0.6061 \pm 9.31 \times 10^{-3}$	$0.7192 \pm 2.24 \times 10^{-2}$	$0.6412 \pm 9.96 \times 10^{-3}$
k_2	$g_{P(3HB)}(g_{\text{residual biomass}} \cdot h)^{-1}$	$-0.0110 \pm 2.16 \times 10^{-3}$	$-0.0081 \pm 8.20 \times 10^{-4}$	$-0.0324 \pm 6.72 \times 10^{-4}$
k_d	h^{-1}	$0.0703 \pm 6.13 \times 10^{-3}$	$0.0599 \pm 5.27 \times 10^{-3}$	$0.1096 \pm 4.34 \times 10^{-3}$
k_{p1}	$L(g_{\text{biomass}})^{-1}$	----	$2.2873 \pm 6.93 \times 10^{-2}$	$1.7043 \pm 2.91 \times 10^{-2}$
K_{NS}	$g_{\text{nitrogen}} L^{-1}$	$0.1507 \pm 2.05 \times 10^{-2}$	$0.2057 \pm 2.56 \times 10^{-2}$	$0.1831 \pm 2.51 \times 10^{-2}$
X_{Rhalf}	$g_{\text{residual biomass}} L^{-1}$	$0.6862 \pm 4.36 \times 10^{-1}$	$1.0693 \pm 6.09 \times 10^{-2}$	$0.7496 \pm 3.33 \times 10^{-1}$
$Y_{XR/N}$	$g_{\text{residual biomass}}(g_{\text{nitrogen}})^{-1}$	$8.4803 \pm 1.47 \times 10^{-1}$	$10.1570 \pm 1.90 \times 10^{-1}$	$11.6118 \pm 1.64 \times 10^{-1}$
Hm	$g_H L^{-1}$	----	$6.1825 \times 10^{-5} \pm 5.92 \times 10^{-6}$	----
k_{1H}	$g_H L^{-1}$	----	----	$2.3776 \times 10^{-8} \pm 5.28 \times 10^{-9}$
k_{2H}	$L(g_H)^{-1}$	----	----	$9.0164 \times 10^4 \pm 3.97 \times 10^1$
F_{Obj}		1.8399	1.1366	1.1261
F_0		0.888	0.262	0.294
F_{TAB}		0.360	0.369	0.345
F_0/F_{TAB}		2.467	0.710	0.843

Additionally, the comparison between the results obtained with BiopRhyp and BiopRhyp_H indicates that the inclusion of a term considering the H^+ concentration significantly improves the adequacy of the model. Although the two models performed similarly in the fitting of P(3HB) and sucrose concentrations (Figure 4.2 and Table 4.8), BiopRhyp_H shows best fitting for total biomass and nitrogen concentrations, besides the intrinsic incapability of the BiopRhyp model to predict pH. The higher adequacy of the BiopRhyp_H model is supported by the F-test, since this model presented a value of F_0 lower than F_{TAB} for 95 % confidence and the lowest F_0/F_{TAB} ratio among tested models. Moreover, BiopRhyp_H shows lower percentage of standard deviation (<15 %), with the exception of the parameter γ , with standard deviation of 53%.

Table 4.8: Values of coefficient of determination (R2) and mean squared error (MSE) for uncontrolled pH cultures.

		<i>X</i>	<i>P</i>	<i>S</i>	<i>N</i>	<i>pH</i>
BiopRhyp	R ²	0.9861	0.9986	0.9890	0.8158	
	MSE	0.1067	0.0012	0.2914	0.0105	
BiopRhyp_H	R ²	0.9894	0.9981	0.9876	0.9848	0.9877
	MSE	0.1223	0.0025	0.4914	0.0013	0.0652
BiopRhyp_Hf	R ²	0.9902	0.9974	0.9875	0.9913	0.9863
	MSE	0.1498	0.0043	0.6609	0.0010	0.0963

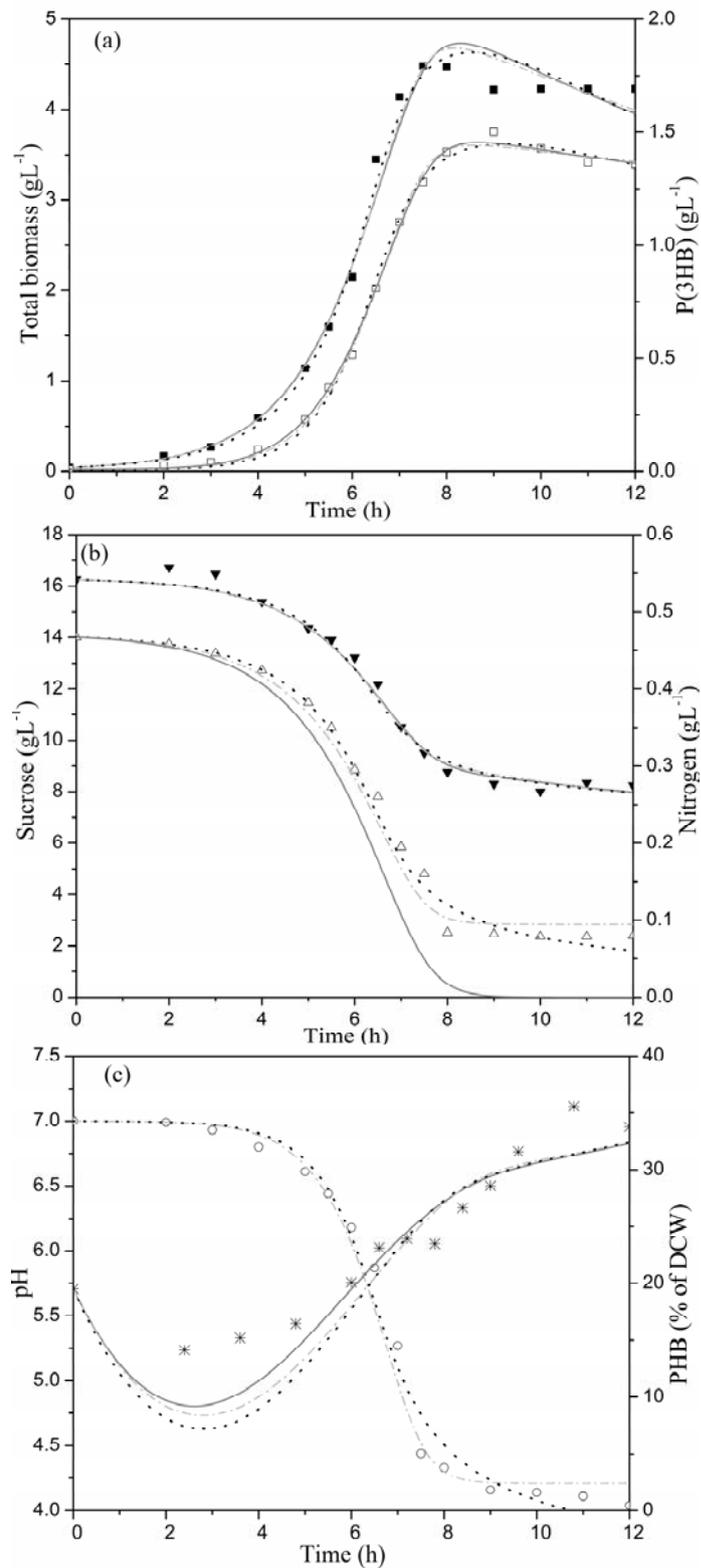


Figure 4.2: Comparison between experimental and simulated data for uncontrolled pH tests. Experimental data: (a) total biomass (■) and P(3HB) (□), (b) Sucrose (▼) and nitrogen (△) concentrations (g.L⁻¹), and (c) pH (○) and P(3HB) (*) accumulation (% DCW). Models: BiopRhyp (—), BiopRhyp_H (---), and BiopRhyp_Hf (····).

Concerning the estimated parameters, particular attention must be paid to the results for the parameter γ , the constant related to the non-growth-associated sucrose consumption. While all the other parameters presented small percentage standard deviations for the three models (Table 4.8), σ_γ was higher than 50% even for the BiopRhyp_H model. Therefore, two facts must be taken into consideration. First, no similar difficulties were verified when dealing with the experimental data from the controlled pH. Second, the main difference between the two sets of experiments lies in the fact that for uncontrolled pH cultures, when pH drops below physiological values, cells will stop growing and, consequently, sucrose concentration will remain constant. These results indicate that, at low pH, there must be either modification in the cellular metabolism or cellular lyses, leading to a decrease in the concentration of the polymer. In such cases, the higher values of percentage standard deviation for γ could be related to an inadequacy of the model to describe the culture kinetics at very low pH values.

4.5 Conclusions

The kinetics of the production of P(3HB) by *B. megaterium* cultures was modeled using three models described in the literature and four modifications proposed in this work. Analysis of the experimental data with pH control showed that the introduction of a correction factor for biopolymer formation (BiopRhyp model) is important for the correct description of the changes in the ratio of (polymer production rate)/(biomass formation rate) occurring during the culture. Analysis of the experimental data generated under uncontrolled pH indicated that the inclusion of a term related to the influence of the H^+ cations (BiopRhyp_H model) allows for more adequate fitting of the concentration of all variables involved. Although these two models (BiopRhyp and BiopRhyp_H) contain lower numbers of parameters than their counterparts from the literature, they provided parameters estimates with much lower variability. The results of this research suggest that the models here presented can be useful mathematical tools for predicting better bioprocesses for P(3HB) production by *B. megaterium*.

4.6 Acknowledgements

The authors wish to thank MCT/CNPq and CAPES for the financial support.

4.7 References

ÅKERBERG, C.; HOFVENDAHL, K.; ZACCHI, G.; HAHN-HÄGERDAL, B. Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 49, n. 6, p. 682-690, 1998.

BEAULIEU, M.; BEAULIEU, Y.; MELINARD, J.; PANDIAN, S.; GOULET, J. Influence of Ammonium Salts and Cane Molasses on Growth of *Alcaligenes eutrophus* and Production of Polyhydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 61, n. 1, p. 165-169, 1995.

ÇELEKLI, A.; YAVUZATMACA, M.; BOZKURT, H. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 14, p. 3625-3629, 2009.

DHURJATI, P.; MAHADEVAN, R. Systems Biology: The synergistic interplay between biology and mathematics. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 86, n. 2, p. 127-141, 2008.

FACCIN, D. J. L.; MARTINS, I.; CARDOZO, N. S. M.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z.; ALVES, T. L. M.; GAMBETTA, R.; SECCHI, A. R. Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 84, n. 12, p. 1756-1761, 2009.

FREDRICKSON, A. G.; MEGEE III, R. D.; TSUCHIYA, H. M.; PERLMAN, D. Mathematical Models for Fermentation Processes. *Advances in Applied Microbiology*: Academic Press, 1970. p. 419-465.

KAPTAN ÖLMEZ, H.; ARAN, N. Modeling the growth kinetics of *Bacillus cereus* as a function of temperature, pH, sodium lactate and sodium chloride concentrations. *International Journal of Food Microbiology*, v. 98, n. 2, p. 135-143, 2005.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. A Simple Structured Mathematical Model for Biopolymer (PHB) Production. *Biotechnology Progress*, v. 21, n. 3, p. 830-838, 2005.

KOLLER, M.; HORVAT, P.; HESSE, P.; BONA, R.; KUTSCHERA, C.; ATLIĆ, A.; BRAUNEGG, G. Assessment of formal and low structured kinetic modeling of polyhydroxyalkanoate synthesis from complex substrates. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 29, n. 5, p. 367-377, 2006.

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

LUENGO, J. M.; GARCÍA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G.; OLIVERA, E. R. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, n. 3, p. 251-260, 2003.

LUONG, J. H. T.; MULCHANDANI, A.; LEDUY, A. Kinetics of biopolymer synthesis: A revisit. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, n. 6, p. 326-332, 1988.

MCCOOL, G. J.; FERNANDEZ, T.; LI, N.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 138, n. 1, p. 41-48, 1996.

MCLEOD, A. I. Necessary and sufficient condition for nonsingular Fisher information matrix in ARMA and fractional ARIMA models. *American Statistician*, v. 53, n. 1, p. 71-72, 1999.

MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 371-394, 1949.

MULCHANDANI, A.; LUONG, J. H. T. Microbial inhibition kinetics revisited. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 11, n. 2, p. 66-73, 1989.

NELDER, J. A.; MEAD, R. A Simplex Method for Function Minimization. *The Computer Journal*, v. 7, n. 4, p. 308-313, 1965.

PATWARDHAN, P. R.; SRIVASTAVA, A. K. Model-based fed-batch cultivation of *R. eutropha* for enhanced biopolymer production. *Biochemical Engineering Journal*, v. 20, n. 1, p. 21-28, 2004.

PENLOGLOU, G.; ROUSSOS, A.; CHATZIDOUKAS, C.; KIPARISSIDES, C. A combined metabolic/polymerization kinetic model on the microbial production of poly(3-hydroxybutyrate). *New Biotechnology*, v. 27, n. 4, p. 358-367, 2010.

RAJE, P.; SRIVASTAVA, A. K. Updated mathematical model and fed-batch strategies for poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) production by *Alcaligenes eutrophus*. *Bioresource Technology*, v. 64, n. 3, p. 185-192, 1998.

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

ROSS, T.; RATKOWSKY, D. A.; MELLEFONT, L. A.; MCMEEKIN, T. A. Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 82, n. 1, p. 33-43, 2003.

SECCHI, A. R. *User's Manual - Version 3.5. Pacote computacional para a solução de sistemas de equações algébrico-diferenciais*. 2008. Disponível em: <<http://www.enq.ufrgs.br/enqlib/numeric/numeric.html>>.

SHAHHOSSEINI, S. Simulation and optimisation of PHB production in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 8, p. 963-969, 2004.

SOARES, R. D. P.; SECCHI, A. R. EMSO: A new environment for modelling, simulation and optimisation. *Computer Aided Chemical Engineering*, v. 14, n. C, p. 947-952, 2003.

SOMASHEKARA, D. M.; K.RASTOGI, N.; RAMACHANDRIAH, S. T. A simple kinetic model for growth and biosynthesis of polyhydroxyalkanoate in *Bacillus flexus*. *New Biotechnology*, v. 26, n. 1-2, p. 92-98, 2009.

SONNLEITNER, B.; HEINZLE, E.; BRAUNEGG, G.; LAFFERTY, R. M. Formal kinetics of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) production in *Alcaligenes eutrophus* H 16 and *Mycoplana rubra* R 14 with respect to the dissolved oxygen tension in ammonium-limited batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 7, n. 1, p. 1-10, 1979.

STEINBÜCHEL, A. Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. *Macromolecular Bioscience*, v. 1, n. 1, p. 1-24, 2001.

WIECHERT, W. Modeling and simulation: tools for metabolic engineering. *Journal of Biotechnology*, v. 94, n. 1, p. 37-63, 2002.

YOO, S.; KIM, W.-S. Cybernetic model for synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 43, n. 11, p. 1043-1051, 1994.

Capítulo 5

Artigo 3 - Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*

Este artigo será submetido para publicação em periódico internacional – qualis A1.

Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of Poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*

Débora Jung Luvizetto Faccin¹, Rosane Rech², Argimiro Resende Secchi³, Nilo Sérgio Medeiros Cardozo¹, Marco Antônio Záchia Ayub^{2*}

¹Chemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ²Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul.

³COPPE-Chemical Engineering Program, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Abstract

Poly(3-hydroxybutyrate) – P(3HB) – is a natural biodegradable polyester synthesized by several bacteria, produced from renewable resources. The effects of oxygen transfer rate on the intracellular accumulation of P(3HB) was evaluated, aiming at increasing P(3HB) synthesized by *Bacillus megaterium* in bioreactor batch cultures. Bench-scale bioreactor cultivations were performed under different volumetric oxygen mass transfer coefficients, kLa, setting stirrer speed on specified values. The results of this work show that oxygen transfer is a key factor on P(3HB) accumulation by *B. megaterium*. The highest P(3HB) mass fraction (62 % of CDW) was achieved at kLa condition of 0.006 s⁻¹

Keywords: biopolymers; poly(3-hydroxybutyrate); *Bacillus megaterium*;

*Correspondence to: Correspondence to: Marco Antônio Záchia Ayub, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul State, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: mazayub@ufrgs.br

5.1 Introduction

Poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB)) is the most important and well characterized biopolymer belonging to polyhydroxyalkanoates (LEE, 1996b; KESHAVARZ and ROY, 2010). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters synthesized by microorganisms and accumulated in the cell cytoplasm as water insoluble granules in order to store carbon and energy (DAWES and SENIOR, 1973; ANDERSON and DAWES, 1990; LEE, 1996b; SUDESH *et al.*, 2000). Biodegradability, biocompatibility, possibility of production from renewable carbon resources derived from agriculture or industrial wastes, and the fact of presenting properties similar to those observed in some petrochemical polymers are the main reasons for the growing interest in PHAs, its production and industrial applications (LEE, 1996a; BRAUNEGG *et al.*, 1998; REDDY *et al.*, 2003; SOLAIMAN *et al.*, 2006; KESHAVARZ and ROY, 2010).

Many bacteria, both Gram-positive and Gram-negative, are able to synthesize PHAs, but so far most of the industrial scale PHA production is done by Gram-negative bacteria such as *Wautersia eutropha*, *Pseudomonas oleovorans*, and recombinant strains of *Escherichia coli* (VALAPPIL,BOCCACCINI *et al.*, 2007). However, the production using Gram-negative bacteria can be disadvantageous for biomedical applications because they possess lipopolysaccharides (LPS), which can be extracted together with PHA in a purification step. LPS act as endotoxins and can cause immunological reactions (PHILIP *et al.*, 2007; VALAPPIL,BOCCACCINI *et al.*, 2007). Among Gram-positive bacteria lacking such endotoxins, *Bacillus* strains have some interesting characteristics to be used in industrial scale production. This bacterium presents fast growth, can metabolize several substrates, and can also tolerate high osmotic pressures and high temperatures (GOUDA *et al.*, 2001; OMAR *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2001; TAJIMA *et al.*, 2003; FULL *et al.*, 2006; VALAPPIL,BOCCACCINI *et al.*, 2007; VALAPPIL,PEIRIS *et al.*, 2007; VIJAYENDRA *et al.*, 2007; REDDY *et al.*, 2009; PANDIAN *et al.*, 2010). Several carbon sources have been used as substrates for *Bacillus* sp. in the accumulation of short chain length polyhydroxyalkanoate, including arabinose, xylose, glucose, galactose, fructose, sucrose, maltose, cellobiose, glycerol, and mannitol (PRABHU *et al.*, 2010). Notwithstanding these advantages, the relatively low productivity of P(3HB) obtained in cultures of *Bacillus* is still a limiting aspect for its industrial application (WU *et al.*, 2001). Reports on the literature show the limitations of P(3HB) production by *Bacillus* strains under commonly applied culture conditions such as excess of carbon with nutrient limitation (nitrogen and phosphor), or low oxygen supply, which can induce cell sporulation, leading to P(3HB) consumption (OMAR *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2001; FACCIN *et al.*, 2009; LÓPEZ *et al.*, 2012).

One condition of special importance reported to affect the production of P(3HB) by *Bacillus* is the level of oxygen supply. In a previous work Faccin *et al.* (2009) this influence was observed based on the significantly higher P(3HB) production obtained in shaker scale when comparing results obtained in shaker and bioreactor cultures. Since the main difference between the two processes is in the oxygen supply, which is lower in shaker, those results suggested that some level of oxygen limitation is required for achieving high levels of P(3HB) production. However, the use of low oxygen supply must be carefully controlled because *B.*

megaterium is a strict aerobe (HAWTHORNE and BRUSILOW, 1986; PRIEST *et al.*, 1988; FULL *et al.*, 2006).

The oxygen supply can play an important role in the scale-up and economy of aerobic biosynthesis systems (GALACTION *et al.*, 2004; BANDAIPHET and PRASERTSAN, 2006). The volumetric oxygen mass transfer coefficient (k_La) is an important parameter, since it is related to the oxygen transfer rate (OTR) and is commonly applied as a criteria for scale-up (FLORES *et al.*, 1997; ÖZBEK and GAYIK, 2001; SHUKLA *et al.*, 2001; GALACTION *et al.*, 2004; BANDAIPHET and PRASERTSAN, 2006; GARCIA-OCHOA and GOMEZ, 2009).

In this context, the aims of this research were to clarify the influence of oxygen supply of bioreactor cultures on the biomass production and P(3HB) synthesis by *B. megaterium*, through the comparison of cultures performed under different k_La , obtained by variation of stirrer speed.

5.2 Materials and Methods

Microorganism and culture media

Bacillus megaterium DSM 32^T was used in this study. The strain was preserved as frozen samples in mineral medium, with a volume fraction of 20 % glycerol. Cultures were activated by 2 subsequent pre-cultures (18 h and 5 h) before cultivation. Culture mineral salts medium had the following composition (WANG and LEE, 1997): KH_2PO_4 1.5 g·L⁻¹; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 9 g·L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g·L⁻¹; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g·L⁻¹; citric acid, 0.1 g·L⁻¹, supplemented with 1mL of trace elements solution ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g·L⁻¹; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g·L⁻¹; H_3BO_4 , 0.3 g·L⁻¹; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g·L⁻¹; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g·L⁻¹ (NH_4)₆Mo₇O₂₄·H₂O, 0.03 g·L⁻¹; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g·L⁻¹; $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g·L⁻¹). Sucrose (16 g·L⁻¹) and ammonium sulphate (2 g·L⁻¹) were supplemented as carbon and nitrogen sources, respectively (FACCIN *et al.*, 2009).

Bench-scale bioreactor culture

Bench-scale bioreactor cultivations were performed in a 5 L vessel Biostat B (Braun Biotech) with 4 L of culture medium and 80 mL of a pre-culture inoculum. Temperature was kept at 30 °C and initial pH was adjusted at 7.0. The culture was performed under uncontrolled pH condition. Air was supplied at flow rate of 4 L·min⁻¹. Experiments were performed at least in duplicate, with stirrer speed (N) set at 100 rpm, 200 rpm, 300 rpm, 400 rpm, 500 rpm, and 600 rpm in order to promote different oxygen transfer rates. The instant at which the dissolved oxygen (DO) concentration returned to its saturation value (100 %) was taken as completion of each batch culture.

Analytical procedures

Total biomass (X), measured as cell dry weight (CDW), was evaluated from 10 mL to 60 mL samples of culture. The cell suspension was centrifuged at $2\,500 \times g$ for 20 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, washed with distilled water, transferred to pre-weighed flasks, and dried at $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until constant weight. PHB content was determined by gas chromatography as described by Riis and Mai (1988). About 40 mg of dried biomass powder was suspended in 2 mL of 1,2-dichloroethane, 2 mL of a volume fraction of 1:4 hydrochloric acid-propanol solution and 200 μL of standard solution (4 g of benzoic acid dissolved in 100 mL of propanol), and incubated at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 h. After cooled to room temperature, 4 mL of distilled water was added and the samples were shaken for 30 s. The organic phase was directly analyzed in a GC Perkin Elmer (FID detector, capillary column: PE-WAX 30 m x 0.25 mm, Perkin Elmer). Pure poly(3-hydroxybutyrate) (Aldrich) was used as standard. Residual biomass (R) was estimated by the difference between total biomass and P(3HB) content. Sucrose was analyzed by HPLC Perkin Elmer series 200, using a Rezex-RHM (300 mm x 7.8 mm) column at $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and RI detector. Nitrogen was determined by the phenol-hypochlorite reaction (WEATHERBURN, 1967). The oxygen concentration was measured on line with a polarographic oxygen sensor (InPro 6800/12/320 manufactured by Mettler-Toledo) as the percent saturation of dissolved oxygen (DO). The k_{La} was determined using the dynamic method (SCHIRMER-MICHEL *et al.*, 2009) at 2 h and 4 h of each batch culture. All analytical procedures were done in duplicate.

Statistical analysis

Data are presented as the mean of independent repeats of batch cultures and were analyzed by ANOVA (analyses of variance) and Tukey's test (5 % probability).

5.3 Results

Figure 5.1 shows the volumetric oxygen mass transfer coefficient (k_{La}) as function of stirrer speed (N). The k_{La} increases in the range of stirrer speed studied ($p < 0.0001$) and can be related to this variable according to a power-law function with exponent 1.6.

The kinetics of substrate consumption (sucrose and nitrogen), P(3HB) production and biomass formation (residual and total) along the cultivation, for each k_{La} condition are shown in Figure 5.2. No substrates limitation, both nitrogen and sucrose, was observed along the cultures. Regarding sucrose, it could be observed that half of initial sucrose concentration remained in the medium. The only exception was for k_{La} of 0.006 s^{-1} , that showed large sucrose consumption. The P(3HB) production started at exponential growth phase and continued until the beginning of the stationary phase, suggesting that the P(3HB) production had growth-associated and non-growth associated components. The highest P(3HB) concentration, $3.3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, was attained under k_{La} of 0.006 s^{-1} . The length of exponential growth

phase decreased with k_{La} decreasing, probably due the limitation of the growth under low oxygen supply, since *B. megaterium* is an obligate aerobe.

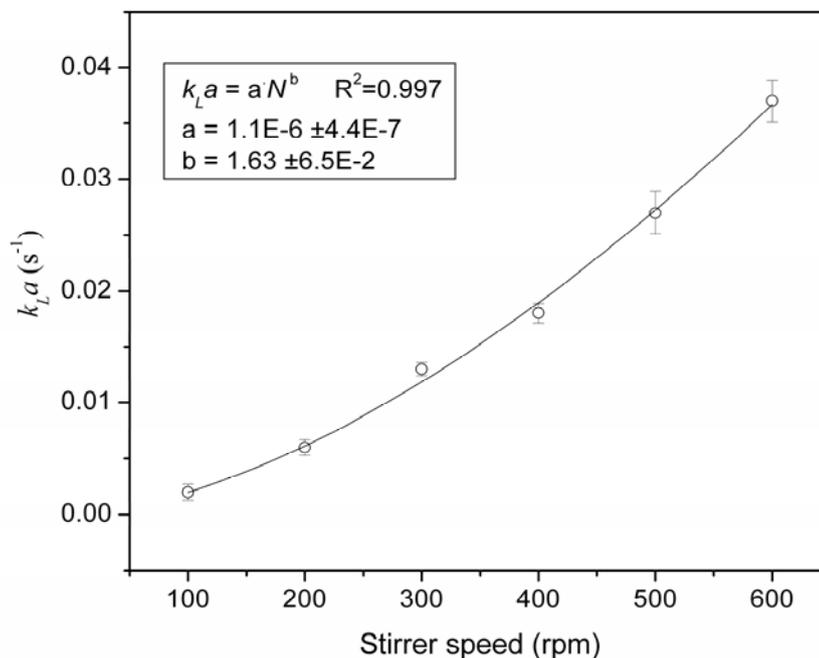


Figure 5.1: Estimated values and standard deviation of volumetric coefficients of oxygen transfer (k_{La}) as a function of stirrer speed.

The evolution of the P(3HB) mass fraction attained in the cultures with different k_{La} values are presented in Figure 5.3, while the statistical analyses of the culture parameters are presented in Table 5.1. It could be observed a strong effect of k_{La} on P(3HB) cell content ($p = 0.0003$). The highest P(3HB) mass fraction (62 % of CDW) was achieved for k_{La} of $0.006 s^{-1}$. Intermediate values of the P(3HB) mass fraction were obtained for k_{La} of $0.002 s^{-1}$ and $0.013 s^{-1}$, with no significant difference between the values obtained at these two conditions. Increase of k_{La} above $0.013 s^{-1}$ led to additional decrease of the P(3HB) mass fraction, with an apparent limiting value of this variable being achieved, since no significant difference was observed for the remaining values of k_{La} ($0.018 s^{-1}$, $0.027 s^{-1}$, and $0.037 s^{-1}$). At the lowest value of k_{La} ($0.002 s^{-1}$) the accumulation of polymer followed a slow but constant kinetics, while for higher values, above $0.013 s^{-1}$, the accumulation was fast but followed by the loss of P(3HB) in the final stages of culture, probably due to cell disruption or endogenous consumption.

The statistical analyses show that k_{La} had a significant effect on P(3HB) yield on sucrose ($p = 0.0008$) and P(3HB) productivity ($p = 0.0098$), but not on biomass yield on sucrose ($p = 0.11$). The lowest P(3HB) productivity ($P_{P(3HB)}$) was attained at the lowest k_{La} value ($0.002 s^{-1}$), where P(3HB) production was slower, as can be seen in Figure 5.2. All other cultures (k_{La} values from $0.006 s^{-1}$ up to $0.037 s^{-1}$) presented productivity around $0.16 g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$, with no significant difference among them, but significantly higher than the value obtained at the k_{La} of $0.002 s^{-1}$. The highest P(3HB) yield ($Y_{P(3HB)/S}$), $0.32 g \cdot g^{-1}$, was obtained at k_{La} of $0.006 s^{-1}$ and there was no significant difference among the values of $Y_{P(3HB)/S}$ obtained for the other k_{La} tested. However, the residual biomass yields on sucrose ($Y_{R/S}$) were not affected by the k_{La} condition.

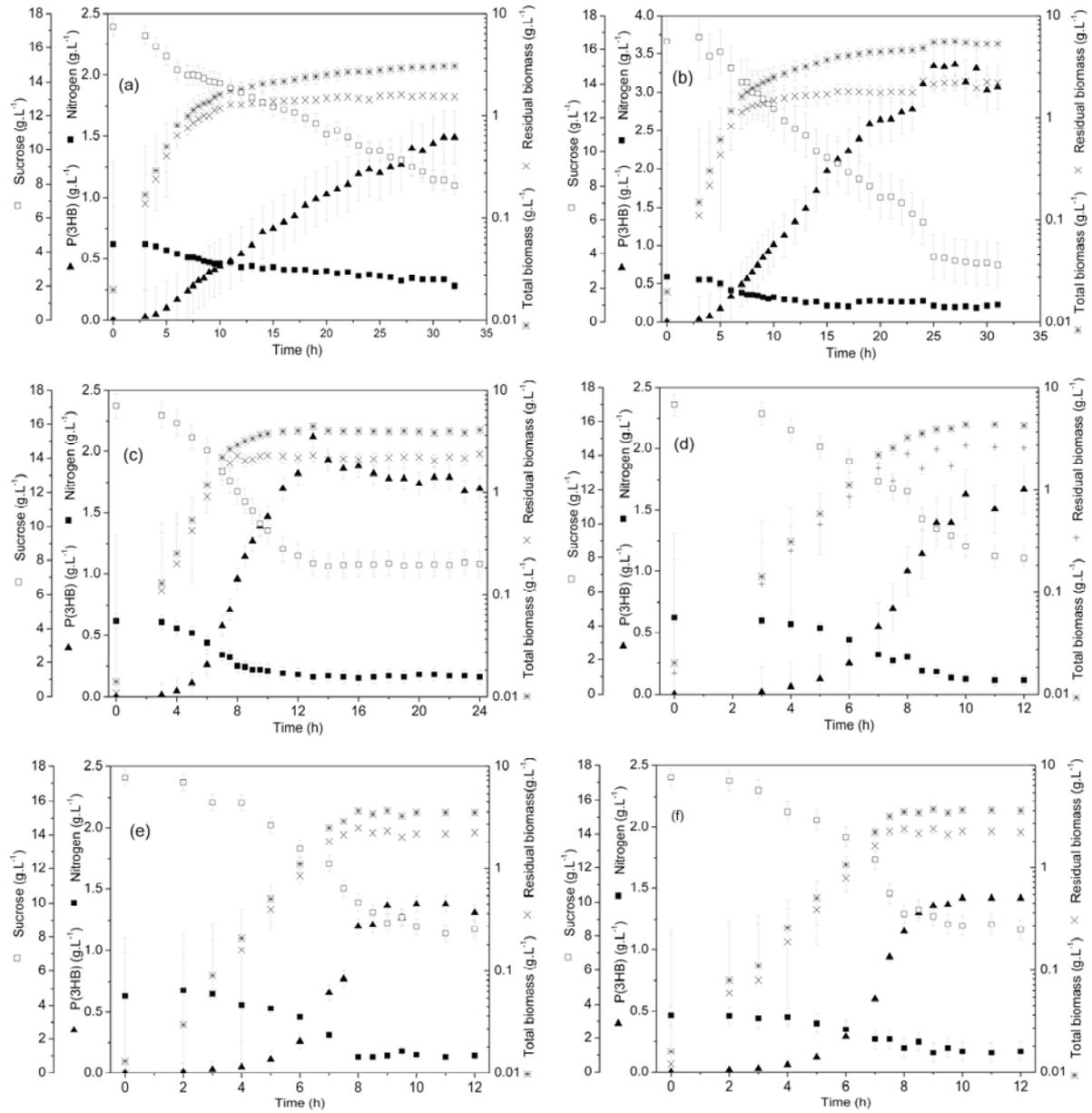


Figure 5.2: Time course of total and residual biomass, biopolymer concentration, sucrose concentration and nitrogen concentration in the culture with k_{La} of (a) 0.002 s^{-1} , (b) 0.006 s^{-1} , (c) 0.013 s^{-1} , (d) 0.016 s^{-1} , (e) 0.027 s^{-1} e (f) 0.037 s^{-1} .

Table 5.1: The effect of k_{La} on P(3HB) mass fraction, P(3HB) productivity ($P_{P(3HB)}$), P(3HB) yield ($Y_{P(3HB)/S}$) and residual biomass yield ($Y_{R/S}$).

k_{La} [s^{-1}]	P(3HB) [% of CDW]	$P_{P(3HB)}$ [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]	$Y_{P(3HB)/S}$ [$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	$Y_{R/S}$ [$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]
0.002	$49^b \pm 5.6$	$0.05^a \pm 0.017$	$0.18^a \pm 0.046$	$0.23^a \pm 0.050$
0.006	$62^a \pm 1.5$	$0.14^b \pm 0.029$	$0.32^b \pm 0.004$	$0.21^a \pm 0.011$
0.013	$49^b \pm 1.4$	$0.16^b \pm 0.019$	$0.21^a \pm 0.014$	$0.25^a \pm 0.005$
0.018	$40^c \pm 1.2$	$0.17^b \pm 0.032$	$0.20^a \pm 0.005$	$0.28^a \pm 0.017$
0.027	$39^c \pm 1.4$	$0.16^b \pm 0.013$	$0.17^a \pm 0.011$	$0.31^a \pm 0.043$
0.037	$39^c \pm 2.7$	$0.15^b \pm 0.001$	$0.17^a \pm 0.012$	$0.28^a \pm 0.015$

Data are the mean from independent repeats. Means with different superscript letters (a–c) at same column are significantly different at the $p \leq 0.05$ level (Tukey test).

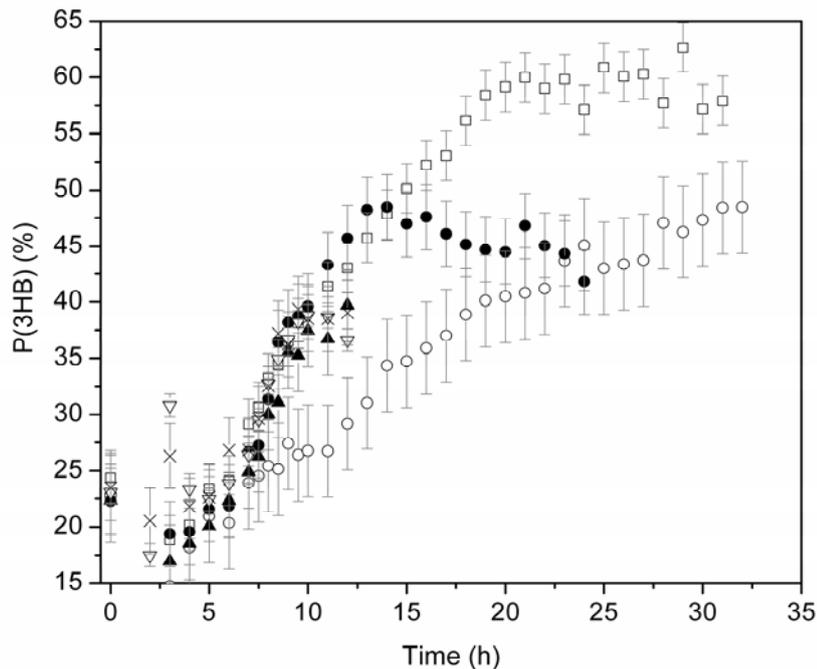


Figure 5.3: Time course of P(3HB) content, mass fraction of CDW, in batch cultures with k_La of (○) 0.002 s^{-1} , (□) 0.006 s^{-1} , (●) 0.013 s^{-1} , (▲) 0.018 s^{-1} , (▽) 0.027 s^{-1} and (×) 0.037 s^{-1} .

Figure 5.4 shows the behavior of dissolved oxygen (DO) concentration along the cultivations for different k_La values. It can be observed that the decrease in the available dissolved oxygen starts earlier for smaller k_La while the return to air saturation starts earlier for higher k_La . For smaller k_La values, zero dissolved oxygen concentration was reached, meaning that cells promptly consumed all oxygen supplied to the bioreactor.

In Table 5.2 are presented the results for the specific growth rate for total (μ_X) and residual biomass (μ_R) during exponential phase of cultures. At the lowest k_La (0.002 s^{-1}) both μ_X and μ_R were significantly lower ($p < 0.0001$) than the other values.

Table 5.2: Values of specific growth rate for total (μ_X) and residual (μ_R) biomass for experiments performed at different k_La .

k_La [s^{-1}]	μ_X [h^{-1}]	μ_R [h^{-1}]
0.002	$0.51^a \pm 0.021$	$0.50^a \pm 0.030$
0.006	$0.71^b \pm 0.031$	$0.66^b \pm 0.034$
0.013	$0.72^b \pm 0.006$	$0.72^b \pm 0.007$
0.018	$0.67^b \pm 0.032$	$0.66^b \pm 0.028$
0.027	$0.76^b \pm 0.003$	$0.73^b \pm 0.017$
0.037	$0.70^b \pm 0.060$	$0.68^b \pm 0.056$

Data are the mean from independent repeats. Means with different superscript letters (a–b) at same column are significantly different at the $p \leq 0.05$ level (Tukey Test).

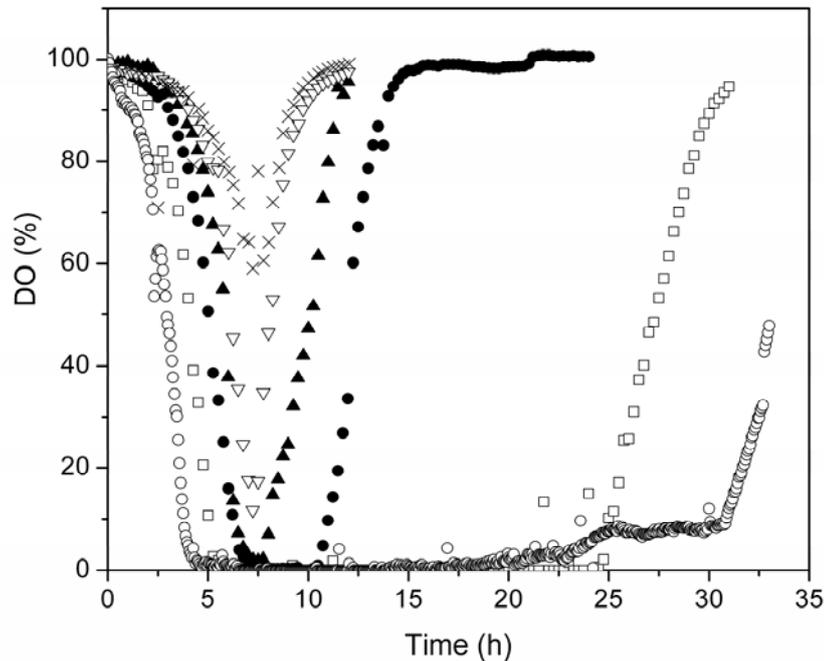


Figure 5.4: Time course of dissolved oxygen, DO, in batch cultures with k_{La} of (○) 0.002 s^{-1} , (□) 0.006 s^{-1} , (●) 0.013 s^{-1} , (▲) 0.018 s^{-1} , (▽) 0.027 s^{-1} and (×) 0.037 s^{-1} .

5.4 Discussion

The high value of R^2 and the low standard deviation obtained for the power-law index b (4 % of the estimated parameter), shown in Figure 1, indicate that this model describes adequately the correlation between k_{La} and the stirrer speed. A power-law dependence of the k_{La} on stirrer speed has also been reported by Garcia-Ochoa et al. (2000) in the production of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*, with exponent around 2.0.

The results presented in the previous section show a clear dependence of the parameters usually employed to quantify P(3HB) production (mass fraction, productivity and yield) on k_{La} . Although the importance of the available oxygen in the P(3HB) production has already been addressed in other works, the results reported in the literature on this subject are somewhat contradictory. In the study of *B. megaterium* growth in batch culture at 30 °C and pH 7.0 and using molasses cane as carbon source, Kulpreecha et al. (2009) reported higher P(3HB) production at higher oxygen supply, i.e., an inverse behavior regarding the results of the present work. The authors have obtained mass fractions 47 % CDW at 40 % DO saturation and around 60 % of CDW at 60 % and 80 % DO saturation. On the other hand, Philip et al. (2009) investigated the effect of stirrer speed on P(3HB) production by *Bacillus cereus* SPV in batch culture at 30 °C using glucose as carbon source and no pH control. The P(3HB) content was higher at 125 rpm stirrer speed, with a maximal P(3HB) production of a mass fraction of 34 % of CDW, decreasing to any higher stirrer speed. López et al. (2012) also reported a high P(3HB) mass fraction, around 60 % (CDW), under conditions of low oxygen supply (DO at 20 % of air saturation) in batch cultures of *B. megaterium* using

glucose as carbon source, although this was the only condition tested in their work. The higher P(3HB) production by *B. megaterium* at low oxygen supply has also been indirectly observed in a previous work of our group (FACCIN *et al.*, 2009), comparing the results of shaker scale culture and 4 L batch bioreactor cultivation and taking into consideration that the main difference between the two processes relies on the oxygen supply, which is lower in shaker. P(3HB) mass fractions of 70 % (CDW) and 34 % were attained in shaker and in bioreactor cultivations, respectively, both without pH control. Therefore, the results these three last mentioned works are in qualitative agreement with those presented in the previous section.

In order to find additional support to the results related to the dependence of the P(3HB) production on the oxygen supply, it is important to consider the biochemical pathway of P(3HB) formation by *B. megaterium*. It is well known that acetyl coenzyme A (Acetyl-CoA) is an important intermediate in P(3HB) pathway synthesis, being the precursor of the monomer (R)- 3-hydroxybutyryl coenzyme A (3HB-CoA). However, Acetyl-CoA is also a key compound in the cell metabolism, and it is oxidized via tricarboxylic acid cycle (TCA cycle), being either dissimilated to generate biologically useful energy or assimilated for cell growth. Consequently, P(3HB) pathway synthesis concurs with the TCA cycle for assimilation of acetyl-CoA (BABEL *et al.*, 2001; KIM and GADD, 2008). The oxidation via TCA cycle predominates under balanced growth conditions, with NADH being generated and used in biosynthesis or energy generation. When biosynthesis decreases due to lack of a nutrient, the TCA cycle activity decreases due to the high NADH concentration, resulting in decrease of acetyl-CoA oxidation via TCA cycle. Additionally, since the TCA cycle is endergonic in the absence of oxygen (BABEL *et al.*, 2001). under limitation of oxygen the reducing power (e.g, NADPH) generated are not oxidized via electron transport phosphorylation. Therefore, low oxygen supply can reduce the TCA cycle activity, due to both thermodynamic reasons and metabolic control by reducing power, and allow that part of the acetyl-CoA available can be shifted to P(3HB) pathway (DAWES and SENIOR, 1973; FLICKINGER and DREW, 1999; BABEL *et al.*, 2001; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Another important aspect to be considered is the fact that *B. megaterium* is a strict aerobe (HAWTHORNE and BRUSILOW, 1986; PRIEST *et al.*, 1988; FULL *et al.*, 2006) and endospore-forming bacterium (SLEPECKY and LAW, 1961; FLICKINGER and DREW, 1999; WU *et al.*, 2001). From this point of view, the use of extremely low oxygen supply can affect negatively both cell growth and P(3HB) production, by inducing sporulation. Slepecky and Law (1961) studied the synthesis and degradation of P(3HB) by *B. megaterium* cultures, showing that the endogenous consumption of P(3HB) can serve as energy source for the sporulation process. Wu *et al.* (2001) observed spore septa formation and low P(3HB) production at low oxygen supply (DO maintained at 10 % for the first 17 h and afterwards DO was kept in 5 %) in fed-batch culture of *Bacillus* sp performed at 35 °C and pH maintained at 7.

On the light of the different aspects discussed in the two later paragraphs, the existence of an optimal oxygen supply condition (around k_La of 0.006 s^{-1}) pointed out by the results found in the present work is theoretically consistent. Oxygen transfer rates higher than the optimal value would increase the TCA cycle activity and limit P(3HB) synthesis, while

lower rates would also lead to reduction in P(3HB) production due to either strong deceleration of the bacteria metabolism or sporulation.

Regarding the P(3HB) yield on sucrose and P(3HB) productivity the highest values ($0.32 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ and $0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectively) were also attained in the batch culture performed at k_{La} of 0.006 s^{-1} which indicates that the optimal oxygen supply condition is actually around this value of transfer rate. However, the productivity attained still is low for industrial applications and additional studies focused in the development of adequate strategies to increase this parameter are required.

Finally, it is important to remark that the volumetric oxygen mass transfer coefficient (k_{La}) was used as basis of analysis for all the results reported in the present work about the dependence of the different P(3HB) production parameters on the oxygen supply, differently from most works available in the literature, in which the stirrer speed is the reference parameter. Therefore, these results are expected to be more easily extended to other scales of production, since k_{La} is an important factor in scale-up of aerobic bioprocesses (FLORES *et al.*, 1997; ÖZBEK and GAYIK, 2001; SHUKLA *et al.*, 2001; GALACTION *et al.*, 2004; BANDAIPHET and PRASERTSAN, 2006; GARCIA-OCHOA and GOMEZ, 2009).

5.5 Conclusions

The results obtained with experiments performed under different volumetric oxygen mass transfer coefficient, k_{La} , showed the importance of oxygen transfer rate on the P(3HB) production by *B. megaterium*. The existence of an optimal condition of oxygen availability was identified in terms of value of k_{La} , allowing the extension of the results for other scales of production. The highest P(3HB) productivity achieved was still low for industrial applications and additional studies are required to improve this parameter.

5.6 Acknowledgements

The authors wish to thank FAPERGS and CAPES for the financial support.

5.7 References

- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 54, n. 4, p. 450-472, 1990.
- BABEL, W.; ACKERMANN, J.-U.; BREUER, U.; STEINBÜCHEL, A. Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB)Biopolyesters: Springer Berlin / Heidelberg, 2001. p. 125-157. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology).

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

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, v. 65, n. 2-3, p. 127-161, 1998.

DAWES, E. A.; SENIOR, P. J. The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology*: Academic Press, 1973. p. 135-266.

FACCIN, D. J. L.; MARTINS, I.; CARDOZO, N. S. M.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z.; ALVES, T. L. M.; GAMBETTA, R.; SECCHI, A. R. Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 84, n. 12, p. 1756-1761, 2009.

FLICKINGER, M. C.; DREW, S. W. *The encyclopedia of bioprocess technology : fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. New York: John Wiley & Sons, 1999.

FLORES, E. R.; PÉREZ, F.; DE LA TORRE, M. Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 83, n. 6, p. 561-564, 1997.

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

GALACTION, A. I.; CASCAVAL, D.; ONISCU, C.; TURNEA, M. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochemical Engineering Journal*, v. 20, n. 1, p. 85-94, 2004.

GARCIA-OCHOA, F.; CASTRO, E. G. M.; SANTOS, V. E. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, n. 9, p. 680-690, 2000.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 2, p. 153-176, 2009.

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

HAWTHORNE, C. A.; BRUSILOW, W. S. Complementation of mutants in the *Escherichia coli* proton-translocating ATPase by cloned DNA from *Bacillus megaterium*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 261, n. 12, p. 5245-5248, 1986.

KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, v. 13, n. 3, p. 321-326, 2010.

KIM, B. H.; GADD, G. M. *Bacterial physiology and metabolism*. Cambridge University Press, 2008.

KULPREECHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N. 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. 240-245, 2009.

- LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, n. 1, p. 1-14, 1996a.
- LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, v. 14, n. 11, p. 431-438, 1996b.
- LÓPEZ, J.; NARANJO, J.; HIGUITA, J.; CUBITTO, M.; CARDONA, C.; VILLAR, M. Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 17, n. 2, p. 250-258, 2012.
- OMAR, S.; RAYES, A.; EQAAB, A.; VOß, I.; STEINBÜCHEL, A. 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.
- ÖZBEK, B.; GAYIK, S. The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 8-9, p. 729-741, 2001.
- PANDIAN, S. R.; DEEPAK, V.; KALISHWARALAL, K.; RAMESHKUMAR, N.; JEYARAJ, M.; GURUNATHAN, S. 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. 705-711, 2010.
- PHILIP, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 82, n. 3, p. 233-247, 2007.
- PHILIP, S.; SENGUPTA, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Effect of impeller speed and pH on the production of Poly(3-hydroxybutyrate) using *Bacillus cereus* SPV. *Biomacromolecules*, v. 10, n. 4, p. 691-699, 2009.
- PRABHU, N. N.; SANTIMANO, M. C.; MAVINKURVE, S.; BHOSLE, S. N.; GARG, S. Native granule associated short chain length polyhydroxyalkanoate synthase from a marine derived *Bacillus* sp NQ-11/A2. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 97, n. 1, p. 41-50, 2010.
- PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M.; TODD, C. A Numerical Classification of the Genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology*, v. 134, n. 7, p. 1847-1882, 1988.
- REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, v. 87, n. 2, p. 137-146, 2003.
- REDDY, S. V.; THIRUMALA, M.; MAHMOOD, S. Production of PHB and P (3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, n. 3, p. 391-397, 2009.
- RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography A*, v. 445, p. 285-289, 1988.
- SCHIRMER-MICHEL, Â. C.; FLÔRES, S. H.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Effect of oxygen transfer rates on alcohols production by *Candida guilliermondii* cultivated on soybean hull hydrolysate. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 84, n. 2, p. 223-228, 2009.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial – Engenharia Bioquímica*. São Paulo, Brasil: Edgard Blucher, 2001.

SHUKLA, V. B.; PARASU VEERA, U.; KULKARNI, P. R.; PANDIT, A. B. Scale-up of biotransformation process in stirred tank reactor using dual impeller bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 8, n. 1, p. 19-29, 2001.

SLEPECKY, R. A.; LAW, J. H. Synthesis and degradation of poly- β -hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.*, v. 82, n. 1, p. 37-42, 1961.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 71, n. 6, p. 783-789, 2006.

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

TAJIMA, K.; IGARI, T.; NISHIMURA, D.; NAKAMURA, M.; SATOH, Y.; MUNEKATA, M. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. INT005 accumulating polyhydroxyalkanoate (PHA) from gas field soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 95, n. 1, p. 77-81, 2003.

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

VALAPPIL, S. P.; PEIRIS, D.; LANGLEY, G. J.; HEMIMAN, J. M.; BOCCACCINI, A. R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. *Journal of Biotechnology*, v. 127, n. 3, p. 475-487, 2007.

VIJAYENDRA, S.; RASTOGI, N.; SHAMALA, T.; ANIL KUMAR, P.; KSHAMA, L.; JOSHI, G. Optimization of polyhydroxybutyrate production by *Bacillus* sp. CFR 256 with corn steep liquor as a nitrogen source. *Indian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 2, p. 170-175, 2007.

WANG, F. L.; 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. 3703-3706, 1997.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, v. 39, n. 8, p. 971-974, 1967.

WU, Q.; HUANG, H.; HU, G.; CHEN, J.; HO, K. P.; CHEN, G.-Q. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 80, n. 2, p. 111-118, 2001.

Capítulo 6

Artigo 4 - Avaliação da influência da fonte de nitrogênio e carbono na produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium*

Este trabalho foi publicado nos Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM 2011.

Avaliação da influência da fonte de nitrogênio e carbono na produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium*

Débora Jung Luvizetto Faccin¹, Allan Morcelli¹, Rosane Rech², Argimiro Resende Secchi³, Marco Antônio Záchia Ayub² e Nilo Sérgio Medeiros Cardozo¹

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Departamento de Engenharia Química, R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - Brasil, E-mail: [debora, allan_vm, nilo]@enq.ufrgs.br

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA); Porto Alegre - RS - Brasil, E-mail: [rrech, mazyub]@ufrgs.br

³Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE/ UFRJ) - Programa de Engenharia Química, Rio de Janeiro - RJ - Brasil, E-mail: arge@peq.coppe.ufrj.br.

Resumo

O poli(3-hidroxi-butilato) ou P(3HB) é um poliéster biodegradável produzido por diversos micro-organismos para armazenamento de carbono e energia. Este biopolímero possui propriedades similares a polímeros petroquímicos possuindo um grande potencial de aplicação, especialmente na área de embalagens e área médica. Com o objetivo de aumentar a produção deste biopolímero foram realizados ensaios para verificar a influência da fonte de nitrogênio na produção de biomassa e P(3HB) utilizando-se a bactéria *Bacillus megaterium* crescendo em meio mineral com sacarose ou glicerol como fontes de carbono. Foram realizados ensaios com 5 fontes de nitrogênio diferentes: cloreto de amônio, citrato de amônio, sulfato de amônio, fosfato de amônio e nitrato de amônio. Com relação à fonte de carbono, sacarose se mostrou mais adequada que glicerol. Com relação à fonte de nitrogênio, cloreto de amônio é melhor quando utilizado glicerol como fonte de carbono, enquanto que sulfato de amônio aumenta a produção com sacarose.

Palavras-chave: Biopolímero, poli(3-hidroxi-butilato), *B. megaterium*.

6.1 Introdução

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres sintetizados por inúmeros micro-organismos e são armazenados em corpos de inclusões insolúveis no citosol com objetivo de reserva de carbono e energia (DAWES e SENIOR, 1973; 1990; SUDESH *et al.*, 2000).

O crescente interesse nos PHAs é justificado por serem polímeros biodegradáveis que possuem propriedades similares aos polímeros petroquímicos, podendo ter características de termoplásticos ou elastômeros dependendo das condições de cultivo e do micro-organismo utilizado. Além disso, estes são obtidos a partir de fontes renováveis provenientes da agricultura e até mesmo de resíduos industriais (LEE, 1996a; KESHAVARZ e ROY, 2010). O poli(3-hidroxi-butirato) ou (P(3HB)) é o mais difundido e melhor caracterizado membro dos PHAs. Este biopolímero foi descoberto em 1926 em experimentos com a bactéria *Bacillus megaterium*.

Linhagens de *Bacillus* possuem algumas características interessantes para aplicações industriais, tais como rápido crescimento, metabolização de diversos substratos, tolerância a temperaturas mais altas e a alta pressão osmótica, sendo difícil ocorrer contaminação durante o cultivo. No entanto, nas linhagens de *Bacillus* o acúmulo máximo deste biopolímero ocorre próximo a esporulação onde é consumido parte do P(3HB) para realizar este processo (GOUDA *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2001; FULL *et al.*, 2006; VALAPPIL *et al.*, 2007).

A bactéria *B. megaterium* apresenta comportamento diferente de outras comumente empregadas na produção de P(3HB), como por exemplo, produção associada ao crescimento (MCCOOL *et al.*, 1996; FACCIN *et al.*, 2009).

Neste trabalho, estuda-se a influência da fonte de nitrogênio na produção de polímero e biomassa em duas fontes de carbono diferentes com o objetivo de aumentar a produção de P(3HB) por *B. megaterium*. Sacarose, por ser um açúcar relativamente abundante no Brasil, e glicerol, por ser um resíduo da produção de biodiesel, ambos metabolizados pela *Bacillus megaterium*, foram as fontes de carbono utilizadas.

6.2 Material e Métodos

Micro-organismo e meio de cultura

Para a produção de P(3HB) intracelular utilizou-se a bactéria Gram-positiva *Bacillus megaterium* DSM 32^T. O meio de cultivo empregado nos experimentos foi o meio mineral descrito em Wang e Lee (1997). Sacarose ou glicerol foram utilizados, separadamente, como fonte de carbono, porém cabe ressaltar que o inóculo foi feito usando somente sacarose como fonte de carbono. Testou-se 5 fontes de nitrogênio para cada fonte de carbono utilizada. Todos os experimentos foram feitos em duplicata. Os sais de amônio testados foram: cloreto

de amônio, citrato de amônio, sulfato de amônio, fosfato de amônio e nitrato de amônio. A Tabela 6.1 mostra as quantidades das fontes de nitrogênio (FN) e carbono (FC) utilizadas em cada ensaio.

Tabela 6.1: Concentração de nutrientes utilizados em cada ensaio.

Fontes de Carbono (FC)	Concentração (g·L ⁻¹)
Sacarose	16,0
Glicerol	17,2
Fontes de Nitrogênio (FN)	Concentração (g·L ⁻¹)
Cloreto de amônio	1,6
Citrato de amônio	3,4
Sulfato de amônio	2,0
Fosfato de amônio	2,0
Nitrato de amônio	2,4

As concentrações das fontes de nitrogênio e carbono foram calculadas a fim de manter o mesmo número de moles iniciais de amônio e carbono, respectivamente, entre os testes realizados. Em trabalho anterior foi verificado a razão carbono/nitrogênio mais adequada para a produção deste biopolímero pela *B. megaterium*, melhor resultado foi obtido com C:N igual a 8 para sulfato de amônio (FACCIN *et al.*, 2009).

Os experimentos foram realizados em estufa incubadora rotatória, com temperatura e agitação controlados em 30°C e 180 rpm, respectivamente. Os dados de biomassa e acúmulo de polímero apresentados foram obtidos no tempo de 20 horas de cultivo. Este tempo foi escolhido, pois em estudos anteriores obteve-se maior acúmulo de P(3HB). Cabe ressaltar que nestes estudos realizados foi utilizada apenas sacarose como fonte de carbono, (FACCIN *et al.*, 2009).

Métodos analíticos

A determinação da biomassa total foi realizada por medidas gravimétricas (massa seca). Amostras (10 mL) em duplicata foram coletadas dos cultivos, centrifugadas, lavadas e colocadas em estufa a 80 °C até atingirem massa constante.

A quantidade de P(3HB) foi obtida através do método de propanólise, segundo Riis e Mai (1988). A análise foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso Perkin Elmer com detector de ionização de chama e coluna capilar PE-WAX 60 m x 0,25 mm. O percentual de acúmulo de P(3HB) é definido pela razão da concentração de P(3HB) pela concentração de biomassa (peso seco), expresso em percentual (LEE, 1996b).

Com os dados experimentais obtidos realizou-se análise da variância e o Teste de Tukey, ambos com 5 % de significância.

6.3 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos utilizando o glicerol como fonte de carbono são apresentados nas Tabelas 6.2 – 6.4. O Crescimento celular não apresentou diferença significativa, em nível de 5 % ($p = 0,062$), nos cultivos com as fontes de nitrogênio testadas. A concentração média de biomassa obtida juntamente com o desvio padrão são apresentados na Tabela 6.2.

Tabela 6.2: Concentração média de biomassa obtida em 20 horas de cultivo utilizando glicerol como fonte de carbono.

FC e FN	Biomassa média ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Glicerol e Cloreto	2,71±0,195
Glicerol e Sulfato	2,47±0,027
Glicerol e Nitrato	2,44±0,026
Glicerol e Citrato	2,37±0,152
Glicerol e Fosfato	2,24±0,025

Na Tabela 6.3 estão apresentadas as concentrações médias de polímero, juntamente com o desvio padrão, obtidos nos cultivos com glicerol com as diferentes fontes de nitrogênio testadas.

Tabela 6.3: Concentração média de P(3HB) obtida em 20 horas de cultivo utilizando glicerol como fonte de carbono.

FC e FN	P(3HB) médio ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Glicerol e Cloreto ^a	0,79±0,053
Glicerol e Citrato ^{ab}	0,74±0,062
Glicerol e Sulfato ^{ab}	0,69±0,010
Glicerol e Nitrato ^{ab}	0,68±0,021
Glicerol e Fosfato ^b	0,61±0,011

A análise de variância das concentrações médias demonstrou diferença significativa ($p = 0,035$). As letras sobrescritas indicam as diferenças entre as médias pela aplicação do Teste de Tukey, sendo que o fato de uma letra aparecer para mais de uma variável denota que não há diferença significativa entre os valores de tais variáveis. Assim, a aplicação do Teste de Tukey mostrou que a média obtida com cultivo em glicerol com fosfato de amônio foi

significativamente diferente à obtida com cloreto de amônio. Contudo, as médias entre cloreto, citrato, sulfato e nitrato de amônio não apresentam diferença significativa, segundo o Teste de Tukey.

O percentual médio de acúmulo do polímero apresentou diferença significativa ($p = 0,001$). O maior acúmulo observado foi para o cultivo utilizando citrato como fonte de nitrogênio (Tabela 6.4), seguido pelos cultivos com cloreto e sulfato que não apresentaram diferenças significativas. Reddy *et al.* (2009) obtiveram 52,32 % de acúmulo utilizando glicerol e sódio amônio fosfato como fonte de nitrogênio em 48 horas de cultivo com *B. megaterium* em estufa incubadora rotatória. Cabe salientar que esse acúmulo de P(3HB) foi obtido com uma fonte de nitrogênio diferente das utilizadas no presente estudo e com tempo de cultivo maior.

Tabela 6.4: Percentual médio de acúmulo de P(3HB) obtido em 20 horas de cultivo utilizando glicerol como fonte de carbono.

FC e FN	Acúmulo médio de P(3HB) (%)
Glicerol e Citrato ^a	31,2±0,62
Glicerol e Cloreto ^b	29,2±0,13
Glicerol e Sulfato ^{bc}	28,1±0,14
Glicerol e Fosfato ^c	27,1±0,79
Glicerol e Nitrato ^c	26,9±0,20

Os resultados para os cultivos com sacarose como fonte de carbono são apresentados nas Tabelas 6.5 - 6.7. Observa-se que tanto a produção de polímero quanto a formação de biomassa obtidas em cultivos com sacarose são muito superiores quando comparadas com as médias obtidas com glicerol como fonte de carbono. No trabalho de Reddy *et al.* (2009) não foi obtida uma grande diferença entre resultados para glicerol e glicose como fonte de carbono, respectivamente, 58,62 % e 52,32 % de acúmulo de biopolímero.

A análise da variância das concentrações médias de biomassa obtidas em diferentes fontes de nitrogênio mostrou que existe diferença significativa ($p = 0,019$). A maior formação de biomassa ocorreu nos cultivos com sulfato e cloreto de amônio como fontes de nitrogênio (Tabela 6.5).

Gouda *et al.* (2001) obtiveram resultados similares, em cultivos utilizando melão de cana como fonte de carbono, sendo que os maiores valores de crescimento celular obtidos também foram com utilização de cloreto e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Omar *et al.* (2001) utilizando xarope de tâmaras como fonte de carbono e diferentes fontes de nitrogênio, obteve maior crescimento celular utilizando nitrato de amônio como fonte de nitrogênio, seguido em sequência por acetato, cloreto e sulfato de amônio. Contudo os dois trabalhos acima citados não apresentam análise estatística para verificação de diferença significativa.

Tabela 6.5: Concentração média de biomassa obtida em 20 horas de cultivo utilizando sacarose como fonte de carbono.

FC e FN	Biomassa média (g·L ⁻¹)
Sacarose e Sulfato ^a	4,69±0,196
Sacarose e Cloreto ^{ab}	4,10±0,119
Sacarose e Fosfato ^b	3,90±0,266
Sacarose e Citrato ^b	3,79±0,184
Sacarose e Nitrato ^b	3,68±0,177

Os resultados de produção de polímero, expressos tanto na forma de concentração como de percentual, também mostraram diferença significativa quando aplicado a Análise de Variância ($p < 0,001$). Cultivos em sacarose contendo sulfato, cloreto e citrato de amônio apresentaram resultados sem diferença significativa para a concentração de polímero obtida e percentual de polímero acumulado (Tabela 6.6 e 6.7, respectivamente). Fosfato e nitrato de amônio não se mostraram fontes favoráveis ao acúmulo de polímero e biomassa.

Tabela 6.6: Concentração média de P(3HB) obtida em 20 horas de cultivo utilizando glicerol como fonte de carbono.

FC e FN	P(3HB) médio (g·L ⁻¹)
Sacarose e Sulfato ^a	2,55±0,073
Sacarose e Cloreto ^a	2,22±0,013
Sacarose e Citrato ^a	2,20±0,242
Sacarose e Fosfato ^b	1,53±0,046
Sacarose e Nitrato ^b	1,09±0,144

Tabela 6.7: Percentual médio de acúmulo de P(3HB) obtido em 20 horas de cultivo utilizando sacarose como fonte de carbono.

FC e FN	Acúmulo médio de P(3HB) (%)
Sacarose e Citrato ^a	57,8±3,60
Sacarose e Sulfato ^a	54,4±0,72
Sacarose e Cloreto ^a	54,3±1,27
Sacarose e Fosfato ^b	39,2±1,50
Sacarose e Nitrato ^c	29,5±2,50

No trabalho de Gouda *et al.* (2001) o maior acúmulo de polímero (38,42 %) pela *B. megaterium* foi obtido com cloreto de amônio como fonte de nitrogênio, quando utilizou melaço de cana de açúcar como fonte de carbono. Omar *et al.* (2001) também apresentaram o melhor resultado de acúmulo de P(3HB), 42%, por *B. megaterium* utilizando xarope de tâmara e cloreto de amônio respectivamente fonte de carbono e nitrogênio. Contudo, nestes dois trabalhos, a utilização de sacarose como fonte de carbono propiciou acúmulos de biopolímero de apenas 5% (Omar *et al.*, 2001) e 3% (Gouda *et al.*, 2001).

6.4 Conclusões

Os resultados mostraram que a utilização da sacarose como fonte de carbono possibilitou maior acúmulo de polímero e maior crescimento celular quando comparado a utilização de glicerol nas condições testadas. Cultivos com glicerol como fonte de carbono apresentaram melhores resultados quando se utilizou citrato ou cloreto de amônio como fonte de nitrogênio. Para cultivos com sacarose como fonte de carbono, o melhor desempenho foi alcançado em cultivos utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, pois possibilitou uma boa formação de biomassa com boa produção de polímero. Para ambas as fontes de carbono utilizadas o fosfato ou nitrato de amônio como fonte de nitrogênio não apresentaram produção de polímero satisfatória. O citrato de amônio apesar de possibilitar um grande acúmulo de polímero não parece ser uma boa fonte de nitrogênio para produção de biomassa.

6.5 Referências Bibliográficas

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 54, n. 4, p. 450-472, 1990.

DAWES, E. A.; SENIOR, P. J. The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology*: Academic Press, 1973. p. 135-266.

FACCIN, D. J. L.; MARTINS, I.; CARDOZO, N. S. M.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z.; ALVES, T. L. M.; GAMBETTA, R.; SECCHI, A. R. Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 84, n. 12, p. 1756-1761, 2009.

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

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

- KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, v. 13, n. 3, p. 321-326, 2010.
- LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, n. 1, p. 1-14, 1996a.
- LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, v. 14, n. 11, p. 431-438, 1996b.
- MCCOOL, G. J.; FERNANDEZ, T.; LI, N.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 138, n. 1, p. 41-48, 1996.
- OMAR, S.; RAYES, A.; EQAAB, A.; VOß, I.; STEINBÜCHEL, A. 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.
- REDDY, S. V.; THIRUMALA, M.; MAHMOOD, S. Production of PHB and P (3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, n. 3, p. 391-397, 2009.
- RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography A*, v. 445, p. 285-289, 1988.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, v. 25, n. 10, p. 1503-1555, 2000.
- VALAPPIL, S. P.; BOCCACCINI, A. R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 91, n. 1, p. 1-17, 2007.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 63, n. 9, p. 3703-3706, 1997.
- WU, Q.; HUANG, H.; HU, G.; CHEN, J.; HO, K. P.; CHEN, G.-Q. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 80, n. 2, p. 111-118, 2001.

Capítulo 7

Considerações Finais

7.1 Discussão geral dos resultados

Trabalhou-se com a bactéria *Bacillus megaterium* na produção de P(3HB) em cultivo submerso utilizando meio mineral. Essa bactéria é Gram-positiva e aeróbia estrita, e possui comportamento diferente do apresentado pelas bactérias comumente utilizadas para produção de P(3HB) como, por exemplo, produção sem limitação de nitrogênio. Além disso, devem-se evitar condições que levem a esporulação (condições desfavoráveis para o crescimento), uma vez que a *B. megaterium* consome o P(3HB) internamente para a realização deste processo.

Com os resultados apresentados no Capítulo 3, Artigo 1, verificou-se que bactéria *B. megaterium*, inicia a produção de P(3HB) durante a fase de crescimento exponencial, sem necessidade de limitação de nitrogênio. Possivelmente devido ao uso de dois inóculos sequenciais o crescimento não apresentou fase *lag*. No início da fase de crescimento exponencial observa-se uma queda no valor percentual de P(3HB) intracelular, embora a concentração de P(3HB) aumente. A produção durante a fase exponencial sem limitação de nitrogênio e a queda inicial do acúmulo percentual do polímero, durante a fase *lag* foram observados por Mccool *et al.* (1996) no cultivo de *B. megaterium*, segundo os autores a diminuição no percentual de polímero pode ser devido ao consumo durante a adaptação das células durante a fase *lag*. Porém, no presente trabalho não foi observada a fase *lag* e sugere-se que a diminuição durante o início da fase de crescimento exponencial é devido a uma diferença na taxa de crescimento em relação à taxa de formação de polímero e depois de certo tempo a taxa de formação de polímero aumenta.

Nos experimentos em estufa incubadora rotatória foi possível a produção de P(3HB) mesmo sem limitação de nitrogênio. O acúmulo percentual chegou a 70 % de polímero em relação à biomassa total. Porém, o escalonamento não foi trivial, sendo que nos cultivos em biorreatores de 4 L, com concentração de fontes de carbono e nitrogênio otimizadas e

controlando oxigênio dissolvido (DO) acima de 40 % com aumento da rotação do impelidor, os valores de percentual de acúmulo atingidos foram muito inferiores quando comparados aos obtidos nos experimentos em estufa incubadora rotatória. Esta diferença também foi observada por Omar *et al.* (2001) na produção de P(3HB) com *B. megaterium* utilizando xarope de tâmaras como fonte de carbono. Esses autores apresentaram experimentos com diferença do percentual de acúmulo cerca de 50 % menor no experimento com aumento de escala.

Nos experimentos realizados em biorreator de 4 L, os acúmulos obtidos foram de 28 % em experimento com controle do pH no valor 7,0, e de 34 % nos cultivos onde não foi controlada esta variável. Philip *et al.* (2009) apresentaram resultados semelhantes com cultivos de *Bacillus cereus*, onde em experimentos com controle de pH no valor de 6,8, foi obtido acúmulo de P(3HB) igual a 25 % enquanto que sem controlar o pH o acúmulo foi de 34 %. Os autores sugerem que o baixo valor de pH inibe a degradação interna do P(3HB). Valappil *et al.* (2007) trabalharam com cultivos de *B. cereus* SPV e a maior produção de P(3HB) foi obtida em cultivo com pH livre. Segundo os autores, o valor baixo de pH estaria relacionado ao não consumo de polímero. Esse resultado está de acordo com o obtido por Kominek e Halvorson (1965), também trabalhando com *B. cereus*, os quais verificaram que o metabolismo do P(3HB) é afetado pela concentração de íons hidrogênio. Quando o meio de cultivo foi mantido num valor mais alto de pH, o acúmulo de P(3HB) não foi favorecido, enquanto que num pH baixo o consumo do polímero foi suprimido e a formação de esporo foi inibida. Além da importância do pH, cabe salientar que a principal diferença entre os cultivos em estufa incubadora rotatória e em biorreator de 4 L sem controle de pH, apresentados no Capítulo 3, é a disponibilidade de oxigênio, sendo que em estufa incubadora rotatória a disponibilidade de oxigênio dissolvido é muito menor. Esse resultado sugere que a disponibilidade de oxigênio pode ser um fator importante para a produção de P(3HB) por *B. megaterium*.

A modelagem matemática da produção de P(3HB) por *B. megaterium* foi apresentada no Capítulo 4. Neste trabalho foram propostos quatro modelos que se diferenciam nas expressões para a velocidade específica de crescimento e para a taxa de produção de polímero. Os parâmetros dos modelos propostos e dos modelos encontrados na literatura foram estimados utilizando os dados experimentais apresentados no Capítulo 3.

Para os experimentos com controle da variável pH o modelo com melhor ajuste foi o modelo proposto BiopRHyp, que apresentou menor valor da função objetivo e no teste F, menor razão F_0/F_{TAB} entre todos modelos testados incluindo os modelos obtidos na literatura. A análise individual do ajuste das variáveis também mostra melhor desempenho do BiopRHyp confirmado pelos valores de R^2 e MSE , com exceção da variável sacarose para a qual todos os modelos testados apresentaram valores próximos. Com relação ao percentual de P(3HB) acumulado o melhor desempenho do modelo BiopRHyp é atribuído ao fator de correção proposto para a expressão da taxa de produção do polímero, o qual consegue descrever as mudanças na razão entre as taxas de produção de polímero e formação de biomassa, evidenciados pela diminuição no percentual de polímero no início da fase de crescimento exponencial. Além disso, apesar de ter igual ou menor número de parâmetros, o BiopRHyp apresentou os menores desvios padrões nos valores dos parâmetros estimados.

Para os dados experimentais obtidos com cultivos sem controle da variável pH, foi necessário obter uma expressão para a formação de íon H^+ . A expressão mais adequada, dentre as expressões testadas, foi aquela na qual a taxa de formação de íon H^+ está associada à taxa de crescimento de biomassa total. Devido ao bom desempenho do modelo BiopRhyp, escolheu-se trabalhar neste novo conjunto de dados com o BiopRhyp e dois modelos propostos a partir de modificações na expressão da velocidade específica de crescimento, BiopRhyp_H e BiopRhyp_Hf, com inclusão da influência da concentração do íon H^+ . O modelo BiopRhyp não possui equações para descrever o pH do meio e, portanto, não pode representar os dados experimentais, apesar de mostrar um bom desempenho para as outras variáveis. Na comparação entre os dois modelos que consideram a influência do pH do meio, menores desvios padrão dos valores estimados para os parâmetros e menor razão F_0/F_{TAB} foram obtidos para o BiopRhyp_H. Apesar do valor da função objetivo ser ligeiramente maior, o BiopRhyp_H apresenta maior valor de R^2 e menor MSE para a maioria das variáveis quando comparado os 2 modelos. Assim, verifica-se que o BiopRhyp_H apresentou melhor desempenho, mesmo contendo um parâmetro a menos que o BiopRhyp_Hf.

O Capítulo 5 traz a análise da influência da disponibilidade de oxigênio na produção de P(3HB) por *B. megaterium* onde foram apresentados experimentos no qual foram variadas as condições de agitação do meio de cultura, por meio de utilização de diferentes rotações do impelidor, entre 100 rpm e 600 rpm em cada cultivo, com as condições do meio de cultivo otimizadas e sem controle da variável pH. O coeficiente volumétrico de transferência de massa da fase líquida (k_{LA}) é um parâmetro relacionado com a taxa de transferência de oxigênio e é amplamente empregado como critério para realização de aumento de escala em processos aeróbios (FLORES *et al.*, 1997; ÖZBEK e GAYIK, 2001; SHUKLA *et al.*, 2001; GALACTION *et al.*, 2004; BANDAIPHET e PRASERTSAN, 2006; GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009). Foram calculados os valores de k_{LA} nos tempos de 2 h e 4 h de cultivo para cada experimento realizado e, para cada rotação, utilizou-se a média do valor obtido para os dois tempos, uma vez que não houve diferença significativa entre valores obtidos em cada ponto. Observou-se que os valores de k_{LA} obtidos aumentam com o aumento da rotação segundo a lei da potência com expoente 1,6. Garcia-Ochoa *et al.* (2000) trabalhando com a produção de Goma Xantana por *Xanthomonas campestris* também verificaram a influência da rotação no valor de k_{LA} segundo lei da potência, porém com expoente 2.

No presente trabalho observou-se que o maior percentual de P(3HB) acumulado nas células e maior rendimento de polímero em relação à sacarose, 62% de P(3HB) e 0,32 $g \cdot g^{-1}$ respectivamente, foi obtido no cultivo com k_{LA} igual a 0,006 s^{-1} (rotação de 200 rpm). Nesta condição a produtividade alcançada foi 0,14 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$. Os resultados indicam a existência de um ponto ótimo para a produção de P(3HB) que está localizado próximo ao valor de k_{LA} de 0,006 s^{-1} , sendo que valores maiores ou menores levam a diminuição do percentual de polímero acumulado evidenciando a influência da disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo. Outros trabalhos apontam também a influência da disponibilidade de oxigênio sobre a produção de P(3HB), sendo que alguns dos resultados reportados na literatura são contraditórios. A influência da rotação do impelidor na produção de P(3HB) foi reportada por Philip *et al.* (2009) trabalhando com a bactéria *B. cereus* SPV. Os autores fizeram cultivos em biorreator com volume útil de 2 L com rotações iguais a 50 rpm, 125 rpm, 250 rpm e 500 rpm sem controle de pH do meio, sendo o pH inicial igual a 6,8. O maior acúmulo de P(3HB),

34 %, foi obtido no experimento com rotação igual a 125 rpm, mostrando que a baixa disponibilidade de oxigênio (até um certo limite) aumenta a produção de P(3HB) por *B. cereus*. Porém, Kulpreecha *et al.* (2009) reportaram comportamento contrário para produção de P(3HB) por *B. megaterium*. Os autores verificaram a influência do oxigênio dissolvido no meio de cultivo durante a batelada. Testaram cultivos com controle em 40 %, 60 % e 80 % de oxigênio dissolvido, sendo que o cultivo com 40 % de oxigênio apresentou o pior resultado, 47 % de polímero acumulado, enquanto que para 60 % e 80 % de oxigênio dissolvido o acúmulo de polímero foi em torno de 60 % sem diferença significativa entre estes dois cultivos. No entanto, levando em consideração a rota metabólica mais aceita para a síntese de P(3HB), os resultados encontrados no presente trabalho podem ser considerados qualitativamente corretos. No caso de k_{LA} menores, uma baixa oferta de oxigênio pode levar a forte desaceleração no metabolismo da *B. megaterium* pelo fato desta bactéria ser aeróbia estrita. No caso de valores maiores de k_{LA} , o ciclo do ácido tricarbóxico é favorecido resultando em uma menor quantidade de Acetil-CoA desviada para a via metabólica de síntese de P(3HB). Com relação à produtividade de polímero, não houve diferença significativa entre valores obtidos em cultivos com diferentes k_{LA} , com exceção do menor valor testado ($k_{LA} = 0,003 \text{ s}^{-1}$). Embora tenha sido possível obter um acúmulo considerável de P(3HB) ainda é necessário aumentar a produtividade de polímero e para isso é necessário repensar uma estratégia para aumentar também a produção de biomassa uma vez que o polímero é intracelular.

Com os dados obtidos nos cultivos realizados com diferentes valores de k_{LA} , pretende-se melhorar o modelo BiopRhyp_H com a inclusão da influência do oxigênio na expressão para produção do polímero e formação de biomassa.

No Capítulo 6 apresenta-se o estudo da influência da fonte de nitrogênio na produção de polímero e biomassa em duas fontes de carbono diferentes, sacarose e glicerol. A sacarose foi utilizada por ser um açúcar relativamente abundante e barato no Brasil, e glicerol por ser um resíduo da produção de biodiesel, sendo que ambos são metabolizados pela *B. megaterium*. Foram realizados ensaios com cinco fontes de nitrogênio diferentes: cloreto de amônio, citrato de amônio, sulfato de amônio, fosfato de amônio e nitrato de amônio.

Com relação aos cultivos que utilizaram glicerol como fonte de carbono, o crescimento celular não apresentou diferença significativa nos cultivos com as diferentes fontes de nitrogênio testadas. A análise de variância das médias das concentrações finais de P(3HB) no meio de cultivo mostrou diferença significativa e a aplicação do Teste de Tukey mostrou que a média obtida com cultivo em glicerol com fosfato de amônio foi significativamente diferente à obtida com cloreto de amônio. Contudo, as médias entre cloreto, citrato, sulfato e nitrato de amônio não apresentam diferença significativa, segundo o Teste de Tukey. O acúmulo médio percentual do polímero na biomassa apresentou diferença significativa e o maior acúmulo observado foi para o cultivo utilizando citrato de amônio como fonte de nitrogênio, seguido pelos cultivos com cloreto e sulfato amônio. Reddy *et al.* (2009) obtiveram 52,32% de acúmulo utilizando glicerol e sódio amônio fosfato como fonte de nitrogênio em 48 horas de cultivo com *B. megaterium* em estufa incubadora rotatória. Cabe salientar que esse acúmulo de P(3HB) foi obtido com uma fonte de nitrogênio diferente das

utilizadas no presente estudo e com tempo de cultivo maior. Assim, poderiam ser realizados cultivos adicionais de maior duração para verificar se a produção de polímero aumenta.

Nos cultivos com sacarose como fonte de carbono a maior formação de biomassa ocorreu nos cultivos com sulfato e cloreto de amônio como fontes de nitrogênio. Gouda *et al.* (2001) também verificaram que o cloreto e sulfato de amônio possibilitaram maior crescimento de biomassa utilizando melão de cana como fonte de carbono. Omar *et al.* (2001) utilizando xarope de tâmaras como fonte de carbono e diferentes fontes de nitrogênio, observaram maior crescimento celular utilizando nitrato de amônio como fonte de nitrogênio. Os resultados de produção de polímero, expressos tanto na forma de concentração como de percentual, também mostraram diferença significativa quando aplicado a Análise de Variância. Cultivos contendo sulfato, cloreto e citrato de amônio apresentaram resultados sem diferença significativa para a concentração de polímero obtida e percentual de polímero acumulado. O acúmulo percentual de polímero obtido nestes experimentos foram maiores que 50 %. Fosfato e nitrato de amônio não se mostraram fontes favoráveis ao acúmulo de polímero e biomassa. Cloreto de amônio também foi melhor fonte de nitrogênio no trabalho de Gouda *et al.* (2001), que obtiveram maior acúmulo de polímero (38,42 %) com *B. megaterium* quando utilizaram melão de cana como fonte de carbono, e no trabalho de Omar *et al.* (2001), no qual apresentou o melhor resultado de acúmulo de P(3HB) (42 %) com *B. megaterium* utilizando xarope de tâmara como fonte de carbono. Contudo, nestes dois trabalhos, a utilização de sacarose como fonte de carbono propiciou acúmulos de biopolímero de apenas 5 % (OMAR *et al.*, 2001) e 3 % (GOUDA *et al.*, 2001) inferiores aos obtidos neste trabalho.

7.2 Conclusões

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa as sugestões apresentadas a seguir podem contribuir para a continuidade e elucidação de questões que surgiram neste trabalho.

A bactéria *B. megaterium*, utilizando sacarose como fonte de carbono, produz P(3HB) durante a fase de crescimento exponencial sem necessidade de limitação de nutriente. Experimentos em estufa incubadora rotatória apresentaram os melhores resultados alcançando um percentual de acúmulo de P(3HB) de cerca de 70 % em relação à biomassa total. Em experimentos em biorreator de 4 L, com as condições de meio de cultura otimizados, cultivos com o pH livre apresentaram resultados melhores do que cultivos com controle de pH em 7.0, que é o pH ótimo de crescimento.

Com relação aos modelos para representação deste bioprocessos, o ajuste dos dados experimentais dos cultivos com e sem controle de pH mostraram que é importante a inclusão de um fator de correção para a taxa de formação de P(3HB), relacionada ao fato de que a formação de polímero no sistema em estudo não apresenta exatamente a mesma cinética do crescimento celular, e de um termo relativo a influência de ions H^+ no crescimento celular. Para o cultivo com controle de pH o modelo mais adequado foi o modelo BiopRHyp,

proposto neste trabalho. Já para os dados do cultivo sem controle de pH o modelo BiopRhyp_H, obtido pela modificação do BiopRhyp, apresentou melhor desempenho. Para os dois conjuntos de dados os modelos citados acima apresentaram, em cada caso, o melhor ajuste com parâmetros apresentando pequena variabilidade.

Os resultados obtidos com experimentos realizados com diferentes coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio, k_{La} , evidenciaram a importância da disponibilidade de oxigênio na produção de P (3HB) por *B. megaterium*. Identificou-se a existência de uma condição ótima de transferência de oxigênio em termos de valor de k_{La} , facilitando assim a aplicação para outras escalas de produção, uma vez que este parâmetro é amplamente utilizado como critério de escalonamento em bioprocessos aeróbios. Contudo, cabe salientar que a maior produtividade de P(3HB) obtida ainda é baixa para aplicações industriais e estudos adicionais são necessários para melhorar este parâmetro.

Com relação aos testes com diferentes fontes de nitrogênio, a utilização da sacarose como fonte de carbono possibilitou maior acúmulo de polímero e maior crescimento celular quando comparado à utilização de glicerol. Cultivos com glicerol como fonte de carbono apresentaram melhores resultados quando se utilizou citrato ou cloreto de amônio como fonte de nitrogênio. Para cultivos com sacarose como fonte de carbono, o melhor desempenho foi alcançado utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, situação na qual se obteve boa formação de biomassa com boa produção de polímero. Para ambas as fontes de carbono utilizadas, o fosfato ou nitrato de amônio como fonte de nitrogênio não apresentaram produção de polímero satisfatória. O citrato de amônio, apesar de possibilitar um grande acúmulo de polímero, não parece ser uma boa fonte de nitrogênio para produção de biomassa, já que com este substrato foi registrada a menor geração de biomassa.

7.3 Sugestões para Trabalhos Futuros

Melhorar o modelo proposto no Capítulo 4, com a incorporação de equações e ou termos que representem a influência da taxa de transferência de oxigênio na produção de P(3HB) por *B. megaterium*. Os dados apresentados no Capítulo 7 poderão ser utilizados para estimação de parâmetros do novo modelo uma vez que foram realizados experimentos em diferentes condições de agitação propiciando diferentes coeficientes de transferência de oxigênio. Sendo que estes foram realizados em, no mínimo, duplicata.

Estudar de forma mais aprofundada a influência do pH na produção de P(3HB). Testar cultivos com pH controlado no valor 5,0 e 6,0. Verificar a possibilidade de controle de pH em faixas determinadas como, por exemplo, controlar em um pH próximo ao neutro no início do cultivo e depois de um determinado tempo controlar em um valor mais baixo, mas acima de um pH mínimo para que as células não sejam afetadas. Essa análise poderia ser realizada com auxílio do modelo proposto no Capítulo 4 e os dados experimentais serviriam para validação do modelo. Além disso, é necessário estudar estratégias para aumento de produtividade de

P(3HB) que passa pelo aumento de produção de biomassa, podendo ser testado a utilização de cultivos em batelada alimentada.

Ampliar os estudos sobre produção de P(3HB) por *B. megaterium* utilizando glicerol como fonte de carbono. Tomando-se o cuidado de fazer o inóculo com glicerol e permitindo maior tempo de cultivo para avaliar o acúmulo de P(3HB). Depois disso, ainda é possível verificar a influência da taxa de transferência de oxigênio na produção a partir de glicerol. Outras fontes de carbono também podem ser testadas como, por exemplo, soro de leite, uma vez que foi reportada na literatura a capacidade de metabolização de diversas fontes por *B. megaterium*.

Para complementar o estudo da produção do P(3HB) objetivando o desenvolvimento para escala industrial, ainda se faz necessário o estudo da extração do biopolímero de dentro das células. Por se tratar de uma bactéria Gram-positiva, possui estruturas de paredes diferentes das comumente empregadas para a produção deste biopolímero. Além disso, o método de extração mais reportado na literatura utiliza solventes orgânicos para extração como, por exemplo, o clorofórmio não sendo uma opção ambientalmente favorável.

7.4 Referências

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

FLORES, E. R.; PÉREZ, F.; DE LA TORRE, M. Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 83, n. 6, p. 561-564, 1997.

GALACTION, A. I.; CASCAVAL, D.; ONISCU, C.; TURNEA, M. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochemical Engineering Journal*, v. 20, n. 1, p. 85-94, 2004.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 2, p. 153-176, 2009.

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

KOMINEK, L. A.; HALVORSON, H. O. Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, v. 90, n. 5, p. 1251-1259, 1965.

KULPREECHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N. 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. 240-245, 2009.

MCCOOL, G. J.; FERNANDEZ, T.; LI, N.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 138, n. 1, p. 41-48, 1996.

OMAR, S.; RAYES, A.; EQAAB, A.; VOß, I.; STEINBÜCHEL, A. 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.

ÖZBEK, B.; GAYIK, S. The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 8-9, p. 729-741, 2001.

PHILIP, S.; SENGUPTA, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Effect of impeller speed and pH on the production of Poly(3-hydroxybutyrate) using *Bacillus cereus* SPV. *Biomacromolecules*, v. 10, n. 4, p. 691-699, 2009.

REDDY, S. V.; THIRUMALA, M.; MAHMOOD, S. Production of PHB and P (3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, n. 3, p. 391-397, 2009.

SHUKLA, V. B.; PARASU VEERA, U.; KULKARNI, P. R.; PANDIT, A. B. Scale-up of biotransformation process in stirred tank reactor using dual impeller bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 8, n. 1, p. 19-29, 2001.

VALAPPIL, S. P.; PEIRIS, D.; LANGLEY, G. J.; HEMIMAN, J. M.; BOCCACCINI, A. R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. *Journal of Biotechnology*, v. 127, n. 3, p. 475-487, 2007.

Referências Bibliográficas

ÅKERBERG, C.; HOFVENDAHL, K.; ZACCHI, G.; HAHN-HÄGERDAL, B. Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 49, n. 6, p. 682-690, 1998.

ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell*. 5th. ed. New York: Garland Science, 2008.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 54, n. 4, p. 450-472, 1990.

AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, n. 2, p. 111-122, 2004.

BABEL, W.; ACKERMANN, J.-U.; BREUER, U.; STEINBÜCHEL, A. Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB)Biopolyesters: Springer Berlin / Heidelberg, 2001. p. 125-157. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology).

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

BANDYOPADHYAY, B.; HUMPHREY, A. E.; TAGUCHI, H. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 9, n. 4, p. 533-544, 1967.

BEAULIEU, M.; BEAULIEU, Y.; MELINARD, J.; PANDIAN, S.; GOULET, J. Influence of Ammonium Salts and Cane Molasses on Growth of *Alcaligenes eutrophus* and Production of Polyhydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 61, n. 1, p. 165-169, 1995.

BLOEMBERGEN, S.; HOLDEN, D. A.; BLUHM, T. L.; HAMER, G. K.; MARCHESSAULT, R. H. Stereoregularity in synthetic β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate homopolyesters. *Macromolecules*, v. 22, n. 4, p. 1656-1663, 1989.

BORMANN, E.-J. Stoichiometrically calculated yields of the growth-associated production of polyhydroxybutyrate in bacteria. *Biotechnology Letters*, v. 22, n. 18, p. 1437-1442, 2000.

BRAUNEGG, G.; BONA, R.; KOLLER, M. Sustainable Polymer Production. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, v. 43, n. 6, p. 1779 - 1793, 2004.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, v. 65, n. 2-3, p. 127-161, 1998.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. *Bioquímica*. 4^o. ed.: Thomson, 2006.

ÇELEKLI, A.; YAVUZATMACA, M.; BOZKURT, H. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 14, p. 3625-3629, 2009.

- CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, v. 23, n. 7, p. 1273-1335, 1998.
- CHEN, H. J.; PAN, S. C.; SHAW, G. C. Identification and Characterization of a Novel Intracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase from *Bacillus megaterium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 16, p. 5290-5299, 2009.
- CHEN, H. J.; TSAI, T. K.; PAN, S. C.; LIN, J. S.; TSENG, C. L.; SHAW, G. C. The master transcription factor Spo0A is required for poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) accumulation and expression of genes involved in PHB biosynthesis in *Bacillus thuringiensis*. *Fems Microbiology Letters*, v. 304, n. 1, p. 74-81, 2010.
- DAWES, E. A.; SENIOR, P. J. The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology*: Academic Press, 1973. p. 135-266.
- DESETTY, R.; MAHAJAN, V.; KHAN, B.; RAWAL, S. Isolation and heterologous expression of PHA synthesising genes from *Bacillus thuringiensis* R1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 9, p. 1769-1774, 2008.
- DHURJATI, P.; MAHADEVAN, R. Systems Biology: The synergistic interplay between biology and mathematics. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 86, n. 2, p. 127-141, 2008.
- DOBROTH, Z. T.; HU, S.; COATS, E. R.; MCDONALD, A. G. Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 3, p. 3352-3359, 2011.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- FACCIN, D. J. L. *Cultivo da bactéria Bacillus megaterium para a produção do biopolímero poli(3-hidroxibutirato) e modelagem matemática do bioprocesso*. (2007). 105 f. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2007.
- FACCIN, D. J. L.; MARTINS, I.; CARDOZO, N. S. M.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z.; ALVES, T. L. M.; GAMBETTA, R.; SECCHI, A. R. Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 84, n. 12, p. 1756-1761, 2009.
- FINDLAY, R. H.; WHITE, D. C. Polymeric Beta-Hydroxyalkanoates from Environmental Samples and *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 45, n. 1, p. 71-78, 1983.
- FLICKINGER, M. C.; DREW, S. W. *The encyclopedia of bioprocess technology : fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. New York: John Wiley & Sons, 1999.
- FLIEGER, M.; KANTOROVÁ, M.; PRELL, A.; ŘEZANKA, T.; VOTRUBA, J. Biodegradable plastics from renewable sources. *Folia Microbiologica*, v. 48, n. 1, p. 27-44, 2003.
- FLORES, E. R.; PÉREZ, F.; DE LA TORRE, M. Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 83, n. 6, p. 561-564, 1997.

FREDRICKSON, A. G.; MEGEE III, R. D.; TSUCHIYA, H. M.; PERLMAN, D. Mathematical Models for Fermentation Processes. *Advances in Applied Microbiology*: Academic Press, 1970. p. 419-465.

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

GALACTION, A. I.; CASCAVAL, D.; ONISCU, C.; TURNEA, M. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochemical Engineering Journal*, v. 20, n. 1, p. 85-94, 2004.

GARCIA-OCHOA, F.; CASTRO, E. G. M.; SANTOS, V. E. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, n. 9, p. 680-690, 2000.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 2, p. 153-176, 2009.

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

GOULD, G. W.; RICHARD, K. R. BACTERIA | Bacterial Endospores *Encyclopedia of Food Microbiology*. . Oxford: Elsevier, 1999. p. 168-173.

HAWTHORNE, C. A.; BRUSILOW, W. S. Complementation of mutants in the *Escherichia coli* proton-translocating ATPase by cloned DNA from *Bacillus megaterium*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 261, n. 12, p. 5245-5248, 1986.

HOFFMANN, N.; REHM, B. H. A. Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 237, n. 1, p. 1-7, 2004.

HORI; KANEKO; TANJI; XING; UNNO. Construction of self-disruptive *Bacillus megaterium* in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, n. 2, p. 211-216, 2002.

JACQUEL, N.; LO, C.-W.; WEI, Y.-H.; WU, H.-S.; WANG, S. S. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, n. 1, p. 15-27, 2008.

JENDROSSEK, D. Microbial Degradation of Polyesters. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 71, p. 293-325, 2001.

JENDROSSEK, D.; HANDRICK, R. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates*. *Annual Review of Microbiology*, v. 56, n. 1, p. 403-432, 2002.

JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H. G. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 46, n. 5, p. 451-463, 1996.

KAPRITCHKOFF, F. M.; VIOTTI, A. P.; ALLI, R. C. P.; ZUCCOLO, M.; PRADELLA, J. G. C.; MAIORANO, A. E.; MIRANDA, E. A.; BONOMI, A. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*, v. 122, n. 4, p. 453-462, 2006.

- KAPTAN ÖLMEZ, H.; ARAN, N. Modeling the growth kinetics of *Bacillus cereus* as a function of temperature, pH, sodium lactate and sodium chloride concentrations. *International Journal of Food Microbiology*, v. 98, n. 2, p. 135-143, 2005.
- KAWAGUCHI, Y.; DOI, Y. Kinetics and Mechanism of Synthesis and Degradation of Poly(3-Hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. *Macromolecules*, v. 25, n. 9, p. 2324-2329, 1992.
- KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, v. 13, n. 3, p. 321-326, 2010.
- KESSLER, B.; WEUSTHUIS, R.; WITHOLT, B.; EGGINK, G. Production of Microbial Polyesters: Fermentation and Downstream Processes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 71, p. 159-182, 2001.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 2, p. 607-619, 2005a.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. A Simple Structured Mathematical Model for Biopolymer (PHB) Production. *Biotechnology Progress*, v. 21, n. 3, p. 830-838, 2005b.
- KIM, B. H.; GADD, G. M. *Bacterial physiology and metabolism*. Cambridge University Press, 2008.
- KNIGHT, B. C. J. G.; PROOM, H. A Comparative Survey of the Nutrition and Physiology of Mesophilic Species in the Genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology*, v. 4, n. 3, p. 508-538, 1950.
- KOLLER, M.; BONA, R.; BRAUNEGG, G.; HERMANN, C.; HORVAT, P.; KROUTIL, M.; MARTINZ, J.; NETO, J.; PEREIRA, L.; VARILA, P. Production of Polyhydroxyalkanoates from Agricultural Waste and Surplus Materials. *Biomacromolecules*, v. 6, n. 2, p. 561-565, 2005.
- KOLLER, M.; HORVAT, P.; HESSE, P.; BONA, R.; KUTSCHERA, C.; ATLIĆ, A.; BRAUNEGG, G. Assessment of formal and low structured kinetic modeling of polyhydroxyalkanoate synthesis from complex substrates. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 29, n. 5, p. 367-377, 2006.
- KOMINEK, L. A.; HALVORSON, H. O. Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, v. 90, n. 5, p. 1251-1259, 1965.
- KULPREECHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N. 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. 240-245, 2009.
- LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, n. 1, p. 1-14, 1996a.
- LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, v. 14, n. 11, p. 431-438, 1996b.
- LEE, S. Y.; CHOI, J.-I. Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. *Polymer Degradation and Stability*, v. 59, n. 1-3, p. 387-393, 1998.

- LEE, T.-R.; LIN, J.-S.; WANG, S.-S.; SHAW, G.-C. PhaQ, a New Class of Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB)-Responsive Repressor, Regulates *phaQ* and *phaP* (Phasin) Expression in *Bacillus megaterium* through Interaction with PHB. *J. Bacteriol.*, v. 186, n. 10, p. 3015-3021, 2004.
- LENZ; ROBERT, W.; MARCHESSAULT; ROBERT, H. *Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology*. Washington, DC, ETATS-UNIS: American Chemical Society, 2005.
- LÓPEZ, J.; NARANJO, J.; HIGUITA, J.; CUBITTO, M.; CARDONA, C.; VILLAR, M. Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 17, n. 2, p. 250-258, 2012.
- LUENGO, J. M.; GARCÍA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G.; OLIVERA, E. R. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, n. 3, p. 251-260, 2003.
- LUONG, J. H. T.; MULCHANDANI, A.; LEDUY, A. Kinetics of biopolymer synthesis: A revisit. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, n. 6, p. 326-332, 1988.
- MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 63, n. 1, p. 21-53, 1999.
- MATAVULJ, M.; MOLITORIS, H.-P. Biodegradation of polyhydroxyalkanoate-based plastic (BIOPOL) under different environmental conditions I. Weightloss of substrate. *Hoppea*, v. 61, p. 735-749, 2000.
- MCCOOL, G. J.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate Inclusion Body-Associated Proteins and Coding Region in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.*, v. 181, n. 2, p. 585-592, 1999.
- MCCOOL, G. J.; CANNON, M. C. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 14, p. 4235-4243, 2001.
- MCCOOL, G. J.; FERNANDEZ, T.; LI, N.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 138, n. 1, p. 41-48, 1996.
- MCLEOD, A. I. Necessary and sufficient condition for nonsingular Fisher information matrix in ARMA and fractional ARIMA models. *American Statistician*, v. 53, n. 1, p. 71-72, 1999.
- MERRICK, J. M.; DOUDOROFF, M. Depolymerization of Poly- β -Hydroxybutyrate by an Intracellular Enzyme System. *J. Bacteriol.*, v. 88, n. 1, p. 60-71, 1964.
- MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 371-394, 1949.
- MULCHANDANI, A.; LUONG, J. H. T. Microbial inhibition kinetics revisited. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 11, n. 2, p. 66-73, 1989.
- NAKATA, H. M. Effect of pH on intermediates produced during growth and sporulation of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.*, v. 86, n. 3, p. 577-581, 1963.
- NELDER, J. A.; MEAD, R. A Simplex Method for Function Minimization. *The Computer Journal*, v. 7, n. 4, p. 308-313, 1965.

- NIKEL, P.; PETTINARI, M.; GALVAGNO, M.; MÉNDEZ, B. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol by a recombinant *Escherichia coli* mutant in fed-batch microaerobic cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 77, n. 6, p. 1337-1343, 2008.
- OMAR, S.; RAYES, A.; EQAAB, A.; VOß, I.; STEINBÜCHEL, A. 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.
- OTARI, S. V.; GHOSH, J. S. Production and Characterization of the Polymer Polyhydroxy Butyrate-co-polyhydroxy Valerate by *Bacillus megaterium* NCIM 2475. *Current Research Journal of Biological Sciences*, v. 1, n. 2, p. 23-26, 2009.
- ÖZBEK, B.; GAYIK, S. The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 8-9, p. 729-741, 2001.
- PANDIAN, S. R.; DEEPAK, V.; KALISHWARALAL, K.; RAMESHKUMAR, N.; JEYARAJ, M.; GURUNATHAN, S. 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. 705-711, 2010.
- PATWARDHAN, P. R.; SRIVASTAVA, A. K. Model-based fed-batch cultivation of *R. eutropha* for enhanced biopolymer production. *Biochemical Engineering Journal*, v. 20, n. 1, p. 21-28, 2004.
- PENLOGLOU, G.; ROUSSOS, A.; CHATZIDOUKAS, C.; KIPARISSIDES, C. A combined metabolic/polymerization kinetic model on the microbial production of poly(3-hydroxybutyrate). *New Biotechnology*, v. 27, n. 4, p. 358-367, 2010.
- PHILIP, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 82, n. 3, p. 233-247, 2007.
- PHILIP, S.; SENGUPTA, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Effect of impeller speed and pH on the production of Poly(3-hydroxybutyrate) using *Bacillus cereus* SPV. *Biomacromolecules*, v. 10, n. 4, p. 691-699, 2009.
- POSADA, J. A.; NARANJO, J. M.; LÓPEZ, J. A.; HIGUITA, J. C.; CARDONA, C. A. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 1, p. 310-317, 2011.
- POULIOT, K.; THIBAUT, J.; GARNIER, A.; ACUÑA LEIVA, G. KLa Evaluation during the course of fermentation using data reconciliation techniques. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 23, n. 6, p. 565-573, 2000.
- PRABHU, N. N.; SANTIMANO, M. C.; MAVINKURVE, S.; BHOSLE, S. N.; GARG, S. Native granule associated short chain length polyhydroxyalkanoate synthase from a marine derived *Bacillus* sp NQ-11/A2. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 97, n. 1, p. 41-50, 2010.
- PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M.; TODD, C. A Numerical Classification of the Genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology*, v. 134, n. 7, p. 1847-1882, 1988.
- RAJE, P.; SRIVASTAVA, A. K. Updated mathematical model and fed-batch strategies for poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) production by *Alcaligenes eutrophus*. *Bioresource Technology*, v. 64, n. 3, p. 185-192, 1998.

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

REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, v. 87, n. 2, p. 137-146, 2003.

REDDY, S. V.; THIRUMALA, M.; MAHMOOD, S. Production of PHB and P (3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, n. 3, p. 391-397, 2009.

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

REHM, B. H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem J*, v. 376, n. 1, p. 15-33, 2003.

REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 25, n. 1-3, p. 3-19, 1999.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography A*, v. 445, p. 285-289, 1988.

ROSS, T.; RATKOWSKY, D. A.; MELLEFONT, L. A.; MCMEEKIN, T. A. Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 82, n. 1, p. 33-43, 2003.

SATOH, Y.; MINAMOTO, N.; TAJIMA, K.; MUNEKATA, M. Polyhydroxyalkanoate synthase from *Bacillus* sp. INT005 is composed of PhaC and PhaR. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94, n. 4, p. 343-350, 2002.

SCHIRMER-MICHEL, Â. C.; FLÔRES, S. H.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Effect of oxygen transfer rates on alcohols production by *Candida guilliermondii* cultivated on soybean hull hydrolysate. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 84, n. 2, p. 223-228, 2009.

SECCHI, A. R. *User's Manual - Version 3.5. Pacote computacional para a solução de sistemas de equações algébrico-diferenciais*. 2008. Disponível em: <<http://www.enq.ufrgs.br/enqlib/numeric/numeric.html>>.

SHAHHOSSEINI, S. Simulation and optimisation of PHB production in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 8, p. 963-969, 2004.

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

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial – Engenharia Bioquímica*. São Paulo, Brasil: Edgard Blucher, 2001.

SHUKLA, V. B.; PARASU VEERA, U.; KULKARNI, P. R.; PANDIT, A. B. Scale-up of biotransformation process in stirred tank reactor using dual impeller bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 8, n. 1, p. 19-29, 2001.

- SLEPECKY, R. A.; LAW, J. H. Synthesis and degradation of poly- β -hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.*, v. 82, n. 1, p. 37-42, 1961.
- SOARES, R. D. P.; SECCHI, A. R. EMSO: A new environment for modelling, simulation and optimisation. *Computer Aided Chemical Engineering*, v. 14, n. C, p. 947-952, 2003.
- SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 71, n. 6, p. 783-789, 2006.
- SOMASHEKARA, D. M.; K.RASTOGI, N.; RAMACHANDRIAH, S. T. A simple kinetic model for growth and biosynthesis of polyhydroxyalkanoate in *Bacillus flexus*. *New Biotechnology*, v. 26, n. 1-2, p. 92-98, 2009.
- SONNLEITNER, B.; HEINZLE, E.; BRAUNEGG, G.; LAFFERTY, R. M. Formal kinetics of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) production in *Alcaligenes eutrophus* H 16 and *Mycoplana rubra* R 14 with respect to the dissolved oxygen tension in ammonium-limited batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 7, n. 1, p. 1-10, 1979.
- STEINBÜCHEL, A. Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. *Macromolecular Bioscience*, v. 1, n. 1, p. 1-24, 2001.
- STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, v. 128, n. 3, p. 219-228, 1995.
- STEPHANOPOULOS, G. N.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN, J. Review of Cellular Metabolism. *Metabolic Engineering*. San Diego: Academic Press, 1998. p. 21-79.
- STUBBE, J.; TIAN, J.; HE, A.; SINSKEY, A. J.; LAWRENCE, A. G.; LIU, P. Nontemplate-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. *Annual review of biochemistry*, v. 74, p. 433-80, 2005.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, v. 25, n. 10, p. 1503-1555, 2000.
- SUDESH, K.; GAN, Z.; MAEHARA, A.; DOI, Y. Surface structure, morphology and stability of polyhydroxyalkanoate inclusions characterised by atomic force microscopy. *Polymer Degradation and Stability*, v. 77, n. 1, p. 77-85, 2002.
- SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants -- A review. *Biotechnology Advances*, v. 25, n. 2, p. 148-175, 2007.
- TAGUCHI, S.; MAEHARA, A.; TAKASE, K.; NAKAHARA, M.; NAKAMURA, H.; DOI, Y. Analysis of mutational effects of a polyhydroxybutyrate (PHB) polymerase on bacterial PHB accumulation using an in vivo assay system. *FEMS Microbiology Letters*, v. 198, n. 1, p. 65-71, 2001.
- TAJIMA, K.; IGARI, T.; NISHIMURA, D.; NAKAMURA, M.; SATOH, Y.; MUNEKATA, M. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. INT005 accumulating polyhydroxyalkanoate (PHA) from gas field soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 95, n. 1, p. 77-81, 2003.

- TAMER, I. M.; MOO-YOUNG, M. Optimization of poly(β -hydroxybutyric acid) recovery from *Alcaligenes latus*: combined mechanical and chemical treatments. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 19, n. 6, p. 459-468, 1998.
- TAMER, I. M.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Disruption of *Alcaligenes latus* for Recovery of Poly(β -hydroxybutyric acid): Comparison of High-Pressure Homogenization, Bead Milling, and Chemically Induced Lysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 37, n. 5, p. 1807-1814, 1998.
- TERADA, M.; MARCHESSAULT, R. H. Determination of solubility parameters for poly(3-hydroxyalkanoates). *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 25, n. 1-3, p. 207-215, 1999.
- TIAN, P. Y.; SHANG, L. A.; REN, H.; MI, Y.; FAN, D. D.; JIANG, M. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Current research and development. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 5, p. 709-714, 2009.
- TROTSSENKO, Y. A.; BELOVA, L. L. Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) and Its Regulation in Bacteria. *Microbiology*, v. 69, n. 6, p. 635-645, 2000.
- TYO, K. E. J.; FISCHER, C. R.; SIMEON, F.; STEPHANOPOULOS, G. Analysis of polyhydroxybutyrate flux limitations by systematic genetic and metabolic perturbations. *Metabolic Engineering*, v. 12, n. 3, p. 187-195, 2010.
- VALAPPIL, S. P.; BOCCACCINI, A. R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 91, n. 1, p. 1-17, 2007.
- VALAPPIL, S. P.; PEIRIS, D.; LANGLEY, G. J.; HEMIMAN, J. M.; BOCCACCINI, A. R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. *Journal of Biotechnology*, v. 127, n. 3, p. 475-487, 2007.
- VALAPPIL, S. P.; RAI, R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Bacillus cereus* SPV under varied limiting conditions and an insight into the biosynthetic genes involved. *Journal of Applied Microbiology*, v. 104, n. 6, p. 1624-1635, 2008.
- VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 6, p. 2285-2289, 2004.
- VARY, P. S. Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology*, v. 140, n. 5, p. 1001-1013, 1994.
- VERLINDEN, R. A. J.; HILL, D. J.; KENWARD, M. A.; WILLIAMS, C. D.; RADECKA, I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, n. 6, p. 1437-1449, 2007.
- VIJAYENDRA, S.; RASTOGI, N.; SHAMALA, T.; ANIL KUMAR, P.; KSHAMA, L.; JOSHI, G. Optimization of polyhydroxybutyrate production by *Bacillus* sp. CFR 256 with corn steep liquor as a nitrogen source. *Indian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 2, p. 170-175, 2007.

- WANG, F. L.; 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. 3703-3706, 1997.
- WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, v. 39, n. 8, p. 971-974, 1967.
- WHITE, P. J. The Nutrition of *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus*. *J Gen Microbiol*, v. 71, n. 3, p. 505-514, 1972.
- WIECHERT, W. Modeling and simulation: tools for metabolic engineering. *Journal of Biotechnology*, v. 94, n. 1, p. 37-63, 2002.
- WU, Q.; HUANG, H.; HU, G.; CHEN, J.; HO, K. P.; CHEN, G.-Q. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 80, n. 2, p. 111-118, 2001.
- XIE, C.-H.; YOKOTA, A. Reclassification of *Alcaligenes latus* strains IAM 12599T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas lata* gen. nov., comb. nov., *Azohydromonas australica* sp. nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, n. 6, p. 2419-2425, 2005.
- YAMANE, T. Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: A theoretical study. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 41, n. 1, p. 165-170, 1993.
- YOO, S.; KIM, W.-S. Cybernetic model for synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 43, n. 11, p. 1043-1051, 1994.
- YU, J.; SHANG-TIAN, Y. Microbial Production of Bioplastics from Renewable Resources. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 585-610.
- 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, 2001.

Apêndice A

Imagens da *B.megaterium*

Com finalidade de verificar se ocorre formação de endosporo durante um cultivo de *B. megaterium* foram retiradas amostra ao longo de todo o processo para acompanhamento em microscópio. O cultivo acompanhado foi realizado nas condições descritas no Capítulo 7, com rotação do impelidor fixada em 600 rpm. Este cultivo foi realizado para a determinação dos valores de k_{La} a cada hora de cultivo. Por este motivo é necessário diminuir a aeração e desligar a agitação a cada hora, em curtos intervalos de tempo. Este procedimento poderia levar ao estresse celular e como consequência a formação de esporo.

As figuras a seguir representam as imagens obtidas de amostras dos inóculos (pré-inóculo e inóculo) e de amostras do cultivo nos tempos de 5 h até 12 h, coletado a cada hora. As imagens foram obtidas através da utilização de câmera fotográfica digital com zoom de 3× acoplada com auxílio de um tripé na ocular do microscópio. A lente ocular do microscópio possui capacidade de ampliação de 16× e a lente objetiva utilizada amplia a imagem em 100 vezes. As amostras foram fixadas nas lâminas e foi realizado o procedimento para coloração de esporo utilizando verde malaquita como corante e safranina como contracorante. Foi possível observar endosporo somente em algumas células do pré-inóculo, não foram observados endoesporo nas demais amostras.

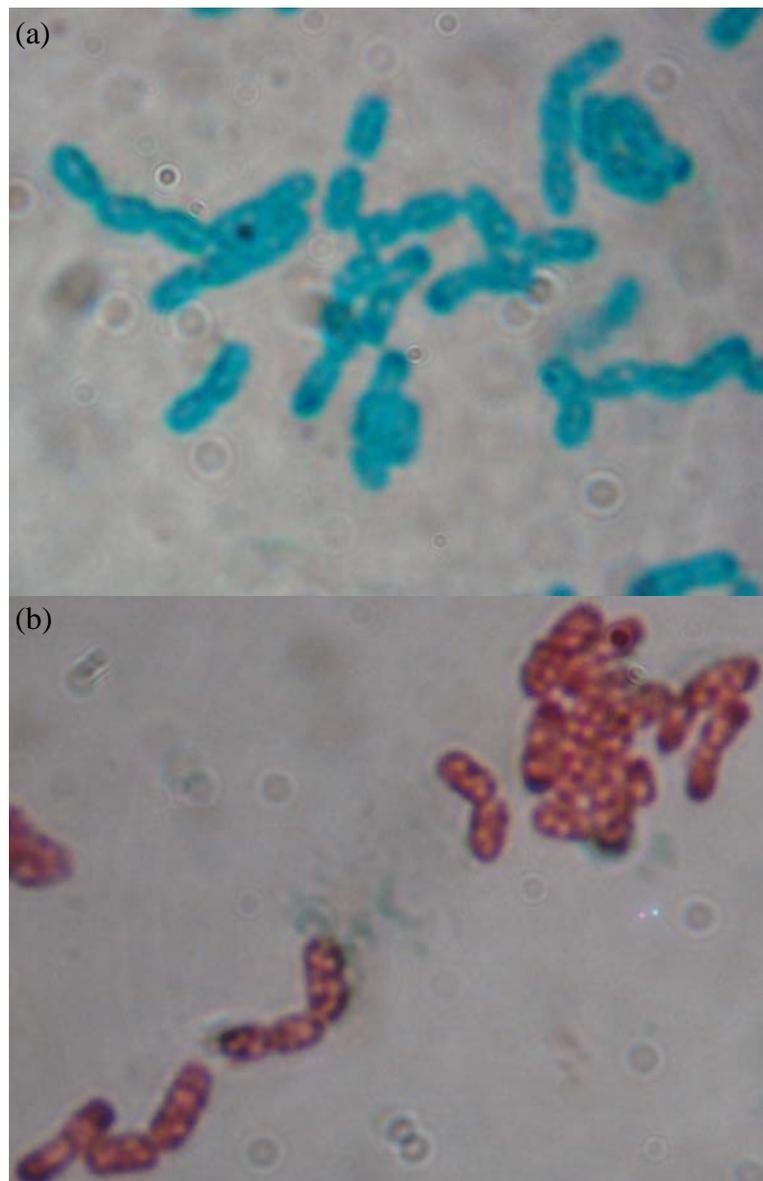


Figura A.1: Imagem da amostra obtida do pré-inóculo (18 horas) com procedimento de coloração de esporos (a) corante verde malaquita (b) corante verde malaquita e contracorante safranina.

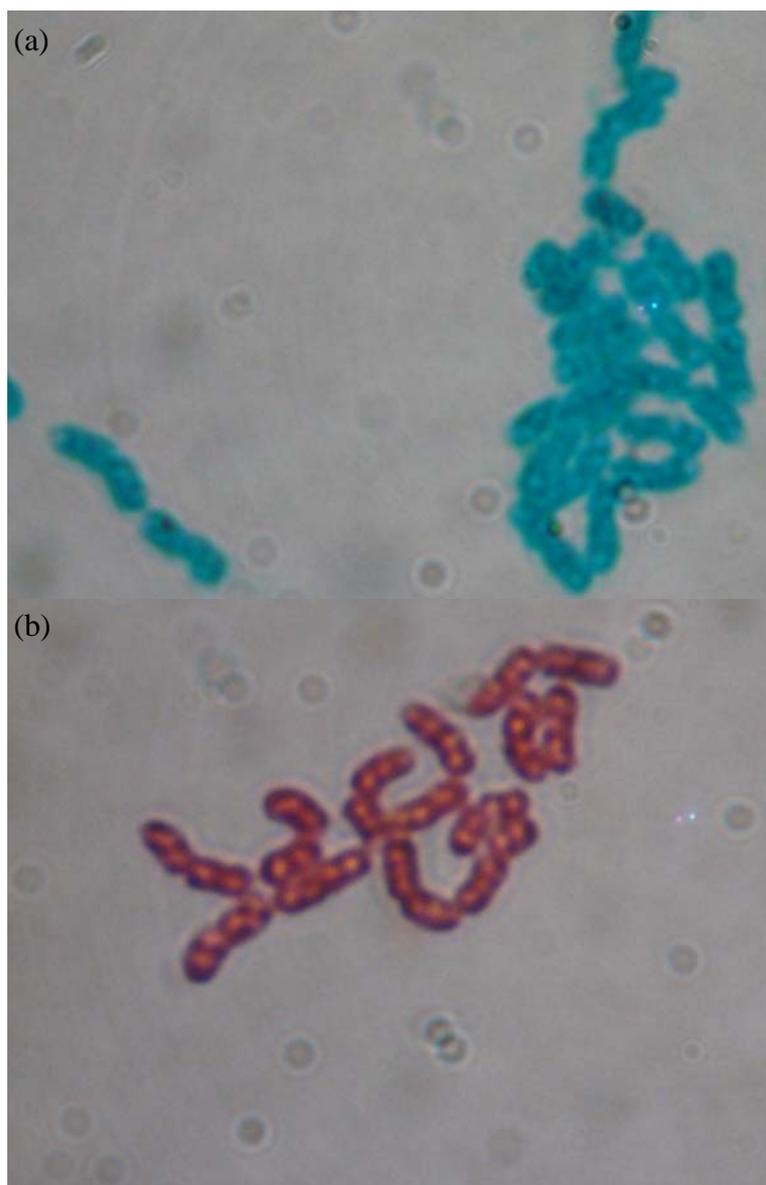


Figura A.2: Imagem da amostra obtida do inoculo (5 horas) com procedimento de coloração de esporos (a) corante verde malaquita (b) corante verde malaquita e contracorante safranina.



Figura A.3: Imagem da amostra do meio de cultura com 5 horas de cultivo com procedimento de coloração de esporos com corante verde malaquita e contracorante safranina.



Figura A.4: Imagem da amostra do meio de cultura com 6 horas de cultivo com procedimento de coloração de esporos com corante verde malaquita.

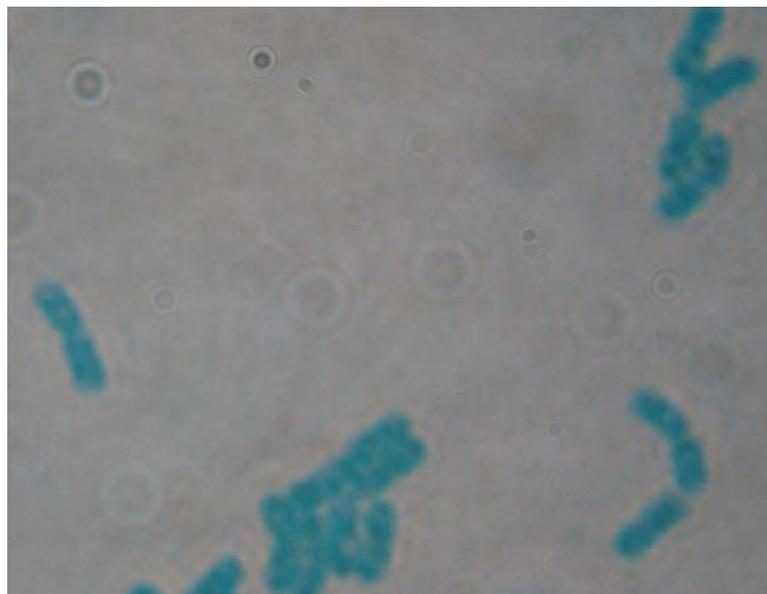


Figura A.5: Amostra do meio de cultura com 7 horas de cultivo com procedimento de coloração de esporos com corante verde malaquita.



Figura A.6: Amostra do meio de cultura com 8 horas de cultivo com procedimento de coloração de esporos com corante verde malaquita e contracorante safranina.



Figura A.7: Amostra do meio de cultura com 9 horas de cultivo com procedimento de coloração de esporos com corante verde malaquita e contracorante safranina.



Figura A.8: Amostra do meio de cultura com 10 horas de cultivo com procedimento de coloração de esporos com corante verde malaquita e contracorante safranina.

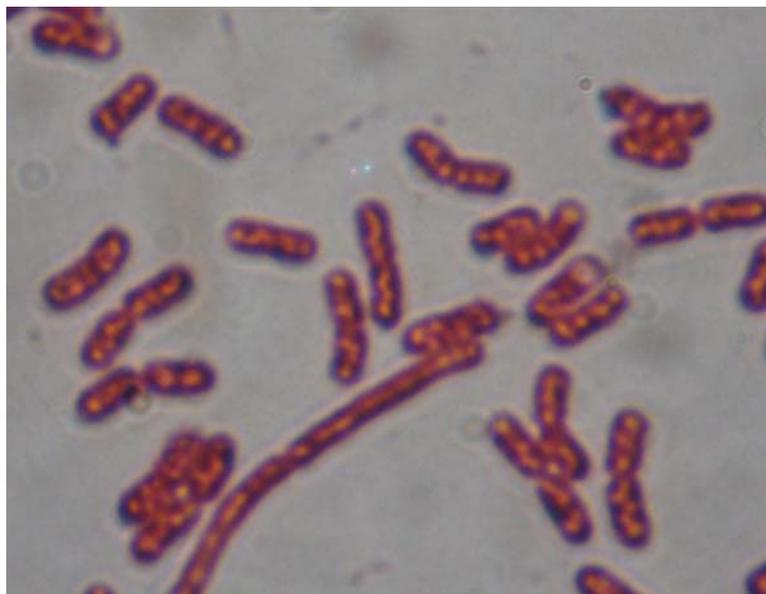


Figura A.9: Amostra do meio de cultura com 11 horas de cultivo com procedimento de coloração de esporos com corante verde malaquita e contracorante safranina.



Figura A.10: Amostra do meio de cultura com 12 horas de cultivo com procedimento de coloração de esporos com (a) corante verde malaquita (b) corante verde malaquita e contracorante safranina.