

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Padronização e escalonamento de inóculo de *Bacillus megaterium* para produção de poli(3-hidroxiacetato)

Marina Acosta dos Santos

Pelotas, 2015

Marina Acosta dos Santos

Padronização e escalonamento de inóculo de *Bacillus megaterium* para produção de poli(3-hidroxiacetato)

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Prof. Dra. Patrícia Diaz de Oliveira

Orientador de Estágio: Prof. Dra. Angelita da Silveira Moreira

Pelotas, 2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA FONTE:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S237p

Santos, Marina Acosta dos

Padronização e escalonamento de inóculo de *Bacillus megaterium* para produção de poli(3-hidroxi-butirato) / Marina Acosta dos Santos. – 43f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2015. – Orientadora Patrícia Diaz de Oliveira.

Banca Examinadora:

Dra. Patrícia Diaz de Oliveira

Msc. Karine Laste Macagnan

Msc. Victoria de Moraes Gonçalves

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado coragem, força de vontade e determinação para superar as dificuldades e alcançar meus objetivos.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Curso de Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de realizar a graduação.

À minha querida orientadora acadêmica, Professora Dra. Patrícia Diaz de Oliveira e à minha orientadora de estágio Professora Dra. Angelita da Silveira Moreira, por aceitarem me orientar nesta etapa final da graduação, sempre dispostas a me ajudar.

À minha banca, Dra. Patrícia Diaz de Oliveira, Msc. Karine Laste Macagnan e Msc. Victória de Moraes Gonçalves, por todo carinho, correções e colaborações feitas nessa etapa tão importante.

A todos os colegas do Laboratório de Biopolímeros, Karine, Mariane, Victória, Júlia, Vanessa, Andiana, Ana, Audrey, Matheus e Dener por me receberem tão bem, tornando minha passagem pelo laboratório muito especial.

Aos meus queridos professores da graduação, por todos os ensinamentos recebidos, em especial a Professora Cláudia Pinho Hartleben, por tudo que ela me ensinou e por ser uma inspiração em relação ao amor pela pesquisa e pela profissão.

Aos meus amados amigos, que fizeram estes quatro anos se tornarem inesquecíveis, sempre presentes quando precisei. Em especial ao Bruno, pela enorme amizade, paciência de sempre e parceria, tanto no trabalho quanto na vida.

À minha família maravilhosa, meus pais Danilo e Dinara e meu irmão João Inácio, por acreditarem em mim, sempre apoiando minhas decisões e por todo o suporte dado para tornar este sonho possível. Vocês são os melhores, amo vocês!

A todos vocês o meu MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

SANTOS, Marina Acosta dos. **Padronização e escalonamento de inóculo de *Bacillus megaterium* para produção de poli(3-hidroxi-butirato)**. 2015. 43 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Devido à crescente preocupação com os impactos ambientais causados pelos plásticos de origem petroquímica, são grandes os esforços de pesquisadores na busca de substitutos biodegradáveis e biocompatíveis para estes materiais. Os polímeros da família dos polihidroxicarboxilatos (PHAs), são produzidos e acumulados no citoplasma bacteriano como forma de reserva de energia e carbono. Isso ocorre quando as condições de crescimento não são favoráveis e há carbono em excesso. Por apresentar propriedades e características semelhantes as do polipropileno (PP), o biopolímero mais estudado entre os PHAs é o poli(3-hidroxi-butirato), P(3HB). O objetivo deste trabalho foi testar diversas proporções entre meio Yest Malt (YM) e cultivo de bactérias, visando determinar qual a melhor alternativa para escalonamento de inóculo de *Bacillus megaterium* para posterior produção de P(3HB). Os tratamentos analisados foram as proporções de 2:3, 3:2, 4:1a e 4:1b, referentes a proporção de bactéria/meio utilizadas. As condições operacionais para produção de inóculo e acúmulo de polímero foram de 36 °C, 150 rpm por 48 horas em agitador orbital. A extração foi feita a partir do solvente clorofórmio, sob agitação magnética e temperatura de 58 °C por 30 minutos. Foi realizada secagem a 70 °C e, após, pesagem para os cálculos de rendimento. Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que as densidades ópticas obtidas pelas diferentes proporções de inóculo apresentaram valores crescentes, e posterior diminuição dos mesmos após a adição de meio depois das primeiras 24h de inóculo, sendo os níveis de crescimento celular compatíveis com os de rendimento de biopolímero. Assim, pode-se concluir que, em termos gerais de análises, as proporções de 3:2 e 4:1a de inóculo (60 e 80 mL de YM inicial, respectivamente) foram os resultados mais satisfatórios para a produção do biopolímero.

Palavras-chave: Poli(3-hidroxi-butirato), biopolímero, *Bacillus megaterium*, inóculo, rendimento.

ABSTRACT

SANTOS, Marina Acosta dos. **Padronization and inoculum scheduling of *Bacillus megaterium* for the production of poly (3-hydroxybutyrate)**. 2015. 43 pages. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Due the growing concern about the environmental impacts of plastics of petrochemical origin, there are great research efforts in the search for biodegradable and biocompatible substitutes for these materials. The family of polymers of polyhydroxyalkanoates (PHAs), are produced and accumulated in the bacterial cytoplasm as a reserve power and carbon. This occurs when growth conditions are not favorable and there is excess carbon. By presenting properties and characteristics similar to those of polypropylene (PP), the most studied among the biopolymers PHA is poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB). The objective of this study was to test various ratios through Yest Malt (YM) and cultivation of bacteria, in order to determine the best alternative for *Bacillus megaterium* inoculum scheduling for subsequent production of P(3HB). Treatments analyzed were the ratios 2:3, 3:2, 4:1a, 4:1b, relating the proportion of bacteria/media used. Operating conditions for inoculum production and the accumulation of polymer was 36 ° C, 150 rpm for 48 hours in an orbital shaker. The extraction was done from chloroform solvent under magnetic stirring for 30 minutes at 58 ° C. Drying was carried out at 70 ° C and for yield and weight calculations. The results obtained in this study show that the optical density (DO) obtained by different inoculation ratios had increased values, and subsequent reduction thereof after adding medium after the first 24 hours after inoculation. The cell growth levels compatible with yield biopolymer. Can be concluded that, in general analysis, the proportions of 3:2 and 4:1a inoculum (initially 80ml and 60 of YM, respectively) showed the most satisfactory results for the production of biopolymer.

Keywords: Poly (3-hydroxybutyrate), biopolymer, *Bacillus megaterium*, inoculum income.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura geral de PHAs e seus principais representantes	15
Figura 2	Estrutura do poli(3-hidroxibutirato)	17
Figura 3	Microscopia de transmissão de elétrons (x 30.000) de células de <i>B. megaterium</i> em diferentes tempos de cultivo	18
Figura 4	Fluxograma da metodologia de padronização de inóculo com <i>Bacillus megaterium</i>	25
Figura 5	Relação do uso de escalonamento de inóculo com a Densidade óptica na fermentação 1	29
Figura 6	Relação do uso de escalonamento de inóculo com a Densidade óptica na fermentação 2	29
Figura 7	Relação entre o Rendimento de P(3HB) frente o uso de escalonamento de inóculo das fermentações 1 e 2, em ordem crescente de quantidade de meio, sendo “4:1 a” com acréscimo de meio e “4:1 b” sendo controle	30
Figura 8	Relação entre a Densidade óptica (DO) e o Rendimento de P(3HB) frente o uso de escalonamento de inóculo, onde F1 e F2 representam os valores de DO da primeira e a segunda fermentações, em ordem crescente de quantidade de meio, e C1 e C2 seus respectivos controles	31

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Proporção em volume de suspensão bacteriana/ meio YM para cada tratamento. 24
- Tabela 2** Densidades ópticas, Média de DO e Desvio Padrão das triplicatas de cada grupo experimental de proporção bactéria/meio 28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AN - Ágar nutritivo

°C - Grau(s) Celsius

cm - Centímetros

CDTec - Centro de Desenvolvimento Tecnológico

h - Hora

P(3HB) - Poli(3-hidroxiacetato)

F1 - Fase de multiplicação celular

F2 - Fase de acúmulo de P(3HB)

rpm - Rotações por minuto

mcs - Massa celular seca

mf - Massa total do filme

mg - Miligrama(s)

min - Minuto(s)

mL - Mililitro(s)

µm - Micrômetro

µL - Microlitro

YM - Yest Malt

PP - Polipropileno

PHAs - Polihidroxialcanoatos

PHV - Poli(hidroxiacetato)

PHVB - Poli(hidroxiacetato-co-acetato)

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
2. Objetivo.....	13
3. Revisão Bibliográfica.....	14
3.1. Biopolímeros.....	14
3.1.1. Polihidroxialcanoatos (PHAs).....	15
3.1.2. Poli(3-hidroxi-butirato) P(3HB).....	16
3.2. Produção de P(3HB).....	17
3.2.1. Produção de P(3HB) por <i>Bacillus megaterium</i> ...	19
3.2.2. Padronização de produção.....	20
4. Materiais e Métodos.....	23
4.1. Microrganismos.....	23
4.2. Produção de P(3HB).....	23
4.2.1. Padronização de inóculo.....	24
4.2.2. Extração de P(3HB).....	25
4.2.3. Determinação de rendimento da extração.....	26
5. Resultados e Discussão.....	27
6. Conclusões.....	32
7. Perspectivas.....	33
8. Referências.....	34

1. INTRODUÇÃO

O presente estudo foi desenvolvido no período de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) do Curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL). O estágio foi realizado no período de 10 de agosto a 10 de dezembro de 2015, no Laboratório de Biopolímeros do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da UFPeL, localizado no campus Capão do Leão, onde, neste período, foram realizados todos os experimentos.

A utilização de plásticos, que têm como matéria prima o petróleo, é muito presente no cotidiano das pessoas, devido às suas características de resistência e durabilidade. Estes produtos estão inseridos nas mais variadas áreas, seja em aparelhos, utensílios e embalagens. Porém, ao mesmo tempo em que apresenta diversas vantagens, há a crescente preocupação com as questões ambientais relacionadas a esses plásticos (LUENGO et al., 2003).

A população, nos dias atuais, está em torno de 7 bilhões de pessoas (POPULACION REFERENCE BUREAU, 2015), e estas, produzem diariamente, um volume absurdo de resíduos pelo descarte desses plásticos, que é feito de forma indiscriminada pela população (FRANCHETTI & MARCONATO, 2006). Os plásticos convencionais causam vários impactos ambientais pois não são afetados quimicamente pela maioria das substâncias e sofrem uma degradação muito lenta. Alguns deles geram problemas em aterros sanitários, alterações na decomposição de outros compostos, enchentes nas cidades, causando obstruções de sistemas de esgoto, além de grandes quantidades de plástico nos oceanos, que causam graves impactos aos animais (REDDY, 2003).

Visando diminuir estes impactos, é crescente a busca por materiais com características semelhantes que possam substituir o uso de plásticos convencionais. Os biopolímeros são potenciais candidatos para esta substituição, pois apresentam uma degradação mais rápida em condições apropriadas, além de apresentarem biocompatibilidade com a espécie humana, entre outras vantagens. Biopolímeros como os da família dos polihidroxialcanoatos (PHAs), podem ser obtidos a partir de

microrganismos submetidos a bioprocessos. Os PHAs são produzidos por bactérias e acumulados em forma de inclusões de poliésteres insolúveis, podendo alcançar até 90% da massa celular (SUDESH, 2011). O acúmulo deste biopolímero ocorre quando há excesso de fonte de carbono no meio utilizado e limitação de algum nutriente essencial (P, S, K) (MADISON, 1999). Dentre os polímeros desta família, o mais estudado e utilizado é o P(3HB), pois apresenta diversas características semelhantes ao polipropileno (PP), que é de fonte petroquímica e um dos plásticos mais utilizados (CHANPRATEEP, 2010).

Mais de 300 microrganismos possuem capacidade conhecida de produzir PHAs. Para serem utilizados para produção em escala industrial, precisam atender a determinados requisitos, como apresentar elevada velocidade de crescimento, utilizar diferentes fontes de carbono, acumular elevadas concentrações de polímero em pouco tempo, visando altos rendimentos, alcançar alta densidade celular, assim como, apresentar taxa elevada de conversão de substrato em polímero (LEE, 1996). Todos os fatores envolvidos na síntese de PHA objetivam aumentar o rendimento e minimizar os custos de produção, pois estes são bem elevados, principalmente na etapa do processo de extração. Estes custos elevados são um grande inconveniente para a produção e utilização dos biopolímeros, podendo chegar até cinco vezes o valor utilizado para a produção de plásticos convencionais (KUNASUNDARI & SUDESH, 2011).

2. OBJETIVO

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi padronizar as condições operacionais do inóculo de *Bacillus megaterium* através de escalonamento de produção, visando aumentar a concentração bacteriana e maior rendimento de P(3HB).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOPOLÍMEROS

Os polímeros fósseis são utilizados nos mais variados segmentos industriais, desde embalagens, eletroeletrônicos, automobilístico, têxtil, agricultura, entre outros. Servem como alternativa para substituir outros materiais, devido a escassez destes, altos custos de obtenção ou até mesmo pelas melhores propriedades apresentadas pelos materiais em questão (PRADELLA, 2006).

Ao mesmo tempo em que sua utilização apresenta diversos benefícios, há uma crescente preocupação com os danos ambientais causados por sua baixa biodegradabilidade. Associado a isto, está o aumento do custo da principal matéria-prima envolvida na produção dos polímeros fósseis, o petróleo (MANO & MENDES, 1999; VOGELSAGER et al., 2004). Por serem materiais extremamente estáveis, muitos destes polímeros podem levar mais de 100 anos para se decompor, gerando alterações nos ecossistemas terrestres e marítimos (CHIELLINI & SOLARO, 1996). Sendo assim, novos tipos de polímeros foram desenvolvidos, sendo chamados de biopolímeros (BORSCHIVER et al., 2008).

A definição de biopolímeros se dá a qualquer polímero (polissacarídeo, ácido nucléico, proteína, etc) que seja produzido a partir de um organismo vivo (PRADELLA, 2006), e que possam ser obtidos através de processos biológicos (QUEIRÓZ & MAUGERI, 1989). Biopolímeros podem ser produzidos de forma intra ou extracelular, de acordo com a bactéria utilizada. Muitos biopolímeros vêm sendo sintetizados e, a partir deles, muitos microrganismos e enzimas capazes de degradá-los têm sido catalogados (CHANDRA & RUSTGI, 1998).

3.1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)

Os PHAs podem ser classificados como homo ou heteropoliésteres, e um grande número de organismos procariotos podem acumulá-lo em forma de grânulos, podendo atingir até 90% do seu peso seco (MADISON & HUISMAN, 1999).

A síntese de PHA acontece em duas fases. No primeiro momento, ocorre uma fase de crescimento inicial não limitado, em que o objetivo é o crescimento celular, após, há a fase de produção, momento em que ocorre o acúmulo do polímero. Isto apenas é possível quando há limitação de algum nutriente essencial, tal como P, Fe, Mg, N, juntamente com um excesso de fonte de carbono (KHANNA & SRIVASTAVA, 2005).

Dentre a família dos polihidroxicanoatos (Figura 1), o poli(3-hidroxiacetato) [P(3HA)], poli(3-hidroxiacetato) [P(3HB)], poli(3-hidroxiacetato) (PHV), assim como o poli(hidroxiacetato-co-acetato) (PHVB), estão entre os PHAs mais conhecidos (TSUGE, 2002).

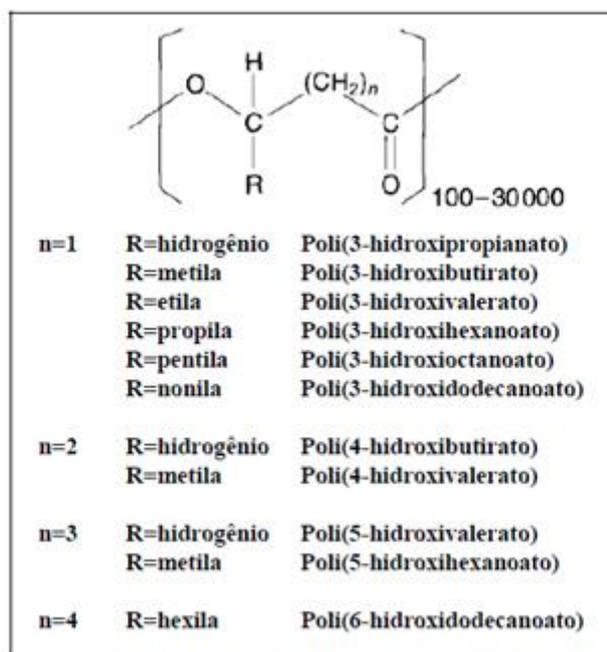


Figura 1: Estrutura geral de PHAs e seus principais representantes. Fonte: LEE, 1996.

Entre as características que destacam-se nos PHAs estão a biocompatibilidade aos seres vivos, a biodegradabilidade e a termoplaticidade. Algumas características, como insolubilidade em água, alto grau de polimerização e

elevada cristalinidade tornam os PHAs materiais muito semelhantes aos plásticos convencionais (REDDY et al., 2003).

Além das características citadas, há propriedades termoplásticas tais como alta resistência a impactos e pressão, ponto de fusão elevado e baixa rigidez que são muito procuradas em PHAs, levando em consideração que microrganismos diferentes, dão origem a bioplásticos com composições e características diferentes (CANEVAROLO, 2003).

Mesmo sendo bastante estáveis, ao entrarem em contato com um ambiente microbiologicamente ativo, os PHAs sofrem a ação de enzimas e são degradados. Sob condições aeróbicas, CO₂ e H₂O são novamente produzidos, fechando o ciclo sem causar impactos significativos ao ambiente (GARCIA, 2006).

3.1.2 POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) – P(3HB)

Em 1923, Lemoigne observou que, após sofrer autólise em água destilada, culturas da bactéria *Bacillus subtilis* liberavam um ácido desconhecido, resultando na redução do pH. Posteriormente, Lemoigne identificou em outro estudo que o ácido liberado durante a autólise de *Bacillus megaterium* se tratava do ácido 3-hidroxi-butírico, que é acumulado na forma de polímero poli(3-hidroxi-butirato), no citoplasma da bactéria (LEMOIGNE, 1926).

Tempos depois, em 1958, Macrae e Wilkinson propuseram a via metabólica do P(3HB). Eles observaram que, em condições onde o meio possuía altas concentrações de glicose/nitrogênio, a bactéria *B. megaterium* estocava o homopolímero. Posteriormente, foi descoberto que a degradação ocorre na ausência da fonte de carbono e energia (LUNDGREN et. al, 1965), tendo assim, sua função atribuída a reserva de carbono e energia (SCHLEGEL et al., 1961; MADISON & HUISMAN, 1999).

O poli(3-hidroxi-butirato) é definido como um homopolímero constituído por unidades monoméricas de quatro átomos de carbono (Figura 2).

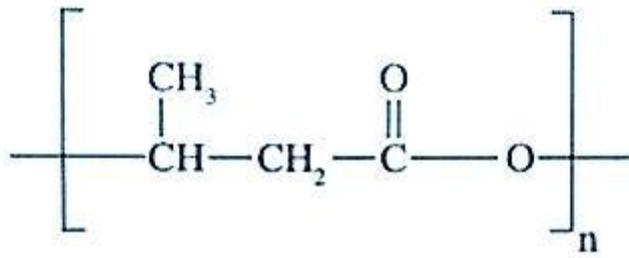


Figura 2: Estrutura do poli(3-hidroxiobutirato). Fonte: SCHROFER, 2015.

Este poliéster é altamente cristalino, apresenta temperatura de fusão próxima a 176 °C e temperatura de transição vítrea de 5°C, sendo estas propriedades bastante semelhantes as do polipropileno (PP) (RAGHAVAN, 1995). É um polímero 100% biodegradável, solúvel em alguns solventes orgânicos e insolúvel em água (CHANDRA; RUSTGI, 1998). Entre as vantagens apresentadas por este poliéster está a sua biocompatibilidade (IKEJIMA et al., 1998).

Devido ao aumento do valor do petróleo e também a sua escassez, na década de 1970, o P(3HB) recebeu maior atenção e passou a ser considerado um potencial candidato para substituir os plásticos de origem petroquímica, pelas suas propriedades serem semelhantes as do polipropileno e também pela possibilidade de síntese a partir de fontes renováveis (BRAUNEGG et al., 1998).

A junção destes fatores justificam a elevada importância do P(3HB) na classe dos alcenoatos, sendo o mais estudado e caracterizado até agora (TSUGE, 2002).

3.2 PRODUÇÃO DE P(3HB)

Mais de 300 microrganismos são conhecidos devido a sua capacidade de produzir PHAs. São bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, provindas dos mais variados locais da natureza (BYROM, 1987). Dentre estes microrganismos, apenas uma pequena parcela é utilizada visando a produção de P(3HB), entre eles estão *Alcaligenes latus*, *Escherichia coli* recombinante, *Cupriavidus necator*, *Ralstonia sp.*, *Azotobacter vinelandii*, *Klebsiella aerogenes* (LEE, 1996) e mais recentemente,

Pseudomonas spp. (CROCHEMORE, 2012) e *Bacillus megaterium* (RODRIGUES et al., 2014).

Grande parte das bactérias que sintetizam P(3HB), em condições normais de cultivo, acumulam cerca de 1 a 15% do biopolímero em seu interior, valores inferiores quando comparados aos valores alcançados quando as bactérias são submetidas a condições especiais de crescimento, podendo chegar a 90% de sua massa celular seca (KHANNA & SRIVASTAVA, 2005), como mostra a Figura 3, onde a, b e c demonstram a evolução da síntese no decorrer do tempo de fermentação.

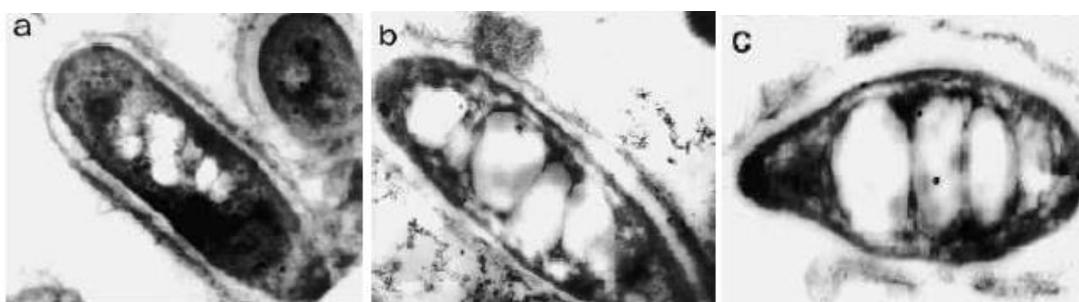


Figura 3: Microscopia de transmissão de elétrons (x 30.000) de células de *B. megaterium* em diferentes tempos de cultivo com acúmulo de P(3HB). Fonte: GOUDA et al., 2001.

Os grânulos acumulados atingem o tamanho médio de 0,2 a 0,5µm e através de uma análise microscópica de força atômica, foi observada sobre a superfície dos grânulos de P(3HB) a existência de uma monocamada proteica (SUDESH et al., 2004).

Vários fatores são observados quando se trata da seleção de microrganismos capazes de produzir o P(3HB) em larga escala, entre eles, os mais relevantes são o rendimento obtido, sendo o mínimo aceitável a partir de 60% da massa celular convertida em polímero, a alta taxa de conversão de substrato em polímero (RAMSAY et al., 1990; LEE, 1996), baixo custo dos substratos utilizados como fonte de carbono, a elevada taxa de crescimento microbiano, entre outros. Analisando-se as etapas da produção, observa-se que o que eleva o custo da obtenção deste biopolímero é o seu processo de extração (MACAGNAN, 2014).

Existem dois grupos de microrganismos que produzem PHA, divididos de acordo com as condições necessárias de cultivo para que a biossíntese do polímero ocorra. No primeiro grupo estão *Bacillus megaterium*, *Ralstonia eutropha*,

Pseudomonas oleovorans, entre outros, estes microrganismos necessitam da limitação de algum nutriente essencial associado a uma fonte de carbono em excesso para que a biossíntese aconteça. Diferente destes, os microrganismos do segundo grupo, como *Escherichia coli* recombinante, *Alcaligenes latus* e *Alcaligenes vinelandii* não necessitam desta limitação, pois acumulam o polímero durante o crescimento (LEE, 1996).

3.2.1 PRODUÇÃO DE P(3HB) POR *Bacillus megaterium*

A primeira descrição deste microrganismo ocorreu em 1884 por De Bary, podendo ser encontrado em regiões com as mais variadas temperaturas, em solos, sedimentos e água do mar (VARY, 1992). Sua conformação apresenta-se de forma cilíndrica com extremidades arredondadas, alcançando diâmetros de 1,5 µm e comprimento entre 2,5-6,0 µm. São bactérias esporulantes, e estes esporos possuem dimensões de 0,8-1,2 por 1,5-2,0 µm (MURAO et al., 1964).

Um dos fatores limitantes da produção de P(3HB) é o valor elevado das fontes de carbono, fazendo-se necessário a busca por fontes de carbono com valores mais baixos que forneçam nutrientes para os microrganismos, incluindo os resíduos agroindustriais (BRAUNEGG, 2001; VALAPPIL et al, 2007). No Brasil, a utilização de sacarose como fonte de carbon, obtida a partir da cana-de-açúcar, produzida em grande quantidade no país, reduz os custos do processo.

Levando esta problemática em consideração, foi observado que *Bacillus megaterium* possui a capacidade de crescimento e acúmulo de P(3HB) utilizando diversas fontes de carbono, como glicose, sacarose, lactose, maltose, frutose, xilose, melão de cana, gluconato de sódio, entre outras (GOUDA et al., 2001; FULL et al., 2006).

Visando melhorias no processo de produção e maior rendimento do biopolímero, foram realizados diversos estudos com *Bacillus megaterium*, analisando sua capacidade de acúmulo de P(3HB) em diferentes fases do crescimento, assim como em diferentes condições de meio de cultura. Durante a fase de crescimento, período em que ocorre a adaptação da bactéria ao meio, foi observada a rápida diminuição no tamanho e número dos corpos de inclusão por

célula e posterior aumento do volume relativo dos corpos de inclusão na fase exponencial. Na fase estacionária, as células aparentam estar completamente cheias, não havendo assim, aumento no tamanho das mesmas. Em culturas que ficaram mais tempo na fase estacionária foi observado consumo de P(3HB), resultando na diminuição do tamanho e número dos grânulos (MCCOOL et al., 1996).

Estudos também foram realizados variando a fonte de carbono utilizada no meio de cultivo (GOUDA et al., 2001). Gouda e colaboradores (2001) utilizaram melaço de cana de açúcar, com objetivo de baratear a matéria prima. Foi observado que em cultivo de 4 L, o acúmulo obtido foi de 59,4% de P(3HB). Outro estudo utilizou xarope de tâmaras e melaço de beterraba como fonte de carbono, resultando em acúmulo de 52% e 50% de P(3HB), respectivamente. Neste mesmo estudo, foi observado que o acúmulo de P(3HB) em *B. megaterium* possui relação com o crescimento celular (OMAR et al., 2001).

Dentre diversos isolados do gênero *Bacillus* que sintetizam o P(3HB), foi observado que uma das cepas de *B. megaterium* foi a que apresentou o maior acúmulo do polímero, quase atingindo 50% de seu peso seco (ASLIM et al., 2002).

3.2.2 PADRONIZAÇÃO DE PRODUÇÃO

A padronização dos processos de produção de P(3HB), como de qualquer outro polímero ou produto, visa otimizar os resultados obtidos. É de grande importância também a reprodutibilidade do experimento, objetivando aumentar a qualidade do produto obtido.

Existem diversas formas de se fazer a padronização de um método, pois as variáveis que podem ser alteradas nesse tipo de processo são muitas, como por exemplo, proporção de inóculo, agitação, oxigênio disponível, temperatura, fontes de carbono, recipiente fermentativo (fermentador, *Erlenmeyer* em incubador), entre outras (SPEROTTO, 2014).

Em termos gerais, as condições a que o cultivo é submetido pode prejudicar ou otimizar o rendimento do experimento. Em estudos com *Pseudomonas*, uma das alterações envolve o preparo de inóculo a partir de uma suspensão bacteriana em

meio nutritivo contendo a fonte de carbono escolhida associado a diferentes combinações de temperatura e agitação pré determinados (CROCHEMORE, 2013).

Ao utilizar *Saccharomyces boulardii* em experimento que visava avaliar o crescimento microbiano, a variável analisada foi a forma em que a fermentação é conduzida em fermentador e agitador orbital, associada a aeração oferecida em cada um dos procedimentos, visando a produção em nível industrial (PODLECH, 2007).

Também relacionado ao rendimento, mas desta vez utilizando *Bacillus megaterium*, foi realizado estudo em que diversas fontes de carbono foram utilizadas, mantendo temperatura e agitação iguais em todos os grupos avaliados (MAINKA, 2014).

Há também muitos estudos para a padronização de inóculo para a produção de P(3HB) por diferentes microrganismos, seja em termos de quantidade ou níveis de crescimento. Em experimento de produção de alginato bacteriano, utilizando a bactéria *Azotobacter vinelandii*, a padronização foi realizada a partir do inóculo, que após a fase de cultivo, com tempo e temperatura estabelecidos, teve sua densidade óptica medida por espectrofotômetro e, somente após atingir o valor de 0,5 à 620 nm foi utilizado na etapa de fermentação (GARCIA-CRUZ, 2008). Em outro estudo com a mesma bactéria, a padronização foi realizada da mesma forma, porém os cultivos apenas foram transferidos para o meio de produção ao alcançar a densidade óptica entre 0,7-0,9 à 620 nm (BELLENGER et al., 2008; SILVA, 2010).

Ramadas e colaboradores (2009) realizaram um estudo relacionando a concentração de pré-inóculo com o rendimento de P(3HB) sintetizado por *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. Os autores variaram o volume de 1 a 5 mL de pré-inóculo adicionado na fase de obtenção do inóculo. Concluíram que o volume de 2 mL, que continha 8×10^8 UFC/mL, foi o que gerou maior rendimento de P(3HB).

Para produção de P(3HB) utilizando a bactéria *Bacillus megaterium*, Kulprecha e colaboradores (2009), realizaram inóculo e, deste, 2 mL foram adicionados a 50 mL de meio de produção. As fontes de carbono utilizadas foram sacarose e sulfato de amônia e sacarose e ureia, gerando rendimento de polímero de 28,57% e 30,20%, respectivamente.

A literatura é escassa quanto a estudos relacionados a produção de P(3HB) que descrevam a metodologia de obtenção do inóculo, não apresentando a

quantificação bacteriana dos mesmos (BARBOSA et al., 2005; GRIGULL et al., 2008; DALCANTON et al., 2010; KANJANACHUMPOL et al., 2013).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS

Neste estudo foi utilizada uma linhagem de *Bacillus megaterium* cepa CN3 oriunda da bacterioteca da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Clima Temperado. Manteve-se a linhagem preservada pela técnica de repiques mensais em ágar nutritivo (AN) e mantidas sob refrigeração a 4°C no Laboratório de Biopolímeros do CDTec da UFPel.

4.2 PRODUÇÃO DE P(3HB)

A produção de P(3HB) foi realizada em duas etapas, sendo a primeira a etapa em que ocorre a multiplicação celular. Foi utilizado o meio YM, o qual foi esterilizado por 15 min a 121 °C. A etapa de multiplicação celular foi realizada em frascos *Erlenmeyers* de 500 mL, esterilizados previamente por 45 min a 121 °C. Repiques multiplicativos contendo meio AN foram obtidos após 48 horas e incubados a 36 °C em estufa antes da etapa de inóculo. A proporção de suspensão bacteriana em meio YM para o preparo do inóculo serão descritas a seguir.

A multiplicação de células resultante da primeira etapa foi utilizada na etapa seguinte. Na segunda etapa, ocorre o acúmulo ou produção de P(3HB) utilizando meio mineral F4 (OLIVEIRA, 2010) durante 48 horas a 150 rpm e 36 °C em agitador orbital, também em *Erlenmeyers* de 500 ml, esterilizado por 15 min a 121 °C.

Amostras foram coletadas nas duas etapas do processo para posterior análise do rendimento de biopolímero e crescimento bacteriano (DO). Para a leitura da DO, foi utilizado espectrofotômetro com comprimento de onda de 620 nm e diluição de (1:20). Foram realizadas duas fermentações para comparação dos resultados. As análises foram feitas em triplicata e as medias foram analisadas estatisticamente pelo programa Statistix 9.0, teste de Tukey $p < 0,05$.

4.2.1 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Quatro *Erlenmeyers* de 500ml foram inicialmente utilizados para o preparo do inóculo, onde cada um deles possuía um volume diferente de meio YM e suspensão bacteriana obtidas a partir do repique multiplicativo para posterior padronização.

As proporções analisadas foram 80 ml de meio YM + 20 mL de suspensão bacteriana, 60 ml de meio + 40 mL de suspensão bacteriana e 40 ml de meio + 60 mL de suspensão bacteriana, totalizando todos 100 mL de cultivo. Para o controle, foram adicionados 160 mL de meio YM + 40 mL de suspensão bacteriana (Quadro 1). O controle foi mantido em dois tempos de incubação, sendo, na primeira fermentação 48 horas e, na segunda por 24 horas.

Tabela 1. Proporção em volume de suspensão bacteriana/ meio YM para cada tratamento.

Tratamento	Proporção	Volume meio YM	Volume de suspensão bacteriana	Volume final
A	4:1	160 mL	40 mL	200 mL
B	2:3	40 mL	60 mL	100 mL
C	3:2	60 mL	40 mL	100 mL
D	4:1	80 mL	20 mL	100 mL

Após 24 horas de cultivo, mais 100ml de meio YM foram adicionados aos cultivos, com exceção do controle, visando o aumento do crescimento bacteriano. As condições de cultivo utilizadas foram 36 °C e 150 rpm por 48h em incubador agitador orbital.

Após, estes cultivos foram transferidos para a etapa de acúmulo de polímero. Nessa etapa, *Erlenmeyers* com volume de 200 mL de fermentação contendo meio F4 + 300 µl de óleo de arroz, utilizado como antiespumante e suplemento nutricional, e 20% de inóculo (Figura 4).

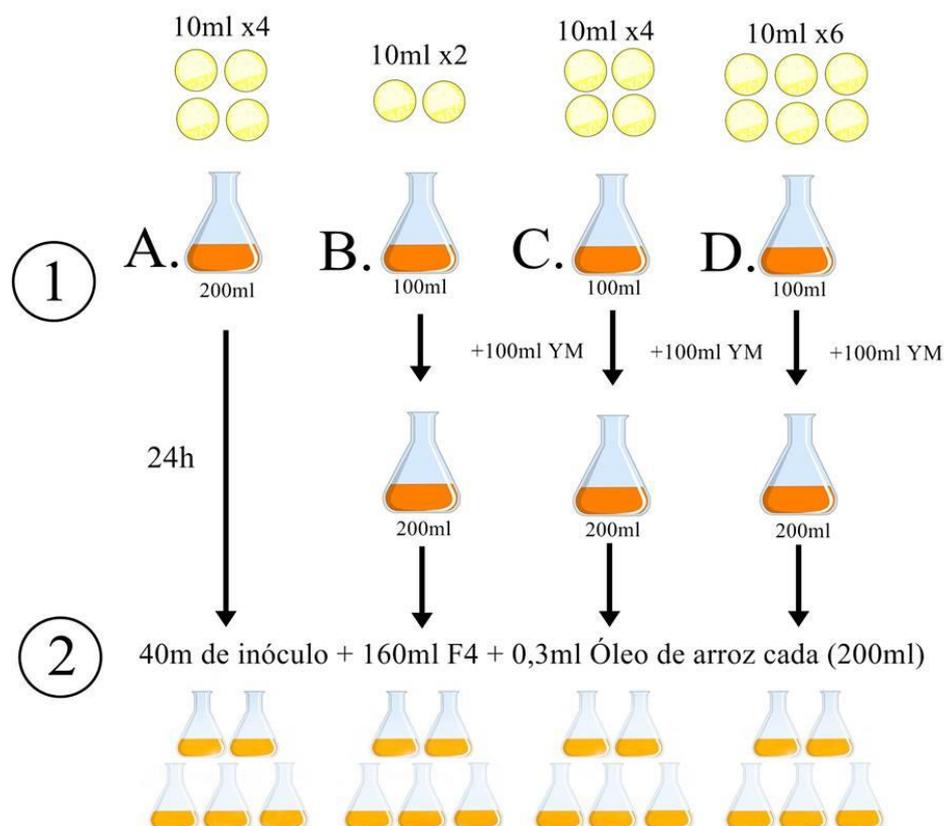


Figura 4: Fluxograma da metodologia de padronização de inóculo com *Bacillus megaterium*.

4.2.2 EXTRAÇÃO DE P(3HB)

Após as 48 horas de fermentação, o cultivo foi centrifugado a 11000 rpm por 30 min a 4 °C. As centrifugações foram feitas em triplicata. Os *pellets* resultantes foram ressuspensos em solução salina 0,89% e centrifugados mais uma vez nas mesmas condições. Após as centrifugações, os *pellets* obtidos foram colocados em estufa a 70 °C para secagem até atingir peso constante para obtenção da massa celular seca (MCS) e posterior trituração.

Para a realização da extração de P(3HB) a partir de solvente orgânico, foi adicionado o solvente clorofórmio nos MCS na proporção de 40:1 e submetidos a um agitador magnético por 30 min a 58 °C. Após este período, as amostras com o solvente foram colocadas em um funil de decantação, onde foi adicionada a mesma quantidade de água destilada e levemente agitada para formar duas fases (orgânica e aquosa). A fase orgânica foi transferida para placa de Petri para a evaporação do solvente e formação do biofilme (MACAGNAN, 2014).

4.2.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO

Após a evaporação do solvente, os filmes formados foram pesados para a realização do cálculo de rendimento.

O rendimento foi determinado a partir da equação 1, onde *mf* corresponde a massa total do filme e *mcs* a massa celular seca.

$$\text{rendimento} = \frac{mf}{mcs} \times 100$$

(1)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A densidade óptica mais elevada obtida após o crescimento e multiplicação celular, nas duas fermentações foi observada no tratamento C (correspondente ao inóculo inicial de 60 mL de meio + 40 mL de suspensão bacteriana). Na primeira fermentação o tratamento C atingiu a DO de 0,72 na primeira etapa de produção de inóculo e 0,65 após a adição de 100 ml de meio, enquanto na segunda fermentação os valores foram de 0,63 na primeira etapa e 0,51 após a adição de meio (Figuras 5 e 6).

A segunda DO mais elevada foi referente ao tratamento D (inóculo inicial de 80 mL de meio + 20 mL de suspensão bacteriana), mostrando que a multiplicação celular da bactéria varia dependendo da proporção de nutrientes disponíveis em relação a sua velocidade de crescimento. Isto indica que o tratamento C é mais adequada ao ritmo de crescimento do *Bacillus megaterium* na fase de multiplicação celular do processo fermentativo. O controle obteve valores abaixo dos demais, tanto no período de 24h quanto no de 48h de incubação.

Tabela 2. Densidades ópticas, Média de DO e Desvio Padrão das triplicatas de cada tratamento experimental de proporção bactéria/meio.

Amostras	DO (1:20) - 24h	Média/Desvio Padrão	DO (1:20) - 48h	Média/Desvio Padrão
B F1	8,6	0,43 ($\pm 0,01$)	9,8	0,49 ($\pm 0,01$)
B F1	8,8		9,8	
B F1	8,8		9,6	
C F1	14,4	0,72 ($\pm 0,01$)	13	0,65 (0)
C F1	14,6		13	
C F1	14,4		13	
D F1	12,4	0,63 ($\pm 0,02$)	10,2	0,51 ($\pm 0,01$)
D F1	12,4		10	
D F1	12,8		10,2	
A F1	8,8	0,45 ($\pm 0,01$)	7,8	0,39 ($\pm 0,01$)
A F1	9		7,8	
A F1	9		7,6	
B F2	10,8	0,54 ($\pm 0,03$)	15	0,75 ($\pm 0,02$)
B F2	11,2		14,8	
B F2	10,6		15,2	
C F2	16,8	0,83 ($\pm 0,01$)	15	0,73 ($\pm 0,01$)
C F2	16,6		14,8	
C F2	16,6		14,8	
D F2	14,8	0,73 ($\pm 0,02$)	12,2	0,62 ($\pm 0,01$)
D F2	14,8		12,4	
D F2	14,4		12,4	
A F2	10,6	0,53 ($\pm 0,01$)	9	0,45 (0)
A F2	10,6		9	
A F2	10,8		9	

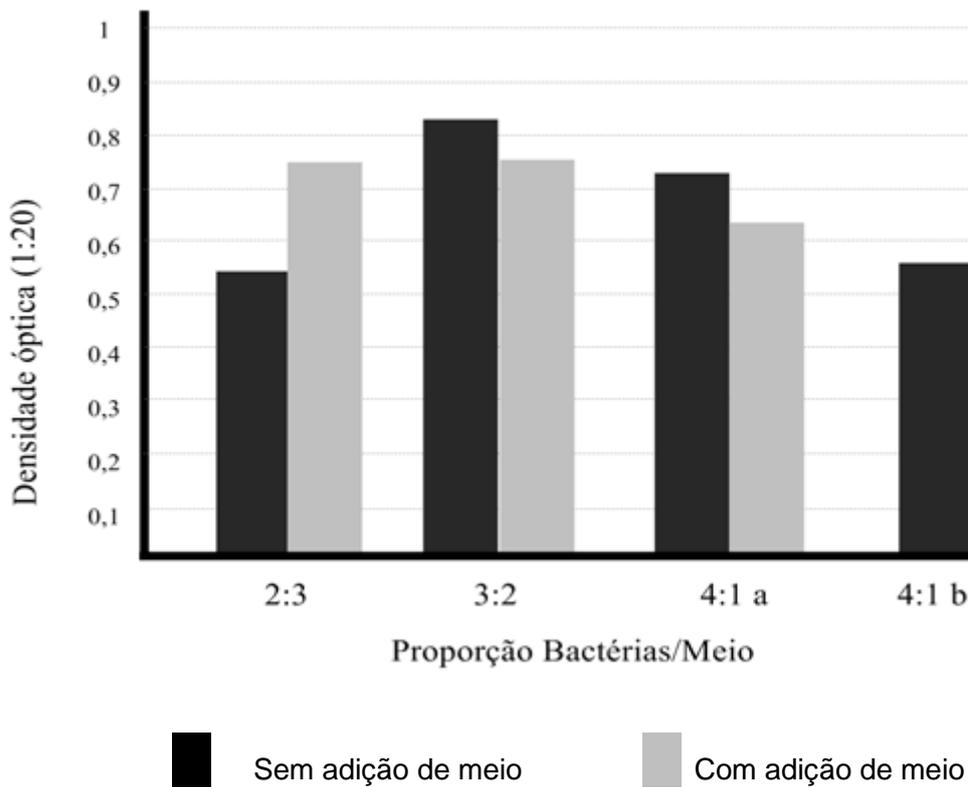


Figura 5: Relação do uso de escalonamento de inóculo com a Densidade óptica na fermentação 1.

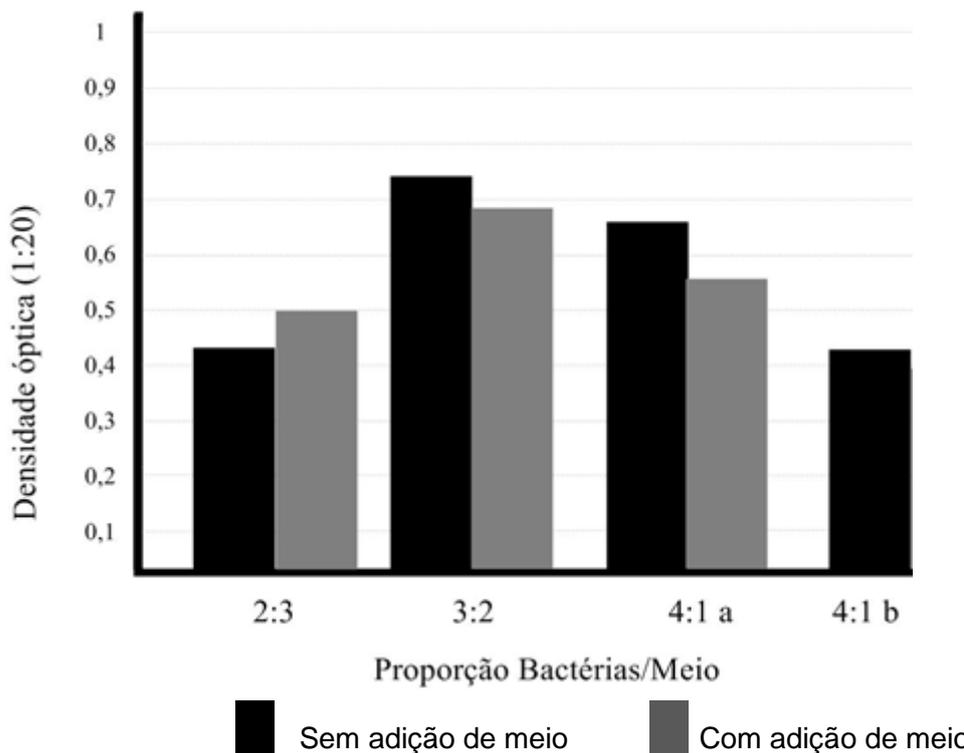


Figura 6: Relação do uso de escalonamento de inóculo com a Densidade óptica na fermentação 2.

Os valores de DO para os inóculos obtidos em 48h apresentaram valores menores do que os registrados para 24h. Tal comportamento pode estar relacionado à curva de crescimento do microrganismo, a qual indica que a fase estacionária é

atingida em 22h. A curva de crescimento desta bactéria foi realizada por pesquisadores do Laboratório de Biopolímeros e ainda não foi publicada. A adição de 100 mL de meio YM após 24h de cultivo não favorece o crescimento, possivelmente devido às bactérias já estarem em fase estacionária, não havendo a multiplicação esperada, devido, entre outros fatores, a saturação do meio e ao estado metabólico das mesmas.

Comparando-se os rendimentos de polímero para cada tratamento aplicado, foi obtido o gráfico representado pela Figura 7.

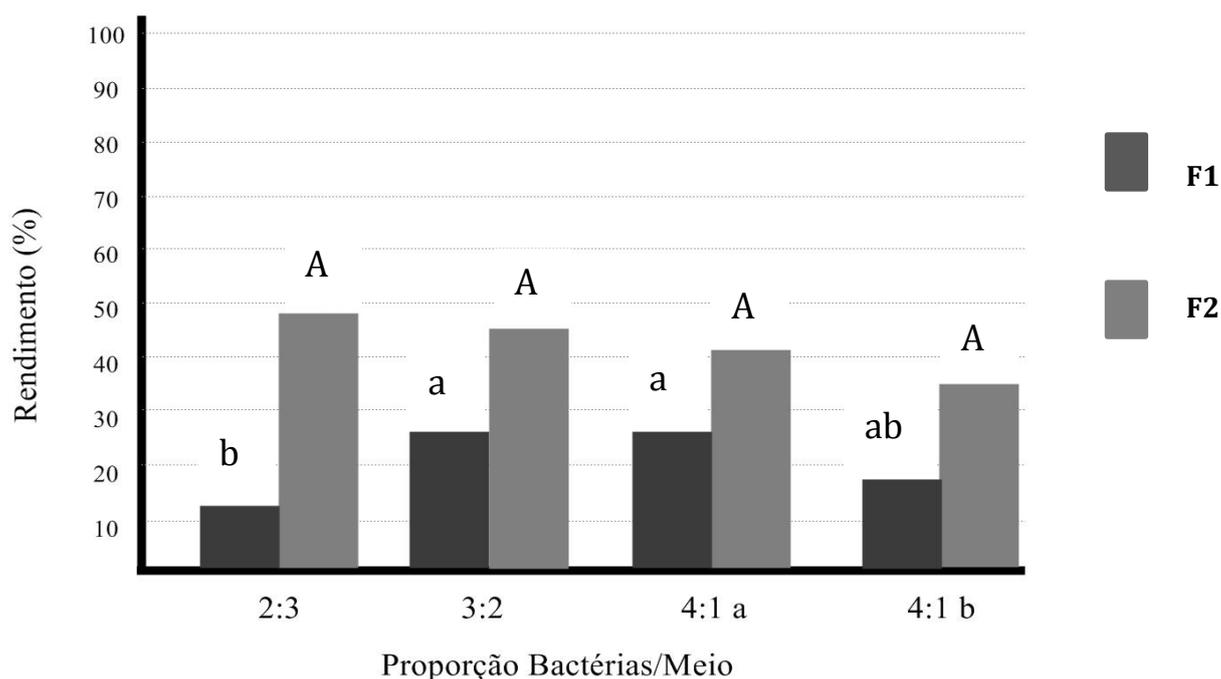


Figura 7: Relação entre o Rendimento de P(3HB) frente o uso de escalonamento de inóculo das fermentações e 2, em ordem crescente de quantidade de meio, sendo “4:1 a” com acréscimo de meio e “4:1 b” sendo controle.

Na primeira fermentação, os maiores rendimentos foram observados nos tratamentos C e D, onde ambos obtiveram rendimento de 26%, o que sugere que os resultados obtidos em relação a DO geraram os melhores resultados de rendimento.

Já na segunda fermentação, o rendimento obtido no tratamento B atingiu 48%, sendo superior ao rendimento do tratamento C, que foi 45%, seguido do tratamento D, que atingiu 41%.

Os níveis de rendimento obtidos na segunda fermentação foram compatíveis com a literatura (em torno de 45%) (GOUDA, 2001). Proporcionalmente, o rendimento de biopolímero na primeira fermentação foi semelhante ao da segunda. Adicionalmente, foram observadas dificuldades no processo de extração do polímero

da primeira fermentação, durante a etapa de maceração do *pellet* obtido, gerando dificuldades na extração, contribuindo para a queda no seu rendimento.

Em termos gerais, em ambas as fermentações, o rendimento obtido pelos controles manteve-se em níveis menores, quando comparados as demais proporções de suspensão bacteriana utilizadas. O crescente aumento de volume de meio nos tratamentos utilizados gerou rendimentos também com valores crescentes, sendo os valores da segunda fermentação consideravelmente mais elevados do que da primeira, como ilustrado na Figura 8.

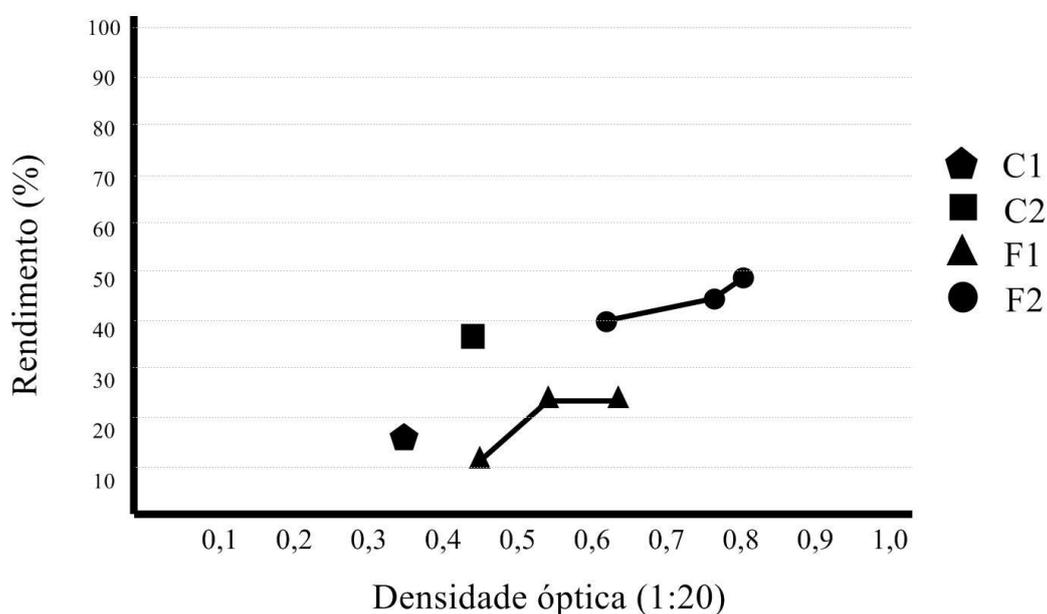


Figura 8: Relação entre a Densidade óptica (DO) e o rendimento de P(3HB) frente o uso de escalonamento de inóculo, onde F1 e F2 representam os valores de DO da primeira e a segunda fermentações, em ordem crescente de proporção de meio, e C1 e C2 seus respectivos controles.

Os resultados preliminares indicam que os tratamentos C e D foram os que atingiram maiores níveis produtivos, com rendimento de biopolímero dentre 0,15g / L e 0,17g / L, respectivamente.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o escalonamento de inóculo produziu e manteve níveis altos de densidade óptica, os quais concordaram com os níveis de rendimento, visto que os melhores resultados de ambas as análises foram referentes aos mesmos tratamentos. As concentrações bacterianas obtidas nos tratamentos foram superiores ao controle, comprovando que a estratégia de escalonamento do inóculo gerou os resultados esperados.

Adicionalmente, os maiores valores de DO foram obtidos no período de 24h de cultivo, não se fazendo necessária a adição de meio de cultivo.

Os tratamentos C e D foram os que obtiveram os melhores resultados de rendimento proporcionalmente em ambas as fermentações.

A utilização de escalonamento aumentou os níveis de produção, sugerindo que a utilização desse procedimento mantém bons níveis de multiplicação e alta viabilidade celular.

7. PERSPECTIVAS

Pode-se observar a partir dos resultados obtidos que a utilização de escalonamento de inóculo é vantajosa quando comparada ao controle utilizado no laboratório para a produção de inóculo bacteriano. Sendo assim, faz-se necessário que o experimento detalhado neste estudo seja repetido, eliminando a dificuldade obtida na etapa de extração, podendo assim, obter o melhor tratamento testado e posterior realização da padronização de inóculo nos experimentos realizados no Laboratório de Biopolímeros.

8. REFERÊNCIAS

LUENGO, J.M.; GARCÍA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARROY, G. & OLIVEIRA, E.R. (2003). Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 251–260.

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

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

CHANPRATEEP, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621-632.

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

KUNASUNDARI, B. & SUDESH, K. (2011). Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Express Polymer Letters**, v. 5, n. 7, p. 620–634.

VOGELSAGER, N.JR. et al. (2004). Filmes de P(3HB) e PCL: Acompanhamento da Biodegradação em Solo por Propriedades Térmicas e Morfológicas. **Revista Matéria**, v. 9, n. 4, p. 370-377.

CHIELLINI, E. & SOLARO, R. (1996). Biodegradable polymeric materials. **Advanced Materials**, v. 8, p. 305-313.

LEMOIGNE, M. (1926). Produits de dehydration et de polymerisation de l'acide β -oxobutyrique. **Bulletin Societe Chimique Biological**, v. 8, p. 770–782.

LUNDGREN, D.G.; ALPER, R.; SCHNAITMAN, C.; & MARCHESSAULT, R.H. (1965). Characterization of Poly- β -Hydroxybutyrate Extracted from Different Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 89, n. 1, p. 245–251.

POPULATION REFERENCE BUREAU. 2015 Population Data Sheet. Disponível em: <http://www.prb.org/pdf15/2015-world-population-data-sheet_eng.pdf>. Acesso em: 10 de novembro de 2015.

KHANNA, S. & SRIVASTAVA, A.K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607-619.

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

GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. (1997) Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v.17, p.24-29.

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

JACQUEL, N. et al. (2008) Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). **Biochemical Engineering Journal**, v.39, p. 15-37.

JENDROSSEK, D.; SELCHOW, O.; HOPPERT, M. (2007) Poly(3-Hydroxybutyrate) Granules at the Early Stages of Formation Are Localized Close to the Cytoplasmic Membrane in *Caryophanon latum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 586-593.

KESSLER, B.; WITHOLT, B. (2001) Factors involved in the regulatory network of poly-hydroxyalkanoate metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 97-104.

KHARDENAVIS, A. A., KUMAR, M. S., MUDLIAR, S. N., CHAKRABARTI, T. (2006) Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly β -hydroxybutyrate. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3579-3584.

KUNASUNDARI, B., SUDESH, K. (2011) Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Express Polymer Letters**, v. 5, n° 7, p. 620–634.

LEE, S. Y. et al. (1996) Improvement of hydroxyvalerate fraction in poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, p. 255-258.

LEE, S. Y. (1996b) Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Tibtech**, v. 14, p. 431-438.

LELLIOT, R. A.; STEAD, D. E. (1987) Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. **Palo Alto**, Blackwell, 1 ed., v. 216, p. 171-172.

LUGG, H., SAMMONS, R. L., MARQUIS, P. M., HEWITT, C. J., YONG, P., PATERSON-BEEDLE, M., REDWOOD, M. D., STAMBOULIS, A., KASHANI, M., JENKINS, M., MACASKIE, L. E. (2008) Polyhydroxybutyrate accumulation by a *Serratia* sp.. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 481-491.

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

MEHAN, V. K.; LIAO, B. S.; TAN, Y. J.; ROBINSON-SMITH, A.; McDONALD, D.; HAYWARD, A. C. (1994) Bacterial wilt of Groundnut. Patancheru: Internacional Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. **Information Bulletin**, 35, p.28.

MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; GIL-TUNES, C.; VENDRUSCOLO, C. T. (2001) Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 469-474.

NASCIMENTO, J. F. (2001) **Estudo da processabilidade e da caracterização do poli (ácido 3- hidroxibutírico) - PHB obtido a partir de cana-de-açúcar.** Campinas, SP. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química Universidade Estadual de Campinas.

OEDING, V., SCHLEGEL, H. G. (1973) β -ketothiolase from *Hydrogemonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. **Biochemical Journal**, v. 134, p. 239-248.

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

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

PRADELLA, J. G. C. (2006) **“Biopolímeros e Intermediários Químicos”**, relatório técnico nº 84396-205, Centro de Tecnologia de Processos e Produtos, Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP.

QUEIRÓZ, J. H., MAUGERI, F. (1989) Otimização da produção de dextran-sacarose de *Leuconostoc mesenteroides* a partir de melaço como fonte de carbono. **Revista de Microbiologia**, v. 20, p. 150-156.

RAMSAY, J.A., BERGER, E., VOYER, R., CHAVRIE, C., RAMSAY, B. A. (1990) Extraction of poly- β -hydroxybutyrate using chlorinated solvents. **Biotechnology Techniques**, v.8, p. 589-584.

RAVEN, P. H. (1996) Biology of plants. **New York: Worth Publisher**, p.728.

SERAFIM, L. S., LEMOS, P. C., LEVANTESI, C.; TANDOI, V.; SANTOS, H.; REIS, M. A. M. (2002) Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 51, p. 1 – 18.

SCHLEGEL, H. G., KALTWASSER, H., GOTTSCHALK, G. (1961) A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies. **Archives of Microbiology**, v. 1, p. 38:209–222.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSIER, G. C.; MORRIL, T. C. (2007) **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Editora Guanabara Dois.

SPIER, V. C. (2005) **Caracterização espectroscópica e cromatográfica de copoliésteres biodegradáveis**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade do Estado de Santa Catarina.

STEINBÜCHEL, A., VALENTIN, H. E. (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 128, p. 219-228.

SUDESH K., ABE H., DOI Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 1503–1555.

SUTHERLAND, I. W. (1996) Extracellular polysaccharides. *In: A Multivolume Comprehensive Treatise Biotechnology*. 2ed. (Rehm, H.J. and Reed, G. eds), p. 613-657. Weinheim :VHC.

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

YABUUCHI, E.; KOSARO, Y.; OYIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with

the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v. 36, n. 12, p. 1251-1275.

CANEVAROLO, S.V. (2003). **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber, 1 ed. p. 444.

BERGER, E.; RAMSAY, B.A.; RAMSAY, J.A.; CHAVARIE, C. & BRAUNEGG, G. (1998). PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. **Biotechnology Technology**, v. 3, p. 227-232.

BYROM, D. (1987). Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Tibtech**, v. 5, p. 246-250.

CROCHEMORE, A.G.; MATTOS, M.L.T.; VENDRUSCOLO, C.T.; CASTRO, L.A.S. & MOREIRA, A. S. (2012). Identification of pesticide-degrading *Pseudomonas* strains as poly- β -hydroxybutyrate producers. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 85, p. 15144-15149.

RODRIGUES, A.A.; SANTOS, B.C.; MACAGNAN, K.L.; ALVES, M.I.; MOURA, A.B.; MOREIRA, A.S. & VENDRUSCOLO, C.T. (2014). Poli-3hidroxibutirato: identificação molecular de linhagens bacterianas positivas para síntese de bioplástico. **Anais do XXII Congresso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología**, Cartagena, Colômbia.

SUDESH, K.; MAEHARA, A.; GAN, Z.; IWATA, T. & DOI, Y. (2004). Direct observation of polyhydroxyalkanoate granule associated-proteins on native granules and on poly(3-hydroxybutyrate) single crystals by atomic force microscopy. **Polymer Degradation and Stability**, v. 83, p. 281–287.

VALAPPIL, S.P.; MISRA, S.K.; BOCCACCINI, A.R.; KESHAVARZ, T.; BUCKE, C. & ROYA, I. (2007). Large-scale production and efficient recovery of P(3HB) with desirable material properties, from the newly characterized *Bacillus cereus* SPV. **Journal of Biotechnology**, v. 132, p. 251-258.

CROCHEMORE, A.G. (2014). **Poli(3-hidroxi-butirato) com propriedades térmicas diferenciadas produzido por *Pseudomonas sp.* CMM43 degradadora de agrotóxico**. Tese (Doutorado em Ciência) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. (1997) Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v.17, p.24-29.

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

JACQUEL, N. et al. (2008) Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). **Biochemical Engineering Journal**, v.39, p. 15-37.

JENDROSSEK, D.; SELCHOW, O.; HOPPERT, M. (2007) Poly(3-Hydroxybutyrate) Granules at the Early Stages of Formation Are Localized Close to the Cytoplasmic Membrane in *Caryophanon latum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 586-593.

KESSLER, B.; WITHOLT, B. (2001) Factors involved in the regulatory network of poly-hydroxyalkanoate metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 97-104.

KHARDENAVIS, A. A., KUMAR, M. S., MUDLIAR, S. N., CHAKRABARTI, T. (2006) Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly β -hydroxybutyrate. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3579-3584.

KUNASUNDARI, B., SUDESH, K. (2011) Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Express Polymer Letters**, v. 5, n° 7, p. 620–634.

LUGG, H., SAMMONS, R. L., MARQUIS, P. M., HEWITT, C. J., YONG, P., PATERSON-BEEDLE, M., REDWOOD, M. D., STAMBOULIS, A., KASHANI, M.,

JENKINS, M., MACASKIE, L. E., (2008) Polyhydroxybutyrate accumulation by a *Serratia* sp.. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 481-491.

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

MEHAN, V. K.; LIAO, B. S.; TAN, Y. J.; ROBINSON-SMITH, A.; McDONALD, D.; HAYWARD, A. C. (1994) Bacterial wilt of Groundnut. Patancheru: Internacional Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. **Information Bulletin**, 35, p.28.

MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; GIL-TUNES, C.; VENDRUSCOLO, C. T. (2001) Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 469-474.

QUEIRÓZ, J. H., MAUGERI, F. (1989) Otimização da produção de dextran-sacarose de *Leuconostoc mesenteroides* a partir de melaço como fonte de carbono. **Revista de Microbiologia**, v. 20, p. 150-156.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSIER, G. C.; MORRIL, T. C. (2007) **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Editora Guanabara Dois.

SPIER, V. C. (2005) **Caracterização espectroscópica e cromatográfica de copoliésteres biodegradáveis**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade do Estado de Santa Catarina.

YABUUCHI, E.; KOSARO, Y.; OYIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v. 36, n. 12, p. 1251-1275.

GOUDA, M.K.; SWELLAM, A. E.; OMAR, S.H. (2001) 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.

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

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

OMAR, S.; RAYES, A.; EQAAB, A.; Voß, I.; STEINBÜCHEL, A. (2001) Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. **Biotechnology Letters**, n. 23, p. 1119-1123.

ASLIM B., YÜKSEKDAG, Z. N., BEYATLI, Y. (2002) Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. **Turkish Electronic Journal of Biotechnology, Special Issue**, p. 24-30.

SPEROTTO, R. A. (2014) **Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana**. Editora da Univates, 329 p.

GARCIA-CRUZ, C. H.; SILVA, A. N. (2010) A metodologia de superfície de resposta como ferramenta para avaliação da produção de alginato e polihidroxibutirato pela *Azotobacter vinelandii*. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 32, p. 105-112.

RAMADAS, N. V.; SINGH, S.K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. (2009) Polyhydroxybutyrate Production using Agro-industrial Residue as Substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. **Brazilian archives of Biology and technology**, v.52, n. 1: pp.17-23.

KULPREECHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N. (2009) 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, 240–245.

BARBOSA, M.; ESPINOSA, A. H.; MALAGÓN, R. D.; MORENO, N. S. (2005) Producción de poli-b-hidroxibutirato (phb) por *Ralstonia eutropha* atcc 17697. **Revista de la Facultad de Ciencias**, v. 10, n. 1, 45-54.

GRIGULL, V. H.; SILVA, D. D.; GARCIA, M. C. F.; FURLAN, S. A.; PEZZIN, A. P. T.; SCHNEIDER, A. L. S.; ARAGÃO, G. F. (2008) Production and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Oleic Acid by *Ralstonia eutropha*. **Food Technol. Biotechnol**, v. 46 n.2, 223–228.

KANJANACHUMPOL, P.; KULPREECHA, S.; TOLIENG, V.; THONGCHUL, N. (2013) Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. **Bioprocess Biosyst Eng**, DOI 10.1007/s00449-013-0885-7.

DALCANTON, F. (2010) **Produção, extração e caracterização de Poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina.