



Área: Engenharia de Alimentos

PARÂMETROS CINÉTICOS E ESTEQUIOMÉTRICOS DA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO (P(3HB)) POR *Bacillus megaterium* UTILIZANDO COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

Guilherme de Souza Hassemer¹, Yen-Han Lin², Eunice Valduga¹, Alexander Junges^{1*}

¹Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim, Erechim, RS

*E-mail: junges@uricer.edu.br

²Departamento de Engenharia Química, Universidade de Saskatchewan, Saskatoon, SK S7N 5A9, Canadá

RESUMO –Uma alternativa para a substituição de plásticos é o uso de biopolímeros, como os polihidroxialcanoatos (PHAs). Os PHAs são poliésteres sintetizados por microrganismos como reserva energética, porém podem ser extraídos e utilizados em diferentes setores, incluindo a produção de embalagens para alimentos. Dentre os PHAs, o polihidroxibutirato (P(3HB)) é um dos mais estudados. Neste, sentido o presente estudo visou determinar os parâmetros cinéticos e estequiométricos da produção de P(3HB) por *B. megaterium* utilizando como substratos a água de parboilização de arroz e efluente da indústria de balas, suplementado com meio mineral. Em condições maximizadas obteve-se 7,55 g L⁻¹ de biomassa total, contendo 50,07 % de P(3HB) (3,78 g L⁻¹) e produtividade de 0,146 g L⁻¹ h⁻¹ após 20 h de cultivo. Os resultados obtidos através dos testes sustentam a possibilidade de que água de parboilização de arroz e o efluente da indústria de balas. podem ser utilizados como meio de cultura na produção de P(3HB).

Palavras-chave: Bopolímeros, polihidroxialcanoatos, bioprodução, água de parboilização de arroz, efluente da indústria de balas.

1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos plásticos para substituir papel ou vidro, tornou-se algo corriqueiro na sociedade moderna. Contudo, a durabilidade dos plásticos se torna um problema após o descarte dos mesmos (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005; FERNANDES, 2013; PAKALAPATI et al., 2018). Uma possível alternativa é a produção de biopolímeros, dentre os quais os polihidroxialcanoatos (PHAs) podem ser citados. Os PHAs são poliésteres sintetizados por microrganismos como reserva energética. Estes compostos permanecem armazenados no interior das células e podem ser consumidos quando o microrganismo é submetido a situações de estresse. Em razão disto, os PHAs são completamente biodegradáveis, sendo consumidos por diversas bactérias presentes no solo e na água. Além disso, as propriedades mecânicas dos PHAs se assemelham as de vários polímeros convencionais (ISRANI; SHIVAKUMAR, 2013; LIN; CHEN, 2017; MOHAPATRA et al., 2017).

Dentre os PHAs, o polihidroxibutirato (P(3HB)) é um dos mais estudados. Diversas espécies de bactérias são capazes de produzir P(3HB), sendo que o gênero *Bacillus* apresenta potencial de produção em larga escala (PARK; CHOI; LEE, 2005; MOHAPATRA et al., 2017). Dentre elas, *Bacillus megaterium* apresenta grande potencial de aplicação na produção de P(3HB). Ele é capaz de utilizar diversas fontes de carbono e apresenta boa resistência a pressão osmótica e temperatura (FACCIN, 2012; KUMAR et al., 2013; KAVITHA; RENGASAMY; INBAKANDAN, 2017).

O processo convencional de produção de P(3HB) usualmente envolve a utilização de substratos como glicose pura, xaropes e melaços (cana, beterraba, milho). Contudo, devido a seu custo, algo a ser considerado é o potencial de utilização de coprodutos agroindustriais como fontes de carbono para reduzir o custo total do processo (FACCIN et al., 2013; WHITE; LAIRD; HUGHES, 2017; THOMAS; BALAKRISHNAN; SREEKALA, 2018).

Um processo que gera um grande volume de coprodutos é o de parboilização de arroz, dando origem a água de parboilização. O Brasil é o maior produtor de arroz dentre os países das Américas e Europa, com uma colheita de mais de 8,38 milhões de toneladas. O processo de parboilização é frequentemente empregado no país, e a água oriunda do mesmo é rica em minerais (CHILDS; RASZAP, 2017).

Outra indústria que gera um coproduto interessante do ponto de vista dos processos biotecnológicos é a indústria de balas e *candies*. Mais de 25 empresas atuam no setor no Brasil, sendo que o coproduto mais comum é água oriunda do processo de limpeza dos equipamentos da linha de produção. Estas águas são ricas em açúcares e podem causar impactos ambientais graves caso não sejam tratadas adequadamente (MAQBOOL et al., 2017; PAPADAKI et al., 2018).

Existem ainda poucos estudos acerca da viabilidade destes coprodutos serem empregados na produção de P(3HB), contudo, dados apontam que ambos podem ser empregados como meio de cultura em processos



biotecnológicos (ARAÚJO et al., 2015; MUKHERJEE et al., 2016). Desta forma, o presente estudo avaliou os parâmetros cinéticos e estequiométricos da produção em biorreator de polihidroxibutirato (P(3HB)) por *B. megaterium* empregando substratos agroindustriais (água de parboilização de arroz e efluente da indústria de balas).

2 MATERIAL E MÉTODOS

A bactéria *B. megaterium* ATCC 14581 foi utilizada durante os ensaios, sendo que mesma foi adquirida da Fundação André Tosello e mantida em ultra freezer, a -80 ± 2 °C, em solução crioprotetora (20 % glicerol) até o momento de sua utilização.

Para realizar os cultivos do micro-organismo, foram empregados 2 coprodutos da agroindústria de alimentos: água de parboilização de arroz (APA) cedida pela Indústria Nelson Wendt (Pelotas, Rio Grande do Sul) e efluente da lavagem de drageadeiras da indústria de balas (EIB) cedido por uma indústria de balas e doces da região do Alto Uruguai. Os coprodutos foram utilizados em uma proporção de 40% (APA) e 60 % (EIB) (v/v) e enriquecidos com meio mineral e sulfato de amônio ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), seguindo os parâmetros propostos por Faccin, (2012) e Hassemer (2016). A composição do meio mineral pode ser visualizada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição do meio mineral e solução de micronutrientes.

Composto	Concentração	Composto	Concentração ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
Na_2HPO_4	$3,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	H_3BO_3	300
KH_2PO_4	$1,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$0,05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30
Ácido Cítrico	$0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	30
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0,01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	30
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$0,008 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30
Sol.micronutrientes	$1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10

Os cultivos batelada simples em biorreator foram realizados em um frasco fermentativo com volume total de 2 L por 32 h a 30 °C. O frasco, contendo 1,5 L de meio de cultura, permaneceu acoplado a uma unidade de controle que permite o monitoramento da velocidade de agitação do meio de cultura (500 rpm). A aeração do sistema foi realizada utilizando ar ambiente bombeado via compressor de ar a uma vazão de 4 vvm.

Com o objetivo de obter parâmetros estequiométricos e verificar a cinética de consumo de substrato (carbono e nitrogênio) em frascos agitados e batelada simples, 10 mL de amostra foram coletados a cada 4 h, possibilitando assim, a construção das curvas cinéticas para cada condição de cultivo. A partir dos perfis de concentração celular global, formação de produto global e consumo de substrato global (carbono orgânico total - COT e nitrogênio total - NT) em relação ao tempo, foi possível determinar, através de balanço de massa para cada componente, as velocidades de crescimento microbiano (r_x), formação de produto (r_p) e consumo de substrato (r_c e r_n) descritas nas Equações 1, 2, 3 e 4, conforme Bailey et al. (1986).

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (2)$$

$$r_c = \frac{dC}{dt} \quad (3)$$

$$r_n = \frac{dN}{dt} \quad (4)$$

Dividindo-se o valor de r_x pela concentração celular naquele instante, a velocidade específica de crescimento (μ_x), foi obtida (Equação 5), conforme Bailey et al. (1986).

$$\mu_x = \frac{r_x}{X} \quad (5)$$

Os fatores de conversão global também foram avaliados, com os fatores de conversão de carbono orgânico em P(3HB), $Y_{P/C}$ ($\text{g P(3HB)} \cdot \text{g COT}^{-1}$), e conversão de nitrogênio global, $Y_{P/N}$ ($\text{g P(3HB)} \cdot \text{g NT}^{-1}$), sendo expressos pelas equações 6 e 7, respectivamente.

$$Y_{P/C} = \frac{r_p}{r_c} = -\frac{dP}{dC} \quad (6)$$

$$Y_{P/N} = \frac{r_p}{r_n} = -\frac{dP}{dN} \quad (7)$$

Fatores de conversão global para células, tanto para carbono orgânico $Y_{X/C}$ ($\text{g células} \cdot \text{g COT}^{-1}$) quanto para nitrogênio total $Y_{X/N}$ ($\text{g células} \cdot \text{g NT}^{-1}$) foram calculados e expressos pelas equações 8 e 9.

$$Y_{X/C} = \frac{r_x}{r_c} = -\frac{dX}{dC} \quad (8)$$

$$Y_{X/N} = \frac{r_x}{r_n} = -\frac{dX}{dN} \quad (9)$$

Fatores de conversão global para a produção de P(3HB), $Y_{P/X}$ ($\text{g P(3HB)} \cdot \text{g células}^{-1}$), foi expressa pela Equação 10.



$$Y_{P/X} = \frac{r_p}{r_x} = -\frac{dP}{dX} \quad (10)$$

Onde: r_x = velocidade de crescimento das células ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); r_n = velocidade de consumo de nitrogênio ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); r_c = velocidade de consumo de carbono orgânico ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); r_p = velocidade de produção de P(3HB) ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância - ANOVA, com comparação de médias realizada pelo teste de Tukey, com auxílio do software *Statistica* versão 5.0 (StatSoft/Dell, USA), com 95% de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta os parâmetros cinéticos e estequiométricos da produção em biorreator de polihidroxibutirato (P(3HB)) por *B. megaterium*.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos da produção de polihidroxibutirato (P(3HB)) por *B. megaterium* em biorreator.

Tempo (h)	Produtividade Células ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Produtividade P(3HB) ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$Y_{p/s}$ COT ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	$Y_{p/s}$ NT ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	$Y_{x/s}$ COT ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	$Y_{x/s}$ NT ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	μ_x (h^{-1})
0	-	-	-	-	-	-	-
4	0,610 ^e (0,024)	-	-	-	0,227 ^d (0,021)	2,50 ^e (0,045)	-
8	0,396 ^b (0,016)	0,084 ^d (0,005)	0,058 ^c (0,003)	1,04 ^d (0,124)	0,452 ^a (0,015)	8,05 ^b (0,219)	0,61 ^a (0,050)
12	0,033 ^a (0,001)	0,129 ^b (0,003)	0,092 ^c (0,006)	2,17 ^c (0,113)	0,358 ^b (0,020)	8,41 ^a (0,166)	0,39 ^b (0,020)
16	0,018 ^c (0,006)	0,137 ^{ab} (0,001)	0,118 ^b (0,010)	2,49 ^{bc} (0,131)	0,347 ^b (0,019)	7,34 ^c (0,229)	0,033 ^c (0,001)
20	0,012 ^{cd} (0,012)	0,146 ^a (0,001)	0,136 ^a (0,011)	3,05 ^b (0,109)	0,326 ^c (0,021)	7,09 ^{cd} (0,261)	0,027 ^c (0,002)
24	0,011 ^d (0,004)	0,124 ^b (0,001)	0,138 ^a (0,011)	2,85 ^b (0,056)	0,328 ^c (0,017)	6,78 ^d (0,063)	0,023 ^c (0,002)
28	0,007 ^d (0,010)	0,124 ^{bc} (0,002)	0,115 ^b (0,005)	3,16 ^{ab} (0,153)	0,241 ^d (0,020)	6,60 ^d (0,259)	0,014 ^d (0,003)
32	0,007 ^d (0,004)	0,118 ^c (0,001)	0,120 ^b (0,006)	3,40 ^a (0,196)	0,236 ^d (0,011)	6,70 ^d (0,248)	0,010 ^d (0,003)

Médias (desvio padrão) seguidas de letras iguais indicam não haver diferença significativa de acordo com Teste de Tukey ($p < 0,05$); $Y_{p/s}$ COT – fator de conversão de COT em P(3HB); $Y_{p/s}$ NT – fator de conversão de NT em P(3HB); $Y_{x/s}$ COT – fator de conversão de COT em células; $Y_{x/s}$ NT – fator de conversão de NT em células; μ_x – velocidade específica de crescimento;

Conforme a Tabela 2, é possível verificar que a maior produtividade de P(3HB) ocorreu em 20 h ($0,146 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), não diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) do valor encontrado em 16 h ($0,137 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Faccin *et al.* (2013) também avaliaram os parâmetros cinéticos da produção de P(3HB) por *B. megaterium* utilizando sacarose e diferentes perfis de k_{LA} , sendo que os autores obtiveram uma produtividade máxima de $0,140 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ após 48 h ao utilizar uma velocidade de agitação de 500 rpm. Comparando os resultados do presente estudo com os valores encontrados pelo grupo de Faccin *et al.* (2013) nota-se que apesar de os valores de produtividade máxima serem similares, o tempo necessário para atingir este valor foi consideravelmente menor no presente estudo. Uma possível explicação pode estar relacionada a forma e aeração do sistema, visto que Faccin *et al.* mantiveram a saturação de oxigênio da cultura em 100 % ao longo de todo o processo. A disponibilidade de oxigênio pode influenciar consideravelmente a produção de P(3HB), com estudos sugerindo que concentrações elevadas de oxigênio fazem com que o metabolismo das células de *B. megaterium* priorize a manutenção do ciclo de Krebs ao invés de destinar moléculas de acetil-CoA para rotas metabólicas ligadas a síntese de P(3HB), visto que o estresse necessário para incentivar o acúmulo de polímero se torna reduzido (Third *et al.*, 2003; Pradella *et al.*, 2010; Yeo *et al.*, 2017; Sirohi *et al.*, 2020).

Ainda no que se refere a produtividade de P(3HB), García-Cabrera *et al.* (2020) cultivaram *Rhizobium phaseoli* em meio modificado para *Rhizobium sp* com glicose e obtiveram uma produtividade de $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ após 28 h ao utilizar um velocidade de agitação de 450 rpm, um valor menor do que o que foi obtido no presente estudo utilizando *B. megaterium*.

No que se refere aos demais parâmetros, um comportamento peculiar foi observado no consumo de substrato. Tanto para os fatores de conversão de substrato em polímero quanto células com NT apresentou uma taxa de conversão maior que ao utilizar COT. No caso da conversão de substrato em polímero, a taxa de conversão de COT foi de



aproximadamente $0,13 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ na faixa de 20 a 24 h. No entanto, com o substrato NT o máximo de conversão foi de $3,4 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ após 32 h de cultivo. Em relação a produção celular, um comportamento similar foi observado, com a máxima taxa de conversão de COT sendo de $0,452 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ em 8 h e de $8,41 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ com o NT após 12 h. Egli (2015) aponta que este comportamento é comum em sistemas para produção de P(3HB), sobretudo naqueles onde há excesso de carbono, com as taxas de conversão de nitrogênio em produto e produto em células podendo atingir valores de até $20 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. Oliveira-Filho *et al.* (2020) também relatam valores semelhantes aos encontrados no presente estudo, com uma taxa de conversão de nitrogênio em células de $7,5 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ ao utilizar *Burkholderia sacchari* LMG 19450 para produzir P(3HB). Khanna & Srivastava (2008) cultivaram *Ralstonia eutropha* NRRL B14690 em meio otimizado com frutose e obtiveram um fator de conversão de nitrogênio em biomassa de $10,01 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. Faccin *et al.* (2013), ao estimarem os parâmetros cinéticos de *B. megaterium* DSM 32^T, obtiveram uma conversão máxima de nitrogênio em células de $8,48 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, valor semelhante ao do presente estudo.

Em relação a taxa de crescimento celular, o maior valor foi de $0,61 \text{ h}^{-1}$, obtido após 8 h de cultivo, sendo que a velocidade de crescimento reduziu significativamente ($p < 0,05$) até o final do período de cultivo ($0,01 \text{ h}^{-1}$). Este comportamento condiz com dados da literatura, sendo que Shahid *et al.* (2013) obtiveram valores máximos de μ_x próximos a $0,47 \text{ h}^{-1}$, $0,51 \text{ h}^{-1}$ e $0,44 \text{ h}^{-1}$ após 24 h ao cultivar *B. megaterium* DSM 32^T, *B. megaterium* DSM 90 e *B. megaterium* DSM 509, respectivamente, em meio mineral com glicose. Dalsasso *et al.* (2019) também determinaram os parâmetros cinéticos da produção de P(3HB) por *Cupriavidus necator* utilizando vinhaça e melaço de cana como fontes de carbono. Os autores encontraram valores máximos de μ_x partindo de $0,19 \text{ h}^{-1}$ até $0,37 \text{ h}^{-1}$, sob diferentes condições de cultivo. Em contraste, García-Cabrera (2020) avaliaram a cinética de produção de P(3HB) por *Rhizobium phazeoli* e encontraram taxas de crescimento específico na faixa de $0,09 \text{ h}^{-1}$ até $0,16 \text{ h}^{-1}$. Estes valores corroboram com a utilização de *B. megaterium* na produção de P(3HB), devido a sua alta velocidade de crescimento, o que pode reduzir o tempo total do processo fermentativo.

4 CONCLUSÃO

A água de parboilização de arroz e o efluente da indústria de balas apresentam potencial de utilização como substratos para a produção de P(3HB) por *B. megaterium*. Ambos os compostos ainda são considerados resíduos por grande parte das indústrias que os produzem, porém seu emprego na área da biotecnologia pode oferecer uma nova fonte de renda para a indústria e auxiliar na redução do custo de produção de P(3HB) permitindo sua maior difusão no mercado.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim e a CAPES.

6 REFERÊNCIAS

- ABICCAB. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CHOCOLATES, CACAU, AMENDOIM, BALAS E DERIVADOS, ASSOCIADOS BALAS & DERIVADOS, **Bras. Sweets Snacks**. 2018, 1. http://www.brasilnsns.org.br/suppliers/by_product/candies.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F.; SIMPSON, R.J. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 1986.
- CAL, A.J.; KIBBLEWHITE, R.E.; DIRK SIKKEMA, W.; TORRES, L.F.; HART-COOPER, W.M.; ORTS, W.J.; LEE, C.C. Production of polyhydroxyalkanoate copolymers containing 4-hydroxybutyrate in engineered *Bacillus megaterium*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, 168, 86-92, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.015>.
- CHILDS, N.; RASZAP, S. Rice Outlook, 2017. <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/RCS/RCS-11-14-2017.pdf>
- DALSASSO, R.R.; PAVAN, F.A.; BORDIGNON, S.E.; ARAGÃO, G.M.F. DE; POLETO, P. Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator* from sugarcane vinasse and molasses as mixed substrate. *Process Biochem.* 2019, 85, 12–18, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.07.007>.
- DÍAZ-BARRERA, A.; URTUVIA, V.; PADILLA-CÓRDOVA, C.; PEÑA, C. Poly(3-hydroxybutyrate) accumulation by *Azotobacter vinelandii* under different oxygen transfer strategies. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* 2019, 46, 13–19, <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2090-9>.
- EGLI, T. Microbial growth and physiology: a call for better craftsmanship. *Front. Microbiol.* 2015, 06, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00287>.
- FACCIN, D.J.L.; MARTINS, I.; CARDOZO, N.; MEDEIROS, S.; RECH, R.; AYUB, M.A.Z.; ALVES, T.L.M.; GAMBETTA, R.; RESENDE, S.A. Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2009, 84, 1756-1761, <https://doi.org/10.1002/jctb.2240>.



- FACCIN, D.J.L.; RECH, R.; SECCHI, A.R.; CARDOZO, N.S.M.; AYUB, M.A.Z. Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. *Process Biochem.* 2013, 48, 420–425, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.004>.
- FERNANDES, I.A.; NYARI, N.L.; OLIVEIRA, J.V.; RIGO, E.; SOUZA, M.C.M.; GONCALVES, L.R.B.; PERGHER, S.B.C.; OLIVEIRA, D. Nanoparticles of poly(hydroxybutyrate- co -hydroxyvalerate) as support for the immobilization of *Candida antarctica* lipase (Fraction B). *Quím. Nova* 2014, 37, 331–336, <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140055>.
- GARCÍA, A.; PÉREZ, D.; CASTRO, M.; URTUVIA, V.; CASTILLO, T.; DÍAZ-BARRERA, A.; ESPÍN, G.; PEÑA, C. Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate [P(3HB)] of ultra-high molecular weight using fed- batch cultures of *Azotobacter vinelandii* OPNA strain. *J Chem. Technol. Biotechnol.* 2019, 94, 1853–1860, <https://doi.org/10.1002/jctb.5959>.
- GARCÍA-CABRERA, R.I.; VALDEZ-CRUZ, N.A.; BLANCAS-CABRERA, A.; TRUJILLO-ROLDÁN, M.A. Oxygen transfer rate affect polyhydroxybutyrate production and oxidative stress response in submerged cultures of *Rhizobium phaseoli*. *Biochem. Eng. J.* 2020, 162, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107721>.
- GÓMEZ-HERNÁNDEZ, E.; SALGADO-LUGO, H.; SEGURA, D.; GARCÍA, A.; DÍAZ-BARRERA, A.; PEÑA, C. Production of Poly-3-Hydroxybutyrate (P3HB) with ultra-high molecular weight (uhmw) by mutant strains of *azotobacter vinelandii* under microaerophilic conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2021, 193, 79–95, <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03384-w>.
- HASSEMER, G.S. **Produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* utilizando permeado de soro de leite**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016. <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/157486/001016827.pdf?sequence=1>.
- ISRANI, N.; SHIVAKUMAR, S. Combinatorial screening of hydrolytic enzyme/s and PHA producing *Bacillus* Spp., for cost effective production of PHAS. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 2013, 4, 934–945.
- KAVITHA, G.; RENGASAMY, R.; INBAKANDAN, D. Polyhydroxybutyrate production from marine source and its application. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, 111, 102–108, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.155>.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A.K. A Simple Structured Mathematical Model for Biopolymer (PHB) Production. *Biotechnol. Prog.* 2008, 21, 830–838, <https://doi.org/10.1021/bp0495769>.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A.K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem.* 2005, 40, 607–619, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>.
- KUMAR, P.; PATEL, S.K.S.; LEE, J.; KALIA, V.C. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* 2013, 31, 1543–1561, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.007>.
- LI, J.; YANG, Z.; ZHANG, K.; LIU, M.; LIU, D.; YAN, X.; SI, M.; SHI, Y. Valorizing waste liquor from dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass by *Bacillus megaterium* B-10. *Ind. Crop. Prod.* 2021, 161, 113160, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113160>.
- LIN, Y.-Y.; CHEN, P.T. Development of polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Bacillus subtilis* with combination of PHB-associated genes derived from *Ralstonia eutropha* and *Bacillus megaterium*. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 2017, 79, 110–115, <https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2017.02.030>.
- MAQBOOL, F.; BHATTI, Z.A.; NAZIR, H.; QAYYUM, S.; ZHAO, Y.-G.; KHAN, I.; KAMAL, R.; PERVEZ, A. Confectionary wastewater treatment through upflow microbial fuel cell. *Desalin. Water Treat.* 2017, 99, 248–254, <https://doi.org/10.5004/dwt.2017.21695>.
- MOHANRASU, K.; GURU RAJ RAO, R.; DINESH, KUNYU ZHANG, G.H.; SIVA PRAKASH, G.; DONG-PO SONG, SUDHAKAR MUNIYASAMY, PUGAZHENDHI, A.; JEYAKANTHAN, J.; ARUN, A. Optimization of media components and culture conditions for polyhydroxyalkanoates production by *Bacillus megaterium*. *Fuel* 2020, 271, 117522, <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117522>.
- MOHAPATRA, S.; MAITY, S.; DASH, H.R.; DAS, S.; PATTNAIK, S.; RATH, C.C.; SAMANTARAY, D. *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochem. Biophys. Reports.* 2017, 12, 206–213, <https://doi.org/10.1016/J.BBREP.2017.10.001>.
- MOHAPATRA, S.; PATTNAIK, S.; MAITY, S.; MOHAPATRA, S.; SHARMA, S.; AKHTAR, J.; PATI, S.; SAMANTARAY, D.P.; VARMA, A. Comparative analysis of PHAs production by *Bacillus megaterium* OUAT 016 under submerged and solid-state fermentation. *Saudi J. Biol. Sci.* 2020, 27, 1242–1250, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.02.001>.
- OLIVEIRA-FILHO, E.R.; SILVA, J.G.P.; DE MACEDO, M.A.; TACIRO, M.K.; GOMEZ, J.G.C.; SILVA, L.F. Investigating nutrient limitation role on improvement of growth and Poly(3-Hydroxybutyrate) accumulation by *Burkholderia sacchari* LMG 19450 from xylose as the sole carbon source. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020, 7, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00416>.
- PAKALAPATI, H.; CHANG, C.; SHOW, P.L.; ARUMUGASAMY, S.K.; LAN, J.C. Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. *J. Biosci. Bioeng.* 2018, 126, 282–292, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.016>.
- PAPADAKI, A.; FERNANDES, K.V.; CHATZIFRAGKOU, A.; AGUIEIRAS, E.C.G.; DA SILVA, J.A.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PAPANIKOLAOU, S.; KOUTINAS, A.; FREIRE, D.M.G. Bioprocess development



- for biolubricant production using microbial oil derived via fermentation from confectionery industry wastes. **Bioresour. Technol.** 2018, *267*, 311–318, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.016>.
- PARK, S.J.; CHOI, J.I.; LEE, S.Y. Short-chain-length polyhydroxyalkanoates: Synthesis in metabolically engineered *Escherichia coli* and medical applications. **J. Microbiol. Biotechnol.** 2005, *15*, 206–215.
- PRADELLA, J.G.D.C.; TACIRO, M.K.; MATEUS, A.Y.P. High-cell-density poly (3-hydroxybutyrate) production from sucrose using *Burkholderia sacchari* culture in airlift bioreactor. **Bioresour. Technol.** 2010, *101*, 8355–8360, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.046>.
- SCHMID, M.; RASCHBAUER, M.; SONG, H.; BAUER, C.; NEUREITER, M. Effects of nutrient and oxygen limitation, salinity and type of salt on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) in *Bacillus megaterium* uyuni S29 with sucrose as a carbon source. **New Biotechnol.** 2021, *61*, 137–144, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.11.012>.
- SHAHID, S.; MOSRATI, R.; LEDAUPHIN, J.; AMIEL, C.; FONTAINE, P.; GAILLARD, J.-L.; CORROLER, D. Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509. **J. Biosci. Bioeng.** 2013, *116*, 302–308, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.02.017>.
- SILAMBARASAN, S.; LOGESWARI, P.; SIVARAMAKRISHNAN, R.; PUGAZHENDHI, A.; KAMARAJ, B.; RUIZ, A.; RAMADOSS, G.; CORNEJO, P. Polyhydroxybutyrate production from ultrasound-aided alkaline pretreated finger millet straw using *Bacillus megaterium* strain CAM12. **Biores. Technol.** 2021, *325*, 124632, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124632>.
- SIROHI, R.; PRAKASH PANDEY, J.; KUMAR GAUR, V.; GNANSOUNOU, E.; SINDHU, R. Critical overview of biomass feedstocks as sustainable substrates for the production of polyhydroxybutyrate (PHB). **Bioresour. Technol.** 2020, *311*, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123536>.
- THIRD, K.A.; NEWLAND, M.; CORD-RUWISCH, R. The effect of dissolved oxygen on PHB accumulation in activated sludge cultures. **Biotechnol. Bioeng.** 2003, *82*, 238–250, <https://doi.org/10.1002/bit.10564>.
- THOMAS, S.; BALAKRISHNAN, P.; SREEKALA, M.S. **Fundamental Biomaterials: Polymers**, 1st ed., Woodhead Publishing, Amsterdam, 2018, <https://doi.org/10.1016/C2016-0-03544-1>.
- WHITE, C.; LAIRD, D.W.; HUGHES, L.J. From carbon waste to carbon product: Converting oxalate to polyhydroxybutyrate using a mixed microbial culture. **J. Environ. Chem. Eng.** 2017, *5*, 2362–2365, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.04.040>.
- YEO, J.C.C.; MUIRURI, J.K.; WARINTORN, T.; LI, Z.; HE, C. Recent advances in the development of biodegradable PHB-based toughening materials: Approaches, advantages and applications. **Mater. Sci. Eng. C** 2017, *92*, 1092–1116, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.11.006>.