DIANA CAROLINA TUSSO PINZÓN

Caracterização do gene PHA sintase de bactérias isoladas a partir de amostras de solo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo 2015

DIANA CAROLINA TUSSO PINZÓN

Caracterização do gene PHA sintase de bactérias isoladas a partir de amostras de solo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

Versão Original

São Paulo 2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Pinzón, Diana Carolina Tusso. Caracterização do gene da PHA sintase de bácterias isoladas a partir de amostras de solo / Diana Carolina Tusso Pinzón. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Microrganismos produtores de biopolímeros e outras substâncias de interesse biotecnológico.

Versão do título para o inglês: PHA synthase gene characterization of bacteria isolated from soil samples.

1. Biopolímeros 2. Polihidroxialcanoatos 3. PHA sintase 4. Pseudomonas 5. Burkholderia I. Gomez, Prof. Dr. José Gregório Cabrera II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB040/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Diana Carolina Tusso Pinzón.	
Título da Dissertaç	ão: Caracterização do gene da PHA sintase de bácterias isoladas a partir de amostras de solo .	
Orientador(a):	Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez.	
A Comissão Jul em sessão pút () A	gadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, blica realizada a///, considerou Aprovado(a) () Reprovado(a)	
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:	
Examinador(a):	Issinatura: Iome: nstituição:	
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:	



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil Telefone: (55) (11) 3091-8405 e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 561/12 referente ao projeto intitulado: "Especificidade de diferentes PHA sintases na biossíntese de polihidroxialcanoatos quando expressas em mutante de Pseudomonas sp LFM046 incapaz de acumular PHA" sob a responsabilidade de Diana Carolina Tusso Pinzón, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 10 de outubro de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. ØR. PAOLO M.A ZANOTTO Coordenador da CEPsh - ICB/USP

A minha família por todo o apoio apesar da distância..

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez, pelas orientações e ideias que enriqueceram e direcionaram minha pesquisa, também por ter me acolhido no seu laboratório para o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço à Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva pelo acompanhamento e ajuda prestada.

Ao Karel Olavarria Gamez por ter me ajudado em muitos momentos, especialmente nos experimentos de biologia molecular, muito obrigada.

À Jhoanne Hansen pela amizade e ajuda prestada nos detalhes finais deste trabalho.

Aos colegas dos laboratórios 148 e 172, obrigada pela ajuda, atenção e apoio nos momentos que mais precisava.

Agradeço aos técnicos do laboratório: Aelson Luiz dos Santos, obrigada pela ajuda e compreensão que teve comigo durante estes anos de pesquisa; Aline Carolina da Costa Lemos, pela disponibilidade de me ajudar sempre.

Quero agradecer a Eliana Carolina Ortega pela amizade, companhia, conselhos e ajuda nos momentos que mais precisava. Obrigada Carito.

Aos meus amigos e "hermanitos" Alejandro, Christian, Renata, Lukas, Diego, Julian, Rafael, Fernando, Daisy e Maicom pelo carinho, amizade, companhia e por me animar nos momentos difíceis.

Aos meus pais Ricardo Tusso e Carmenza Pinzón, agradeço por estarem sempre comigo e terem incentivado a continuar a pesar das dificuldades, obrigada pelo carinho e amor.

Ao meu irmão Ricardo Andrés Tusso por estar comigo durante ano e meio, sua companhia foi uma grande ajuda para mim.

Agradeço ao Jorge Ignácio Villa, pelo carinho, amor, ajuda, compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho e sobre todo pela paciência nos momentos difíceis.

Finalmente a CAPES pelo auxilio financeiro.

"Ever tried. Ever failed. No matter. Try Again. Fail again. Fail better".

Samuel Beckett (1906 - 1989)

RESUMO

TUSSO, D. C. T. **Caracterização do gene PHA sintase de bactérias isoladas a partir de amostras de solo**. 2015. 129 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres produzidos por microrganismos na forma de grânulos intracelulares, como fonte de carbono e energia. Estes materiais despertam um grande interesse biotecnológico, já que conferem propriedades termoplásticas e elastoméricas semelhantes aos plásticos sintéticos de origem petroquímica. Na biossíntese dos PHA, a PHA sintase é a enzima chave para sua produção e catalisa a incorporação de monômeros 3HA à cadeia polimérica. A partir de isolados bacterianos obtidos por Lício (2011) capazes de produzir Poli(3-hidroxibutirato) (P3HB). Estes isolados foram identificados pela análise da sequência dos genes rDNA 16S e pela construção de uma árvore filogenética como pertencentes ao gênero Burkholderia sp. Posteriormente, os genes da PHA sintase desses isolados foram clonados no plasmídeo pBBRMCS-2, e expressos em mutantes de Pseudomonas sp. (LFM461) e Burkholderia sacchari (LFM344), deficientes no acúmulo de PHA. As linhagens recombinantes foram cultivadas em excesso de glicose como fonte de carbono com o objetivo de avaliar o potencial da PHA sintase de incorporar monômeros (3HA) ao PHA. Foram realizados ensaios de acúmulo de PHA usando glicose como fonte de carbono, apresentando a produção de unidades de 3HB, 3HO e 3HD nas linhagens recombinantes de Pseudomonas sp. As linhagens recombinantes de B. sacchari incorporaram como único constituinte P(3HB). Ensaios de acúmulo de PHA foram realizados nas linhagens recombinantes de B. sacchari, usando como co-substratos diferentes ácidos graxos, sendo detectada a incorporação de unidades de 3HV e 3HHx além do 3HB, quando foram fornecidos acido hexanóico e valérico. Estes resultados indicam que as PHA sintases classe I são capazes de incorporar diferentes unidades monoméricas.

Palavras-chave: Biopolímeros. Polihidroxialcanoatos. PHA sintase. *Pseudomonas* sp. *Burkholderia* sp.

ABSTRACT

TUSSO, D. C. T. **PHA synthase gene characterization of bacteria isolated from soil samples**. 2015. 129 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The polyhydroxyalkanoates (PHA) polyesters produced by microorganisms are as intracellular granules as a source of carbon and energy. These materials arouse great interest in biotechnology, as provide thermoplastic and elastomeric properties similar to the synthetic plastics petrochemical origin. In the biosynthesis of PHA, the PHA synthase is the key enzyme for its production and catalyzes the incorporation of 3HA monomer to the polymer chain. From bacterial isolates obtained by Lício (2011) capable of producing poly (3hydroxybutyrate) (P3HB). These isolates were identified by sequence analysis of 16S rDNA genes and the construction of a phylogenetic tree of the genus Burkholderia as sp. There after, the PHA synthase genes were cloned into these isolated pBBRMCS-2 plasmid and expressed in mutant of Pseudomonas sp. (LFM461) and Burkholderia sacchari (LFM344), deficient in PHA accumulation. The recombinant strains were grown in excess glucose as carbon source in order to evaluate the potential of PHA synthase incorporate monomers (3HA) to PHA. Were performed PHA accumulation assays using glucose as carbon source, with the production of 3HB units, 3HO and 3HD in recombinant strains of Pseudomonas sp. The recombinant strains of B. sacchari incorporated as sole constituent of P (3HB). PHA accumulation assays were performed on the recombinant strains of B. sacchari, as cosubstrates using different fatty acids being detected to incorporate 3HV units and 3HHx addition of 3HB, were provided as valeric and hexanoic acid. These results indicate that the PHA synthases of Class I are able to incorporate different monomer units.

Keywords: Biopolymers, Polhyhydroxyalkanoate, PHA synthase, *Pseudomonas* sp. *Burkholderia* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Grânulo de polihidroxialcanoatos
Figura 2 - Estrutura química dos polihidroxialcanoatos (PHA), nomenclatura e número de carbonos é determinados pelo grupo alquilo R funcional. O asterisco denota o carbono quiral
Figura 3 - Síntese de PHA em bactérias
Figura 4 - Organização genética dos genes de PHA sintase representativos que codificam paras varias classes
Figura 5 - Via metabólica de síntese de P(3HB) a partir de carboidratos34
Figura 6 - Via metabólica de síntese de PHAMCL em <i>Pseudomonas</i> sp. A partir de carboidratos e ácidos graxos
Figura 7 - Árvore filogenética do gene rDNA 16S dos isolados SCU 63 e SCU 66 pelo método de Neighbor-joining com a utilização do programa MEGA 5.2.2
Figura 8 - Perfil eletroforético em gel de agarose 1% (m/v), resultante da amplificação por PCR, usando os oligonuleotídeos RECF1/RECR. Linha 1: Padraõ 1 Kb <i>DNA Ladder</i> Plus (Fermentas), Linha 2: Controle negativo (Agua), Linha 3: SCU 63, Linha 4: SCU 66, Linha5: <i>B. Sacchari</i> LFM 101 como controle positivo
Figura 9 - Perfil eletroforético em gel de agarose 1% (m/v), resultante da amplificação por PCR usando os oligonucleotídeos phaCF e phaCR Linha 1: Padraõ 1 Kb <i>DNA Ladder</i> Plus (Fermentas), Linha 2: SCU 63, Linha 3: SCU 66
Figura 10 - Árvore filogenética com base em sequência de aminoácidos da PHA sintase dos isolados SCU 63 e SCU 66 e outras bactérias pelo método de Neighbor-joining com a utilização do programa MEGA 5.2.2
Figura 11 - Perfil eletroforético em gel de agarose 1% (m/v), resultante da amplificação por PCR usando os oligonucleotídeos <i>Eco</i> RV 2creator F e <i>Sac</i> I creator R. Linha 1: SCU 63, Linha 2: SCU 66, Linha 3: Padraõ 1 Kb <i>DNA Ladder</i> Plus (Fermentas)
Figura 12 - Perfil eletroforético em gel de agarose 1% (m/v), resultante da amplificação por PCR usando os oligonucleotídeos PhaCBs F e PhaCBs R. Linha 1: Padraõ 1 Kb <i>DNA Ladder</i> Plus (Fermentas), Linha 2: <i>B. sacchari</i> LFM 101
Figura 13 - Representação dos plasmídeos pBBRMCS-2 contendo a ordem dos genes clonados. Este vetor apresenta resistência à canamicina (kan), com genes de mobilização (mob) e replicação (rep) e o promotor lac. A-) pBBRMCS-2:: <i>phaC</i> de <i>Burkholderia sacchari,</i> indicando os sítios de restrição <i>Bam</i> HI e <i>SacI</i> . B-) pBBRMCS-2:: <i>phaC</i> dos isolados SCU 63 e SCU 66, indicando os sítios de restrição <i>Eco</i> RV e <i>SacI</i>

Figura 14 - Perfil eletroforético em gel de agarose 1% (m/v), resultante da amplificação por

Figura 16 - Análise qualitativa de acúmulo de PHA nas linhagens recombinantes, usando o corante lipofílico Sudan Black. A: LFM 461 com pBBRMCS-2::*phaC*SCU66 controle positivo (+) LFM 046, controle negativo (-) LFM 461 com pBBRMCS-2 sem inserto. B: LFM 344 com pBBRMCS-2::*phaC*SCU66, controle positivo (+) LFM 101, controle negativo (-) LFM 344 com pBBRMCS-2 sem inserto. C: LFM 344 com pBBRMCS-2::*phaC*SCU63, controle negativo (-) LFM 461 com pBBRMCS-2::*phaC*SCU63, controle negativo (-) LFM 461 com pBBRMCS-2 sem inserto. D: LFM 461 com pBBRMCS-2::*phaC*SCU63, controle negativo (-) LFM 461 com pBBRMCS-2 sem inserto. D: LFM 461 com pBBRMCS-2::*phaC*SCU63, controle negativo (-) LFM 461 com pBBRMCS-2 sem inserto. D: LFM 461 com pBBRMCS-2::*phaC*SCU63, controle negativo (-) LFM 461 com pBBRMCS-2 sem inserto. D: LFM 461 com pBBRMCS-2::*phaC*SCU63, controle negativo (-) LFM 461 com pBBRMCS-2 sem inserto. C: LFM 461 com pBBRMCS-2::*phaC*SCU63, controle negativo (-) LFM 461 com pBBRMCS-2 sem inserto. C: LFM 461

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proteínas reguladoras envolvidas no metabolismo de PHA
Tabela 2 - Micro-organismos e Plasmídeos utilizados
Tabela 3 - Oligonucleotídeos usados nas PCR para análise dos genes rDNA 16S e phaC48
Tabela 4 - Temperaturas usadas nas PCR com o par de oligonucleotídeos 27F/1401R48
Tabela 5 - Temperaturas usadas nas PCR com o par de oligonucleotídeos RECF1/R48
Tabela 6 - Oligonucleotídeos usados nas PCR para amplificação completa do gene do <i>phaC</i> epara a clonagem do mesmo
Tabela 7 - Temperaturas usadas nas PCR com o par de oligonucleotídeos phaCF /phaCR50
Tabela 8 - Temperaturas usadas nas PCR com o par de oligonucleotídeos SCU63interno F/R
Tabela 9 - Temperaturas usadas nas PCR com o par de oligonucleotídeos SCU66interno F/R
Tabela 10 - Temperaturas usadas nas PCR com o par de oligonucleotídeos <i>Eco</i> RVcreator2 F/ SacIcreator R
Tabela 11 - Temperaturas usadas nas PCR com o par de oligonucleotídeos PhaCBs F ePhaCBs R
Tabela 12 - Produção de PHA pelos isolados SCU 63 e SCU 66 usando glicose como fonte de carbono
Tabela 13 - Produção de PHA pelas linhagem <i>Pseudomonas</i> sp. usando glicose (10g/L) comofonte de carbono
Tabela 14 - Produção de PHA pelas linhagens avaliadas de Burkholderia sacchari usandoglicose (10g/L) como fonte de carbono em 72 h de cultivo
Tabela 15 - Produção de PHA por linhagens de <i>B. sacchari</i> usando glicose (10g/L) e ácidopropiônico (1g/L) como fontes de carbono. Os dados correspondem à média dos experimentosem triplicata e seu respectivo desvio padrão
Tabela 16 - Produção de PHA por linhagens de <i>B. sacchari</i> usando glicose (10g/L) e ácido butírico (1g/L) como fontes de carbono. Os dados correspondem à média dos experimentos

LISTA DE ABREVIATURAS

- MSC- Massa seca celular
- **4HB** 4-hidroxibutirato;
- 3HB 3-hidroxibutirato
- 3HV 3-hidroxivalerato
- 3HHx 3-hidroxihexanoato
- **3HHp** 3-hidroxiheptanoato
- 3HO 3-hidroxioctanoato
- **3HN** 3-hidroxinonanoato
- 3HD 3-hidroxidecanoato
- 3HDd 3-hidroxidodecanoato
- CG cromatografia gasosa
- CoA coenzima A
- HA hidroxiacil-CoA
- HA_{MCL}- hidroxiacil-CoA de cadeia média (6-14 carbonos) (do inglês Medium Chain Length)
- HA_{SCL}- hidroxiacil-CoA de cadeia curta (3-5 carbonos) (do inglês Short Chain Length)
- HPLC cromatografia líquida, do inglês High Performance Liquid Chromatography
- IPTG isopropil-tio-β-D- galactosídeo
- **Km^R** resistência à canamicina;
- LB Luria Bertani
- **MM -** meio mineral
- P(3HB) poli-3-hidroxibutirato
- **P(3HB-co-3HHx)** poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato)
- **P(3HB-co-3HV)** poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
- P(3HHx-co-3HO) poli(3- hidroxihexanoato -co-3-hidroxioctanoato)
- PCR reação de polimerização em cadeia, do inglês Polymerase Chain Reaction
- **PHA**⁻ ausência de acúmulo de PHA;
- PHAs polihidroxialcanoato
- PhaA

 -cetotiolase
- phaB gene codificador da enzima acetoacetil-CoA redutase
- PhaB acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente

- phaC gene codificador da enzima PHA sintase ou polimerase
- PhaC PHA sintase ou polimerase
- PhaE subunidade da enzima PHA sintase de classe III
- PhaR subunidade da enzima PHA sintase de classe IV
- PhaZ enzimas despolimerizadoras de PHA (despolimerases)
- T_m temperatura de fusão
- XGal 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D- galactosídeo

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Polihidroxialcanoatos (PHAs)	22
2.2 Produção e comercialização de PHA	24
2.3 Propriedades dos PHAs	26
2.4 Aplicações dos PHAs	
2.5 Síntese de PHA	29
 2.5.1 Principais enzimas envolvidas na síntese de PHA 2.5.1.1 β-cetotiolase (PhaA) 2.5.1.2 Acetoacetil-CoA redutase NADPH ou NADH-dependente (PhaB) 2.5.1.3 PHA sintase (PhaC) 	
2.5.2 Síntese de P(3HB)	
2.5.3 Síntese de PHA _{MCL}	
2.5.4 Regulação da produção de PHAs a nível enzimático	
2.5.5 Regulação da produção de PHAs a nível transcricional	
2.6 Produção de copolímeros por linhagens selvagens	
2.7 Produção de copolímeros por linhagens recombinantes	40
3 OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo Geral	44
3.2 Objetivos Específicos	44
4 MATERIAIS E METODOS	45
4.1 Micro-organismoss e Plasmídeos	45
4.2 Produção de Polihidroxialcanoatos (PHA) em frascos agitados	45
4.3 Massa seca celular (MSC)	46
4.4 pH	46
4.5 Teor e composição de polímero	46

SUMÁRIO

4.6 Determinação de PHA pelo corante Sudan Black B47
4.7 Extração de DNA47
4.8 Reações de PCR
4.9 Desenho de Oligonucleotídeos
4.10 Reação de sequenciamento
4.11 Análise das sequências
4.12 Construção de sequências consenso
4.13 Construção de árvores filogenéticas
4.14 Clonagem de dos genes phaC52
4.15 Obtenção de linhagens recombinantes
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO
5.1 Produção de Polihidroxialcanoatos (PHA) por linhagens selvagens
5.2 Análise da sequência de genes do rDNA 16S56
5.3 Análise de genes da PHA sintase60
5.3.1 Detecção e identificação do gene phaC nos isolados SCU 63 e SCU 6660
5.3.2 Clonagem dos genes phaC dos isolados SCU 63 e SCU 6666
5.3.3 Produção de polihidroxialcanoatos por linhagens recombinantes
6 CONCLUSÕES
REFERÊNCIAS98
APÊNDICES
APÊNDICE A - Perfil eletroforético em gel de agarose 1% (m/v), resultante da amplificação por PCR usando os oligonucleotídeos 27F e 1401R113
APÊNDICE B - Análise BLASTn das sequências consenso pertencentes ao gene 16S rDNA dos isolados SCU 63 e SCU 66114
APÊNDICE C - Alinhamento múltiplo das sequências dos genes phaC de quatro linhagens

APENDICE C - Alinhamento múltiplo das sequências dos genes *phaC* de quatro linhagens com organização *phaCAB* e posição dos oligonucleotídeos desenhados phaC F e phaC R...116

APÊNDICE D - Resultado do sequenciamento, usando os oligonucleotídeos phaC F e phaC R121
APÊNDICE E - Resultado do sequenciamento, usando os oligonucleotídeos SCU 63 F/R e Primer interno SCU 66 F/R123
APÊNDICE F - Sequências consenso do gene <i>phaC</i> dos isolados SCU 63 e SCU 66125
APÊNDICE G - Análise BLASTx das sequências consenso pertencentes ao gene <i>phaC</i> dos isolados SCU 63 e SCU 66127
ANEXOS
ANEXO A- Meios de cultura e reagentes utilizados129

1INTRODUÇÃO

Ao longo da história tem se desenvolvido materiais com características que se ajustam às necessidades do homem, tal é o caso dos plásticos, materiais sintéticos, produzidos a partir de petróleo ou gás natural. Atualmente os plásticos sintéticos têm várias aplicações, desde embalagens, produtos domésticos, canos para drenagem materiais de construção, etc. (FORMIGONI; RODRIGUES, 2009).

A grande demanda de plásticos de origem petroquímica tem causado problemas ambientais, uma vez que, são acumulados no meio ambiente, pois não são biodegradáveis. Além disso, ao utilizar grandes quantidades de petróleo, são gerados milhões de toneladas de CO₂ e de outros gases, provocando riscos para a saúde pública. Em 2011, aproximadamente 280 milhões de toneladas de plásticos de origem petroquímica foram produzidos com a expectativa de aumentar 4% ao ano até 2016 (CHEN; PATEL, 2012; GUMEL, ANNUAR; CHISTI, 2013). A área de maior produção está nos países asiáticos (excluindo Japão), onde o consumo de plásticos atual, é de aproximadamente de 20 Kg/per capita. A redução do consumo de plástico é dificultada devido às suas propriedades versáteis, mas é possível substituí-os (CHANPRATEEP, 2010). Uma alternativa é desenvolver materiais sustentáveis ao meio ambiente para minimizar os problemas que são causados pelos plásticos convencionais de origem petroquímica.

Dentre esses materiais são encontrados os polímeros biodegradáveis, os quais podem ser descompostos pela ação de micro-organismos, tais como bactérias, fungos e algas. Descobertos há cerca de 10 anos, estes materiais, atualmente têm uma participação mínima no mercado internacional, em virtude de seu alto custo e limitada aplicabilidade. Vários polímeros biodegradáveis são formados durante o ciclo de crescimento de organismos vivos, envolvendo processos metabólicos complexos para sua formação dentro da célula, sendo denominados polímeros biodegradáveis naturais (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

Existem várias classes de polímeros naturais, dentre eles os poliésteres bacterianos, mais comumente chamados poli-hidroxialcanoatos (PHAs), produzidos naturalmente por uma grande variedade de bactérias como reserva de carbono e energia. Os PHAs tem sido amplamente estudados, já que caracterizam-se principalmente por serem produzidos a partir de fontes renováveis, serem biocompatíveis e biodegradáveis. O termo biodegradável é aplicado a qualquer polímero prontamente degradado a CO_2 e água, sugerindo que podem ser assimilados por distintos micro-organismos impedindo assim o seu acúmulo ambiental (FOSTER et al., 1995; JENDROSSEK; HANDRICK, 2002; KIM; RHEE, 2003; MATAVULJ; MOLITORIS, 1992; TOKIWA; CALABIA, 2004; WITT et al., 2001;). A biocompatibilidade indica que os PHAs não causam efeitos tóxicos quando são aplicados em diversos hospedeiros, pois são inmunologicamente inertes e podem ser degradados pelos tecidos humanos lentamente (VERLINDEN et al., 2007).

A síntese de PHA depende da natureza química da fonte de carbono oferecida às bactérias, também das vias metabólicas que cada uma possui e da classe de PHA sintase. Presente no genoma do micro-organismo. Dependendo da fonte de carbono fornecida, as vias metabólicas bacterianas darão origem a diferentes hidroxiacil-CoA, os quais serão reconhecidos e polimerizados pela PHA sintase (SILVA et al., 2007).

Um dos fatores que determina a composição do polímero, é a especificidade pelo substrato da enzima PHA sintase (PhaC), enzima chave para biossíntese de PHAs, responsável por catalisar a incorporação de monômeros à cadeia polimérica em formação. Existem quatro classes de PHA sintases, as mais destacadas são a classe I, capazes de polimerizar unidades de HA_{SCL} e as de classe II, especificas para unidades de HA_{MCL}. Poucas PHA sintases apresentam a capacidade de incorporar 3HA_{SCL}, assim como, 3HA_{MCL}, como por exemplo as PHA sintases de *Aeromonas caviae* e *Thiocapsa pfennigii* (STEINBÜCHEL; HEIN, 2001).

A partir da sua composição monomérica, os PHAs estão classificados em dois grandes grupos: PHAs de cadeia curta (PHA_{SCL}), sendo o P3HB seu principal representante, e os PHAs de cadeia média (PHA_{MCL}). As propriedades dos PHAs podem variar de acordo com sua composição. O homopolímero P3HB é altamente cristalino, rígido e quebradiço, enquanto, os PHA_{MCL} são menos rígidos e quebradiços do que P3HB, mas o alongamento para ruptura é alto, representando um material elástico com temperatura de fusão baixa (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

Recentemente tem-se demonstrado, que as propriedades anteriormente descritas, podem ser melhoradas com a obtenção de copolímeros PHA_{SCL-MCL}, despertando um grande interesse industrial, já que as propriedades destes copolímeros resultam ser semelhantes ao polietileno de baixa densidade, permitindo ampliar seu uso para diferentes aplicações (HÄNGGI, 1995; LEE et al., 2000; LENZ; MARCHESSAULT, 2005; LU et al., 2004; RAMSAY et al., 1990; WEI et al., 2009).

Esses polímeros podem ser sintetizados por linhagens naturais, apesar disso, linhagens recombinantes têm contribuído a aumentar o rendimento do polímero sintetizado assim como modular a composição do PHA a partir da escolha do hospedeiro adequado (AHN et al.,

2000; LEE et al., 2001; PARK et al., 2001). Isto é, a expressão de genes relacionados à síntese de PHA em outros hospedeiros, pode revelar propriedades não detectadas na linhagem original devido ao metabolismo desta não suprir de forma adequada os monômeros desejados.

Neste contexto, este trabalho buscou avaliar a capacidade de diferentes PHA sintases na incorporação de monômeros na cadeia principal quando são expressas em outras bactérias, apontando à produção de polímeros que são interessantes industrialmente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Polihidroxialcanoatos (PHAs)

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres alifáticos de hidroxialcanoatos acumulados naturalmente por diversas bactérias na forma de grânulos intracelulares como reserva de carbono e energia, que podem representar até 80% da massa seca celular (Figura 1) (SILVA et al., 2007; NAIK, GOPAL; SOMAL, 2008). Os grânulos de PHA estão rodeados por uma membrana fosfolipídica com proteínas ligadas, como a PHA sintase (responsável pela polimerização dos monômeros), a PHA depolimerase intracelular (responsável pela despolimerização) e outras proteínas, algumas com função desconhecida (REHM, 2003). Estes materiais poliméricos são armazenados em altas concentrações dentro da célula, uma vez que não alteram substancialmente o seu estado osmótico (LAYCOCK et al., 2013).

Ao menos três modelos têm sido descritos para a formação in vivo dos grânulos de PHA. Um deles é a formação de micelas, um processo auto-iniciado, provocando a aparição de cadeias insolúveis do polímero no citoplasma ligado às polimerases constituintes da capa externa. O tamanho das micelas aumenta enquanto o polímero aumenta (ELLAR et al., 1968). Uma modificação deste modelo foi proposta recentemente, na qual a nucleação inicial consiste em um dímero PhaC ligado covalentemente a uma cadeia de polímero associada com várias phasinas, as quais estão ligadas para manter a solubilidade (CHO et al., 2012). No segundo modelo Budding, a PHA sintase hidrofóbica está localizada na face interna da membrana citoplasmática, ocasionando a biossíntese de uma membrana que cobre a superfície do grânulo eventualmente brotado (GRAGE et al., 2009). O terceiro modelo, propõe que a existência de alguns elementos de mediação desconhecidos, que funcionam como "andaimes", oferecendo locais para a PHA sintase iniciar a formação do grânulo, desaparecendo nas fases finais da sua formação (TIAN; SINSKEY; STUBBE, 2005). Estudos recentes, como o realizado por Beeby e colaboradores (2012), apoiam o modelo de formação de micelas no citoplasma. Em relação ao segundo modelo de brotamento da membrana, não foi observado nenhum grânulo sendo formado no interior da membrana. Enquanto ao terceiro modelo proposto, foram observados alguns elementos no citoesqueleto mas eles não estavam associados à formação dos grânulos, portanto os resultados obtidos também não sustentam o modelo de andaime (BEEBY et al., 2012).

A síntese de PHA por bactérias em um meio nutritivo ocorre quando há excesso da fonte de carbono e limitação de pelo menos um nutriente essencial para sua multiplicação celular como: nitrogênio, potássio, fósforo, enxofre, magnésio dentre outros (SILVA et al., 2007). De forma oposta, quando há limitação de carbono ou energia, mas não de outros nutrientes, o PHA previamente acumulado pode ser reutilizado para suprir essa necessidade (GOMEZ; BUENO, 2001).



Figura 1 Grânulo de polihidroxialcanoatos. Fonte: (STUBBE et al. 2005)

A produção de PHAs em bactérias foi descrita pela primeira vez em 1926, quando Lemoigne observou que *Bacillus megaterium* produziu um polímero intracelular, o poli-3-hidroxibutirato P(3HB), o qual é mais estudado entre os polímeros. Seis décadas depois, outros poliésteres com sua cadeia principal mais longa (medim-chain-length PHAs [mcl-PHAs]), também foram descritos. Sua produção foi descrita pela primeira vez em *Pseudomonas putida* GPo1(formalmente conhecida como *Pseudomonas oleovorans* GPo1) quando crescia em ácido octanóico. Os PHAs já foram detectados em algumas archaeas e uma ampla categoria de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em ambientes aeróbicos e anaeróbicos (PRIETO, 2007).

A estrutura do PHA consiste em monômeros de hidroxiacil-CoA, nos quais um grupo carboxila de um monômero forma uma ligação éster com o grupo hidroxila de outro monômero. O carbono ligado ao grupo hidroxila é quirálico, entretanto apresenta-se sempre na configuração R. A cadeia lateral de carbonos, ligada ao carbono quirálico, pode conter grupos aromáticos, halogêneos, cadeias carbônicas insaturadas ou ramificadas, etc (Figura 2).

Dependendo do número de átomos de carbono presentes em sua cadeia lateral, os PHA são divididos em dois grandes grupos: a) PHA_{SCL} (short chain length), que contem monômeros de cadeia curta (HA_{SCL}), com 3 a 5 átomos e b) PHA_{MCL} (médium chain length), que contem monômeros de cadeia média (HA_{MCL}), com 6 a 14 átomos (NAIK, GOPAL; SOMAL, 2008).

$ \begin{bmatrix} R & O \\ & \\ O & CH & C \\ H_2 & D \\ Poly(3-hydroxyalkanoate) \end{bmatrix} $				
R group	Carbon no.	PHA polymer		
methyl	C,	Poly(3-hydroxybutyrate)		
ethyl	$\mathbf{C}_{\mathbf{c}}^{4}$	Poly(3-hydroxyvalerate)		
propyl	C	Poly(3-hydroxyhexanoate)		
butyl	$\mathbf{C}_{\tau}^{\circ}$	Poly(3-hydroxyheptanoate)		
pentyl	$\mathbf{C}_{\mathbf{v}}^{'}$	Poly(3-hydroxyoctanoate)		
hexyl	C°	Poly(3-hydroxynonanoate)		
heptyl	C_{10}	Poly(3-hydroxydecanoate)		
octyl	C_{11}^{10}	Poly(3-hydroxyundecanoate)		
nonyl	C_{12}^{n}	Poly(3-hydroxydodecanoate)		
decyl	C_{13}^{12}	Poly(3-hydroxytridecanoate)		
undecyl	C_{14}^{13}	Poly(3-hydroxytetradecanoate)		
dodecyl	C_{15}^{17}	Poly(3-hydroxypentadecanoate)		
tridecyl	C_{16}^{13}	Poly(3-hydroxyhexadecanoate)		

Figura 2 Estrutura química dos polihidroxialcanoatos (PHA), nomenclatura e número de carbonos é determinados pelo grupo alquilo R funcional. O asterisco denota o carbono quiral. Fonte: (TAN et al., 2014).

Muitas bactérias encontradas em lodos ativados, mares e ambientes extremos são capazes de produzir PHA, sendo que mais de 30% desses polímeros são produzidos por bactérias que habitam o solo (CHEN; PATEL, 2012). Diversas espécies de bactérias produzem PHA_{SCL}, sendo o poli-3-hidroxibutirato P(3HB) o polímero mais frequentemente detectado, como no caso da *Ralstonia eutropha*, organismo modelo para estudos de PHAs. Os PHA_{MCL} são comumente produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas* (REHM, 2006).

2.2 Produção e comercialização de PHA

Na década de 1950, tentou-se pela primeira vez a comercialização do P(3HB), pela empresa norte americana W. R. Grace Co, projeto que não teve sucesso pela baixa eficiência de produção e o alto custo que gerou a extração do polímero. Em 1976, Zeneca (anteriormente chamada ICI) produziu várias toneladas de uma serie de copolímeros de PHA sob o nome Biopol[®], que foi vendida para Monsanto e posteriormente a Metabolix (LAYCOCK et al., 2013).

A produção de PHA, baseada em mistura de cultivos bacterianos, tem sido proposta para reduzir os custos de produção. Não há necessidade de esterilizar o biorreator e os microorganismos conseguem se adaptar a substratos mais baratos como resíduos industriais e agrícolas. Este modelo de produção foi observada pela primeira vez em 1974, a partir de água de tratamento residual fornecida como substrato (LAYCOCK et al., 2013).

Posteriormente, no ano 1990, Zeneca UK produziu P(3HB-*co*-3HV) em uma planta piloto de uma bactéria que fazia fermentação a partir de glicose e ácido propiônico (GOMEZ; BUENO, 2001; SHEN; HAUFE; PATEL, 2009;). Naquele período, a Zeneca iniciou o desenvolvimento do processo de produção de P3HB e P3HB/HV em plantas transgênicas. Esta empresa foi incorporada pela Monsanto em 1996, que continuou o desenvolvimento destes polímeros em plantas. Porém em 2001, a Monsanto descontinuou seu negócio como Biopol[®], vendendo-o para Metabolix dos EUA, empresa *spin off* criada a partir do MIT. Ultimamente a Metabolix possui um acordo com a Archer Daniels Midland Co (ADM), para produção deste insumo em biorreator de escala industrial, cujo produto é conhecido comercialmente como Mirel. Em 2006, a empresa entrou com sucesso um IPO nos EUA. Espera-se que ADM e Metabolix em breve gerem 50.000 toneladas de Mirel, usando a nova unidade de produção em construção. A P&G licenciou a empresa japonesa Kaneka Co para a produção de (P3HB/HHx) sob o nome Nodax[®]. Este material é produzido por bactérias em biorreatores a partir de glicose e óleos vegetais, especificamente com óleo de palma (PRADELLA, 2006).

Alcaligenes latus é uma espécie que se caracteriza por cumprir com os requerimentos para a produção de PHA industrial, já que cresce rapidamente em sacarose, glicose e melaço; acumulando P3HB até 90% da massa seca celular. A empresa Chemie Linz, Austria, produzia P3HB em uma quantidade de 1000 Kg por semana em um fermentador de 15m³ usando *A. latus* DSM 1124. Esta espécie consegue crescer em meio mineral contendo sacarose como fonte de carbono. O polímero produzido era utilizado na fabricação de copos, garrafas e seringas. A produção de P3HB e a tecnologia de processamento agora são propriedade de Biomer[®], Alemanha. Diferentes produtos, incluindo canetas e pentes tem sido feitos a partir do P3HB produzido por *A latus*. (CHEN, 2009).

Atualmente, a Mitsubishi no Japão produz P3HB a partir de metanol, com o nome Biogreen[®] e Kaneka Corporation anunciou em 2010 seu plano de iniciar a produção de uma fabrica de um polímero chamado kaneka composto de P3HBH, com uma capacidade de produção de 1000 toneladas por ano na cidade de Takasago, Japão (CHANPRATEEP, 2010). No Brasil, a empresa P3HB Industrial S.A produz P(3HB) em larga escala a partir de cana de açúcar e utiliza uma produção integrada em usina sucroalcooleira. Apesar da utilização de

sacarose como fonte de carbono, os custos de produção da empresa são os menores do mundo. Assim, enquanto o polímero é produzido a US\$ 10-20/Kg na Europa, esses custos são de US\$ 2,5-5/Kg no Brasil, embora este valor ainda represente cerca de 4 a 5 vezes o custo dos polímeros convencionais (FIGUEIREDO et al., 2014; PRADELLA, 2006;). A quantidade total de açúcar desviados para a síntese de P3HB é um percentual baixo (17%), quando comparado ao total de açúcar produzido, garantindo assim que a produção de P3HB não teria qualquer impacto significativo sobre os preços do açúcar (CHEN, 2009).

Não obstante, a indústria de PHA ainda tem vários desafios por superar: Um dos principais inconvenientes para a produção comercial de PHA esta em manter as condições de crescimento exigidas para a síntese de PHA, pois geralmente condições desbalanceadas de nutrientes causam crescimento lento ocasionando uma baixa eficiência e um alto custo de produção no processo, também seu lento processo de cristalização, comparado quanto com o processo dos plásticos convencionais, aumenta os inconvenientes. Em 2006, o custo do P3HB era na gama de €10 por 12 kg. Este preço foi muito mais elevado em relação aos polímeros de amido e outros biopolímeros, devido aos altos custos das matérias primas, pequenos volumes de produção e os elevados custos de processamento, em particular para a purificação (BYROM, 1987; WANG; YIN; CHEN, 2014).

2.3 Propriedades dos PHAs

Os PHAs são plásticos não tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis, produzidos a partir de recursos renováveis. As propriedades termomecânicas dos PHA podem variar desde materiais bastante cristalinos até elastômeros, dependendo de sua composição monomérica. O homopolímero P3HB tem um peso molecular entre 1×10^4 e 3×10^6 g/mol (DOI, 1990), resultando em um material altamente cristalino, rígido e quebradiço, limitando suas aplicações. P(3HB) tem boas propriedades termoplásticas, sendo seu ponto de fusão aproximadamente 180 °C (VERLINDEN et al., 2007).

Outras propriedades do P(3HB) incluem insolubilidade em água e resistência relativa à degradação hidrolítica. Isto diferencia o P(3HB) de outros materiais plásticos de base biológica atualmente disponíveis no mercado, que são sensíveis à umidade. Devido ao P(3HB) ser um material altamente cristalino, este apresenta uma excelente resistência à solventes, como por exemplo, resistência à gorduras e óleos, ou a raios UV, entretanto este polímero é pouco resistência a ácidos e bases. Outro fator relevante é a permeabilidade ao

oxigênio que é muito baixa, o que faz do P(3HB) um material adequado para uso em embalagens de produtos sensíveis a este gás (SHEN; HAUFE; PATEL, 2009).

Dependendo da distribuição entre os grupos éster no esqueleto carbônico dos PHAs pode resultam em um impacto drástico sobre suas propriedades mecânicas. O homopolímero P4HB, por exemplo, é um polímero altamente dúctil, flexível, com uma extensão até à ruptura de cerca de 1000% em comparação com P3HB, que tem uma extensão até à ruptura de menos de 10%. Combinando estes diferentes monômeros para formar copolímeros P(3HB-*co*-4HB), é possível produzir uma série de materiais com uma vasta gama de propriedades mecânicas que podem ser adaptadas às necessidades especificas. Em níveis de aproximadamente de 20-40% de 4HB, o copolímero P(3HB-*co*-4HB) realmente se comporta como borrachas elásticas (WILLIAMS; MARTIN, 2005).

Por outro lado, os PHA_{MCL} são menos rígidos e quebradiços do que P3HB. O alongamento para ruptura é alto, representando um material elástico com temperatura de fusão baixa (VERLINDEN et al., 2007). Os PHA_{MCL} têm valores de Tg abaixo da temperatura ambiente, que variam entre 25 e 65 °C, além de possuirem valores baixos de Tm, entre 42-65 °C. Em temperaturas acima ou perto da sua Tm, o polímero é completamente amorfo e pegajoso (RAI et al., 2011).

O interesse pela produção de PHA contendo diferentes monômeros de HA inseridos em uma cadeia de P(3HB) têm aumentado muito nos últimos anos, uma vez que esses copolímeros têm suas propriedades significativamente melhoradas (DOI, 1990). As propriedades físico-mecânicas, dependem basicamente do tipo de polímero, tamanho e distribuição dos monômeros ao longo da cadeia principal (NODA et al, 2004). Por exemplo, a incorporação de hidroxivalerato (HV) ao P3HB da como resultado poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) P(3HB-*co*-3HV), copolímero que é usualmente comparado com o polipropileno (PP), porque as suas propriedades físico-mecânicas são semelhantes como o ponto de fusão, o grau de cristalinidade e temperatura de transcrição vítrea . O P(3HB-*co*-3HV) pode ser usado para preparar películas e ser processado a menor temperatura (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

Os copolímeros P3HB-*co*-3HA_{MCL} geralmente apresentam resistência à ruptura pelo alongamento maior que o P3HB e temperaturas de fusão superiores ao PHA_{MCL}. No entanto, estas propriedades podem variar dependendo do teor de $3HA_{MCL}$ na cadeia principal do polímero, isto é, quanto maior a proporção de unidades $3HA_{MCL}$, menor são os valores de temperatura de fusão (Tm), temperatura de transição vítrea (Tg) e cristalinidade, fato que acontece de forma similar para a ramificação de R-olefinas no polietileno lineal de baixa densidade. (CHANG et al., 2014).

2.4 Aplicações dos PHAs

Devido a suas propriedades anteriormente descritas, os PHAs proporcionam uma ampla gama de aplicações. Inicialmente, foram usados em películas de embalagem para sacolas, produtos femininos, implantes biomédicos, cosméticos e garrafas plásticas de shampoo (SURIYAMONGKOL et al., 2007). Além do seu potencial como material plástico, os PHAs também são usados como precursores quirálicos para a síntese química de componentes ativos, que são usados como portadores biodegradáveis para a dosagem de medicamentos, hormônios, inseticidas e herbicidas ao longo prazo. Também são utilizados como materiais osteosintéticos na estimulação do crescimento do osso e como substituição em vasos sanguíneos (MADISON; HUISMAN, 1999; REDDY et al., 2003,).

Uma aplicação recentemente sugerida, é o uso de PHAs como precursores de biocombustíveis assim como o bioetanol produzido a partir de açúcares, os PHAs podem ser convertidos em biocombustíveis renováveis. A hidrolise de PHAs seguido pela esterificação de metil proporciona 3-hidroxialcanoatos ésteres metílicos com um conteúdo energético que é comparável com o bioetanol (GAO et al., 2011; GUMEL; ANNUAR; CHISTI, 2013). Os PHAs têm sido usados também agentes controladores na liberação de herbicidas na agricultura. A liberação controlada, reduz potencialmente os efeitos tóxicos dos herbicidas nas espécies não alvo e reduz a necessidade de repetir aplicações. Micro e nano partículas de P3HB e P(3HB-*co*-HB) foram usadas para controlar a liberação do herbicida ametryn®. O P3HB foi testado também com sucesso para remover poluentes orgânicos solúveis em lípidos por adsorção (ANNUAR; CHISTI, 2013; GRILLO et al., 2011; ZHANG et al., 2010).

O homopolímero P(3HB) tem sido estudado para o desenvolvimento de remendos regenerativos, que podem ser usados para fechar o pericárdio do coração após cirurgia, sem a formação de aderências entre o coração e o esterno. Estas aderências representam uma complicação significativa se uma segunda operação é necessária, aumentando assim o risco de ruptura de coração ou um vaso principal (CHENG; LIANG; THOUBAS, 2013). Em um estudo inicial, o pericárdio nativo foi retirado de 18 ovelhas, sendo substituído por um remendo de P(3HB). Durante 30 meses os remendos foram avaliados, examinados para adesões, infecções e resposta inflamatória, e comparados com os controles, onde o pericárdio

nativo tinha sido removido e deixado aberto. Moderadas aderências estavam presentes em todos os controles, enquanto não havia aderências desenvolvidas em 14 dos animais que receberam os remendos de P3HB (WILLIAMS; MARTIN, 2005).

Homopolímeros e copolímeros com PHA-_{MCL}, também têm sido avaliados e analisados para o desenvolvimento de aplicações médicas, como por exemplo, a produção de P(3HO) e P(3HB-*co*-3HHx) é estudada principalmente por causa da sua disponibilidade em grandes quantidades e pelas propriedades elastoméricas. Numerosos estudos *in vitro* com estes polímeros, foram realizados com distintos tipos de células para avaliar sua resposta com o polímero. As células musculares lisas de coelho, foram semeadas em P(3HB-*co*-3HHx) contendo 0-20% de 3HHx (mol%), com o objetivo de avaliar a ligação das células, proliferação celular, ciclo celular e mudanças fenotípicas, observando uma melhor aderência ao P(3HB-*co*-3HHx) contendo 20 mol% de 3HHx, o que implica que as células estudadas apresentam um fenótipo contrátil, apropriado para engenharia de tecidos celulares dos vasos sanguíneos adultos (QU et al., 2006).

Partículas de P(3HB-*co*-3HHx) têm sido utilizadas para a administração de fármacos devido a sua biodegradabilidade e por ser um biomaterial não tóxico. As partículas, foram usadas para a administração de 5-fluorouracilo, etoposido (em combinação com o acido fólico) e complexo de insulina, os quais são eficazes na administração de inulina de forma lenta (CHANG et al., 2014).

2.5 Síntese de PHA

A síntese de PHA depende da natureza química da fonte de carbono oferecida às bactérias, também das vias metabólicas que cada uma possui e da classe de PHA sintase. Na Figura 3, dependendo da fonte de carbono fornecida, as vias metabólicas bacterianas darão origem a diferentes hidroxiacil-CoA, os quais serão reconhecidos e polimerizados pela PHA sintase (SILVA et al., 2007).

As bactérias podem ser alimentadas por diversas fontes de carbono, por exemplo: *E. coli*, produz PHAs a partir de óleos (lipídeos, sacarídeos etc.), produzindo diferentes composições de P(3HB-*co*-HHx); *R. Eutropha* produz P(3HB-*co*-HV) a partir de glicose e ácido propanoico (SHEN; HAUFE; PATEL, 2009).



Figura 3 Síntese de PHA em bactérias. Fonte: (GOMEZ, 2000)

2.5.1 Principais enzimas envolvidas na síntese de PHA

2.5.1.1 β-cetotiolase (PhaA)

A β -cetotiolase (acetil-CoA acil transferase), codificada pelo gene *phaA*, catalisa a condensação reversível de duas moléculas de acetil-CoA gerando acetoacetil-CoA + coenzima A (CoASH) livre. Esta enzima atua tanto na biossíntese, como na degradação de P3HB. A regulação da reação de condensação ocorre pela concentração celular de CoASH, que a altas concentração faz com que a reação ocorre no sentido contrario ao da biossíntese de PHA (LAFFERTY et al., 1988; OEDING; SCHELGEL, 1973).

Haywood e colaboradores (1988) purificaram a β -cetotiolase a partir de uma glicose utilizada por uma cepa de *R. eutropha*. Encontraram que consistia em duas isoenzimas constitutivas, β -cetotiolase A e B, cada uma com sua própria especificidade pelo substrato. A β -cetotiolase A é ativa com apenas 4 ou 5 carbonos 3-cetoacil-CoAs, enquanto a β -cetotiolase B tem uma especificidade mais ampla (4-10 carbonos 3-cetoacil-CoAs), indicando que realiza outras funções distintas à acumulação de PHA (HAYWOOD et al., 1988).

Os autores observaram que a condensação realizada pela 3-cetotiolase foi fortemente inibida pela coenzima A livre. Isso, explica os baixos níveis de P(3HB) em *R. eutropha* quando grandes quantidades de CoASH são liberados pelo ciclo de krebs (HAYWOOD et al.,

1988). Quando Doi e colaboradores (1988), colocaram a crescer *R. eutropha* em ácido butírico com a presença de altas quantidades de sulfato de amônio 3-10 g/L, os níveis de P(3HB) nas células ainda estavam entre 25-30% durante o crescimento; evidenciando que a incorporação de acido butírico dentro do polímero não envolve à β -cetotiolase. Os mesmos resultados com glicose como fonte de carbono mostraram a inibição total da síntese de P(3HB) acima de 4 g/L de sulfato de amônio. O envolvimento ou não da β -cetotiolase, pode ser um fator chave na regulação metabólica do P(3HB) em *R. eutropha* (DOI et al., 1988).

2.5.1.2 Acetoacetil-CoA redutase NADPH ou NADH-dependente (PhaB)

Duas acetoacetil-CoA redutases foram encontradas em *R. eutropha*, cada uma com um substrato distinto e coenzima especifica (NADH ou NADPH). A redutase NADPH dependente , medeia a redução reversível de 4 a 6 atomos de carbono 3-cetoacil-CoA a isômeros R só de hidroxiacil-CoA, enzima encontrada em outros micro-organismos s como *Z. Ramigera*, é um homotetrâmero com subunidades idênticas de 25kDa, mas a sua estrutura cristalina ainda não tem sido determinada. Enquanto a redutase NADH está ligada a efeitos de oxidação tanto de substratos R e S a acetoacetil-CoA, mas produz apenas S-3-hidroxibutiril-CoA no reverso da reação de redução, encontra-se também em micro-organismos s como *A. vinosum* e *Azotobacter viinerandi* (ANDERSON; DAWES, 1990). Doi e colaboradores (1992) determinaram que a redução de 3-cetoacil-CoA pela redutase NADPH dependente, pode ser um passo importante da velocidade na síntese de PHA (DOI et al., 1992), e a síntese de PHA é provavelmente influenciada pela concentração de NADPH nas células, Entretanto em linhagens recombinantes contendo o gene que codifica esta enzima, não aumenta marcadamente o acúmulo de PHA, devido ao fornecimento limitado do NADPH.

3-cetoacilACP redutase (FabG), constituinte da via de biossíntese de ácidos graxos, é uma enzima homologa da acetoacetil-CoA redutase NADHP dependente. A sequência de aminoácidos de PhaB de *B. megaterium*, apresenta uma alta homologia (50% identidade, 66% de similaridade) (LUTZ; BORNSCHEUER, 2012).

A PHA sintase é a enzima chave para biossíntese de PHA, uma vez que sua especificidade pelo substrato definirá a composição e natureza do polímero final (SILVA et al., 2007). Diversos genes de PHA sintases foram obtidos a partir de várias bactérias diferentes. As PHA sintases estão classificadas em quatro classes, de acordo com sua estrutura primária, especificidade pelo substrato e subunidades que a compõem (REHM, 2003).

As classes I e II estão compostas por uma única subunidade PhaC, com uma massa molecular entre 61 e 73 KDa. Enquanto a especificidade pelo substrato as de classe I tem preferência por incorporar monômeros HA_{SCL} , as PHA sintases de classe II tem especificidade por incorporar monômeros de HA_{MCL} , dificilmente incorporando HA_{SCL} (AMARA; REHM, 2003; PEOPLES; SINSKEY, 1989; REHM, 2003). A classe III de PHA sintases contém duas subunidades diferentes: PhaC com uma massa molecular de aproximadamente 40 KDa, com similaridade entre 21 a 28% em relação à PHA sintases das classes I e II, respectivamente, e PhaE que não tem similaridade com outras PHA sintases. A PHA sintase III tem especificidade por monômeros HA_{SCL} (LIEBERGESELL; SCHMIDT; TEINBÜCHEL, 1992). Por último, a classe IV de PHA sintases é semelhante à classe III, mas a subunidade PhaE é substituída pela subunidade PhaR (MCCOOL; CANNON, 2001).

Os genes de PHA sintases e de outras proteínas relacionadas ao metabolismo de PHA estão frequentemente agrupados no genoma bacteriano (Figura 4). Para a classe I da PHA sintases, muitas vezes o gene *phaC* está junto do *phaA* (β -cetotiolase) e do phaB (Acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente), formando o operon *phaCAB* (PEOPLES; SINSKEY, 1989; SLATER; VOIGE; DENNIS, 1988;). Para a classe II, existem dois genes *phaC*, os quais frequentemente estão separados pelo gene *phaZ*, que codifica uma PHA despolimerase intracelular. A jusante do gene *phaC*, encontra-se o gene *phaD* que codifica uma proteína com função desconhecida. Para as bactérias que possuem enzima de classe III, a organização esta composta pelos genes *phaC* e *phaE* agrupados em um único operon. Para a PHA sintase classe IV, comumente encontrada no gênero *Bacillus* sp, econtram-se os genes *phaC* e *phaR* os quais são separados pelo gene *phaB* (MCCOOL; CANNON, 2001; REHM, 2003; SATOH et al., 2002).

Durante o curso da evolução, o gene *phaC* foi algumas vezes arranjado com genes que fornecem monômeros como *phaAB* ou *phaJ* e as vezes com genes envolvidos na regulação

do PHA como o gene *phaZ*. Também durante este processo evolutivo os genes *phaC* resultaram agrupados em um operón com as mesmas unidades transcricionais em bactérias como *P. acidophila*, *R. eutropha*, *Acinetobacter*, *A. latus*, *A. caviae*, como também em unidades transcricionais separadas em bactérias como *Z. ramigera*, *P. denitrificans*, *R. meliloli*, *C. vinosum*, *T. violaecae*, *P. oleovorans* etc. Por outro lado, outros genes *phaC* resultaram acompanhados por *phaF* e *phaP*. Em *C. vinosum* e *T. violacea* o gene *phaEC* está acompanhado pelos genes *phaA* e *phaB* enquanto esses genes não estão presentes em *Synechocystis*. Portanto, evolutivamente a fusão *phaEC* ou splicing do *phaC* pode resultar em rearranjos nos loci P(3HB) (NAIK; GOPAL; SOMAL, 2008).



Figura 4 Organização genética dos genes da PHA sintase representativos que codificam para as várias classes de enzimas. Modificado de REHM, 2003.

2.5.1 Síntese de P3HB

Tem sido o polímero mais estudado e é encontrado no micro-organismo modelo *Cupriavidus necátor*. A biossíntese de P3HB requer a condensação de duas moléculas de acetil-CoA catalisadas pela enzima β-cetotiolase, permitindo a formação de acetoacetil-CoA, o qual é reduzido a (R)-3-hidroxibutiril-CoA pela enzima Acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente. O (R)-3-hidroxibutiril-CoA será então o substrato da PHA sintase, sendo incorporado à cadeia polimérica e é o precursor direto da biossíntese de P(3HB) (Figura 5).

A enzima chave para a regulação dessa via metabólica é a β -cetotiolase. Em condições balanceadas de crescimento, ode todos os nutrientes necessários à multiplicação celular estão disponíveis, espera-se que os níveis de coenzima A(CoA) livre sejam altos, devido à grande demanda por grupos acetil pelo ciclo de Krebs para formação de esqueletos carbônicos e a geração de energia. Quando algum nutriente se torna limitante à multiplicação da bactéria, a demanda por acetil diminui, e com isso os níveis de CoA livre se tornam reduzidos, diminuindo a inibição sobre β -cetotiolase e desencadeando a síntese de P3HB (GOMEZ; BUENO, 2001).



Figura 5 Via metabólica de síntese de P(3HB) a partir de carboidratos. Modificado de (GOMEZ; BUENO, 2001)

2.5.2 Síntese de PHA_{MCL}

Os PHA_{MCL} são sintetizados a partir de intermediários do metabolismo de ácidos graxos. Se a fonte de carbono é oxidada a acetil-CoA, os intermediários da biossíntese *de novo* de ácidos graxos são direcionados para a biossíntese de PHA pela ação da enzima transacilase PhaG (HOFFMANN et al., 2002; REHM, 2006). Esta enzima catalisa a transferência de (*R*)-3-hidroxacil do tioester ACP para CoA. Se a fonte de carbono é oxidada

através da via da β -oxidação de ácidos graxos, a enoil-CoA hidratase (PhaJ) catalisa a oxidação do enoil-CoA a (*R*)-3-hidroxacil-CoA, que será usado como substrato pela PHA sintase, sendo o precursor da biossíntese de PHA (Figura 6). (FUKUI; SHIOMI; DOI, 1998; REHM; 2006).

De um modo geral, o PHA produzido por *Pseudomonas*, quando cultivada em presença de alcanos, álcoois ou ácidos carboxílicos, possui como principal constituinte um monômero contendo o mesmo numero de átomos de carbono que o substrato fornecido. Além disso principal constituinte, também são encontrados outros dois componentes secundários, contendo dois carbonos a mais ou dois carbonos a menos que o substrato. A formação de monômeros, contendo dois carbonos a menos que o substrato, pode ser explicada pela retirada de intermediários do ciclo da β -oxidação de ácidos graxos apos um ciclo completo, onde dois carbonos são retirados com a formação de acetil-CoA contendo dois carbonos a mais, existe a condensação de um alcanoil-CoA, formado diretamente a partir do substrato com uma molécula de acetil-CoA, gerada no ciclo da β -oxidação, numa reação que seria catalisada por uma β -cetotiolase e levaria à formação de uma 3-cetoacil-CoA redutase (GOMEZ; BUENO, 2001).



Figura 6 Via metabólica de síntese de PHA_{MCL} em *Pseudomonas* sp. A partir de carboidratos e ácidos graxos. Modificado de (BABEL; STEINBÜCHEL, 2001)
É bem sabido que a síntese de P3HB é regulada ao nível enzimático (SENIOR; DAWES, 1971) e que a concentração intracelular de acetil-CoA e coenzima A livre, desempenham um papel central na regulação da síntese dos polímeros (HAYWOOD et al., 1988). Tem sido demonstrado que a síntese de P3HB é estimulada por ambas as concentrações intracelulares elevadas de NAD (P) H e elevadas proporções de NAD (P) H/ NAD (P) (LEE et al., 1995). Além disso, a atividade da enzima citrato sintase é significativamente inibida por NADH e NADPH, indicando que a acumulação de P3HB é reforçada pela facilitação do fluxo metabólico de acetil-CoA para a via de síntese de P3HB. Isto sugere que a citrato sintase é um importante ponto de controle de todo o processo de síntese de P3HB com base na sua capacidade para controlar a disponibilidade de CoA, que regula a atividade da 3-cetotiolase (HENDERSON; JONES, 1997). Uma linhagem mutante de *R. eutropha* com vazamento de isocitrato desidrogenase, apresenta baixa atividade no ciclo de Krebs e produz P(3HB) a uma taxa mais rápida do que a linhagem selvagem, resultado que suporta esta hipótese (PARK; LEE, 1996).

Um trabalho realizado com linhagens recombinantes demostrou que a taxa de biossíntese de P3HB é controlada pelas enzimas 3-cetotiolase e acetoacetil-CoA redutase, enquanto que o teor de polímero é controlado pela P3HB sintase (JUNG et al., 2000). Modelagens metabólicas têm sido desenhadas para a biossíntese de P3HB em *R. eutropha*, tendo em conta esses fatores e aspectos regulatórios (LEAF; SRIENC, 1998; YOO; KIM, 1994).

Sobre a regulação de biossíntese de PHAs em *Pseudomonas* sp. não se sabe muito. Quando *Pseudomonas* é cultivada em ácidos graxos, os substratos são metabolizados pela via da β -oxidação de ácidos graxos, finalmente são convertidos em polímeros PHA (HUIJBERTS et al., 1995). Parece ser provável que uma forma de regulação em este micro-organismo, é pela competição da PHA sintase com as enzimas da via da β -oxidação de ácidos graxos pelo substrato (LANGENBACH et al., 1997; REN, 1997).

2.5.4 Regulação da produção de PHAs a nível transcricional

Em vários micro-organismoss os promotores têm sido experimentalmente identificados ou postulados com base na sequência a montante dos genes *pha*. Entre esses um

promotor induzido quando existe uma carência de fosfato foi identificado em *Acinetobacter* sp., o qual parece estar sobe controle do regulão *pho* (SCHEMBRI et al., 1995). No entanto, até agora não se sabe muito sobre proteínas regulatórias especificas na expressão dos genes *pha*. Na Tabela 1, estão algumas da proteínas regulatórias envolvidas no metabolismo de PHA, apresentando a classificação entre as diferentes famílias reguladoras.

Tem sido revelado que a proteína reguladora LuxR não somente controla o sistema de bioluminescência, mas também a síntese de P3HB em *Vibrio harvey* (MIYAMOTO et al., 1998). LuxR é ativada no crescimento celular a uma alta densidade num ambiente confinado, devido à acumulação de N-acil-homoserina lactona autoindutor na mídia. O possível envolvimento de tais sinais é consistente com a produção de PHAs na fase estacionária. Mutantes deficientes na produção de LuxR de *V. harveyi*, também revelaram a falta de produção de P(3HB). Isto, distingue claramente *V. harveyi* de outras espécies de *Vibrio* (MCCOOL; CANNON, 1999).

A maioria dos outros fatores envolvidos em mecanismos de regulação ao nível transcricional foram descritos para *Pseudomonas*. O regulador transcricional chamado P3HBR_{Ps}, foi encontrado na linhagem *Pseudomonas* sp. 61-3. Esta linhagem, considera-se única por que é capaz de produzir um homopolímero de P(3HB) e um copolímero aleatório, o qual consiste em unidade monoméricas de 4 a 12 átomos de carbono. O regulador PhaR_{Ps}, possui uma alta similaridade com a família de ativadores transcricionais da família AraC/XylS, apenas envolvidos na transcrição dos genes necessários para a síntese do homopolímero de P(3HB). A transcrição dos genes necessários para a síntese de *R. eutropha* (PHA⁻), era independente do gene que codifica o regulador PhaR_{PS}, sugerindo a presença de outro promotor funcional a montante dos genes ou outro regulador de *R. eutropha* que pode substituir PhaR_{PS} (MATSUSAKI et al., 1998).

Proteina reguladora	Familia de Reguladores	Organismo
PhaF	Histone H1-like	Pseudomonas oleovorans
PhaR _{Ps}	AraC/XylS	Pseudomonas sp. 61-3
PhaS	Sistemas de dois componentes	Pseudomonas putida
GacS	Sistemas de dois componentes	Azotobacter vinelandii
NtrB/NtrC	Sistemas de dois componentes	Azospirillum brasilense
LuxR	Quorum sensing	Vibrio harveyi

Tabela 1 Proteínas reguladoras envolvidas no metabolismo de PHA FONTE: adaptado de KESSLER;WITHLOT, 2001.

Um gene que codifica uma proteína reguladora putativa foi identificada em *P. putida* KT2442. Foi chamado PhaS, e a sua estrutura primária apresenta homologia com o componente sensor de dois componentes de regulação (MADISON; HUISMAN, 1999), que contém uma proteína histidina quinase e um domínio regulador de resposta. De acordo a estes dados, foi descrito que um sensor transmembranal GaCS, homologo de quinase, regula a produção de alginato e a produção do polímero de P3HB em *Acetobacter vinelandii* (CASTANEDA et al., 2000).

2.6 Produção de copolímeros por linhagens selvagens

O primeiro copolímero descoberto foi o P(3HB-co-3HV) em Ralstonia eutropha. O 3HV pode ser formado condensação de propinil-CoA com acetil-CoA pela β-cetoacil-CoA tiolase, seguido pela redução a 3HV-CoA. Através da variação da proporção de acetato e propionato no substrato, R. Eutropha H16 acumula P(3HB-co-3HV) até 50% da massa seca celular, com níveis 3HV variando entre 0 e 45% (DOI et al., 1987; HOLMES, COLLINS; WRIGHT, 1984). Lee e colaboradores (2008), demonstraram que R. Eutropha H16 pode utilizar como fonte de carbono a mistura entre óleo de palma e propionato de sodio na presença de ureia para sintetizar altos teores do copolímero P(3HB-co-3HV) 90% da massa seca celular com uma fração molar de 7 mol% de 3HV, podendo variar entre um rango de 0-23 mol%, mudando condições no cultivo como pH inicial, a fonte de nitrogênio e sua concentração, este trabalho também evidencia a capacidade de usar fontes renováveis para a produção de copolímeros de PHA (LEE et al, 2008). Outro copolímero que é produzido por R. Eutropha H16 é o P(3HB-co-4HB) a partir de misturas de butirato e 4HB ou misturas com 4-clorobutano, 1,4-butanediol ou γ -butirolactona, produzindo 40% de PHA da massa seca ceular com níveis de 4HB acima de 37 mol%, aumentando assim a temperatura de fusão e diminuindo a cristalinidade (KUNIOKA; KAWAGUCHI; DOI, 1989). R. Eutropha NCIMB 1159 também é capaz de formar P(3HB-co-3HV) a partir de valerato como fonte de carbono, tendo uma fração molar de 85 mol%. Esta mesma linhagem produz terpolímeros contendo monômeros de 3HB, 3HV e 5HV com uma fração molar de 52% deste ultimo, quando são fornecidas misturas de 5-clorovalerato e valerato (DOI et al., 1987).

Outras bactérias selvagens produtoras de copolímeros PHA_{SCL}, como *Methylobacterium extorquens*, a qual é capaz de produzir P(3HB-*co*-3HV) a partir da mistura de metanol com valerato, acumulando 30% de P(3HB) da massa seca celular com um peso molecular de 250,000 Da. Tem sido estudado também a formação de copolímeros P(3HB-*co*-

3HV), P(3HB-*co*-HB), e P(3HB-*co*-3HP) na linhagem *Methylobacterium extorquens* KCTC0048, obtendo valores de PHA do 30 % da massa seca celular, com fracções molares de 0,7 de 3HV, 0, 13 de 4HB e 0,11 3HP (KANG; LEE; KIM, 1993).

Enquanto *M. extorquens* incorpora o ácido fórmico derivado do metanol na via da serina, outro produtor de PHA, *P. denitrificans*, reduz a formação de CO₂, que é posteriormente fixado pela via da ribulose bisfosfato. Estas diferentes vias têm efeitos claros sobre a formação de p(3HB-*co*-3HV) por estes organismos, já que *M. extorquens* sintetiza 50% mais de PHA do que *P. denitrificans*, entretanto a fracção molar de 3HV é maior no polímero produzido por *P. denitrificans*, quando misturas de etanol e pentanol são fornecidas (UEDA et al., 1992; YAMANE; CHEN; UEDA, 1996).

Burkholderia sacchari IPT 101, é uma bactéria selvagem isolada de solo brasileiro a partir de uma seleção de micro-organismoss capazes de produzir PHA usando sacarose como fonte de carbono, matéria prima abundante no Brasil, proveniente do bagaço de cana. Quando são fornecidos como substratos o propionato e glicose, a bactéria é capaz de acumular P(3HB*co*-3HV), acumulando PHA com 32,3% da massa seca celular, com uma fracção de 3HV de 4,6 mol% (BRÄMER et al., 2001).

A incorporação de monômeros PHA_{MCL} , associada a 3HB foi demonstrada para algumas bactérias. O monômero mais comumente incorporado por linhagens selvagens tem sido o 3HHx. A partir de acido hexanôico, foi detectada a acumulação de PHA de cerca de 10% da massa seca celular, em *Rhodospirillum rubrum*, contendo 91,1 mol% de 3HB e 8,9 mol% de 3HHx. Em *Ralstonia eutropha* também foi detectada a produção de P(3HB-*co*-3HHx), contendo 2,2 mol% de 3HHx , quando cultivada em acido hexanóico ou octanóico (GROSS et al., 1989; ULMER et al, 1989).

Outras bactérias produtoras de P(3HB-co-3HHx) são *Aeromonas hydrophila* 4AK4 e *Aeromonas caviae. Aeromonas hydrophila* 4AK4 produz uma fracção molar de 3HHx cerca de 12 mol%, a linhagem não foi capaz de produzir uma fracção de 3HHx, menor de 10 mol% independentemente das condições, no entanto, o copolímero foi o mas adequado como produto fundido termoplástico processável (QIU et al., 2004). *Aeromonas caviae* FA440 isolada do solo, e produz PHA com um 30% da massa seca celular, com uma fracção molar de 3HHx entre 10 e 25 mol%. (FUKUI; DOI, 1997). Nosso laboratório de bioprodutos, foram obtidos seis isolados de *Aeromonas* sp, capazes de produzir P(3HB-co-3HHx) a partir de óleo de soja (MATSUDA et al., 2008).

Burkholderia sacchari 101, anteriormente nomeada, tem a capacidade de acumular copolímero (P3HB-*co*-3HHx) quando suprida com acido hexanóico e glicose, foi observado um aumento de fracção 3HHx até 2 mol%, os ácidos octanóico e butírico não influenciaram nas fracções de 3HHx acumuladas pela bactéria (MENDONÇA, 2009).

Ashby e colaboradores (2002), encontraram que *Pseudomonas oleovorans* NRRLB-778 sintetiza naturalmente uma mistura de P3HB e PHA_{MCL}, a partir de glicose, ácido octanóico e oleico, resultando que suas massas secas celulares estavam entre 3,4, 1,2 e 3,1 g/L respetivamente. A glicose foi o substrato preferido para o crescimento celular para a produção de PHA, já que atingiu menos tempo de cultivo comparado com as outras fontes de carbono, sugerindo que esta bactéria é capaz de sintetizar (R)-3-hidroxiacil-CoA através da biossíntese de ácidos graxos (a partir de glicose) e através da B-oxidação de ácidos graxos (ASHBY; SOLAIMAN; FOGLIA et al., 2002).

2.7 Produção de copolímeros por linhagens recombinantes

Embora as linhagens selvagens tenham a habilidade de acumular PHA durante seu ciclo de vida, frequentemente têm uma taxa de crescimento lenta, assim como uma temperatura ótima de crescimento relativamente baixa, são difíceis para lisar e possuem vias de degradação do PHA, o qual são desvantagens para a produção de PHA (CHEN, 2009). A variedade de bactérias recombinantes têm sido desenvolvidas para melhorar a produção de PHA.

Os micro-organismoss mais comumente usados como hospedeiros heterólogos e no desenvolvimento de fermentação incluem *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas oleovorans* e *Escherichia coli* (LEE; CHOI, 2001). Bactérias como *E. coli* no tem a capacidade de sintetizar ou degradar PHAs, mas, consegue crescer rápido, em altas temperaturas e é fácil para lisar. O crescimento mais rápido permite um tempo de ciclo mais curto para o processo de produção, enquanto a temperatura de crescimento mais elevada proporciona uma economia de custos associados. Que seja mais fácil de lisar proporciona a economia no custo no processo de purificação dos grânulos de PHA (MADISON; HUISMAN, 1999). O copolímero P(3HB-*co*-3HV) pode ser produzido por linhagens de *E. coli* recombinantes. Quando os genes que pertencem à via de biossíntese de PHA de *C. necator* (*phaCAB*), foram introduzidos em *E. coli* LS5218, que pode expressar constitutivamente as enzimas envolvidas na utilização de ácidos graxos de C₄-C₆. P(3HB-*co*-3HV) pode ser produzido a partir de glicose e propionato, como fonte de carbono (SLATER;

GALLAHER; DENNIS, 1992). Em *E. coli* LS5218 também pode se observar a produção de P3(HB-*co*-3HHx), quando os genes PHA sintase (*phaC*) e enoil-CoA hidratase (*phaJ*), com uma porcentagem de PHA de 7-11% da massa seca celular (LEE; CHOI, 2001).

Desde que *R. Eutropha* tem demonstrado que é capaz de acumular uma quantidade significativa de PHA (até 80% em peso), foram realizados diversos estudos para aumentar a síntese de PHA, taxas ou rendimento de PHA sobre o substrato de carbono. *R. eutropha* foi transformada com um plasmídeo de amplo espectro de hospedeiros, contendo seus próprios genes da enzima PHA sintase (*phaC*), sendo capaz de produzir P(3HB-*co*-4HB) e P(3HB-*co*-3HV). A concentração de células e o conteúdo de PHA não aumento, mas apenas a fracção molar e 3HV e 4HB, comparado quanto a linhagem selvagem. A linhagem recombinante tinha uma fracção molar de 50,5% a partir de 20 g/L de acido propiônico, enquanto que a de tipo selvagem produziu o copolímero tendo 34, 1% de fracção molar de 3HV. A partir de 20 g/L de acido 4-hidroxibutirico, a fracção molar de 4HB aumentou de 24,1% no tipo selvagem, a 57,6 mol% na linhagem selvagem (PARK; HUH; LEE, 1997).

Linhagens recombinantes de *Aeromonas hydrophila* 4AK4, abrigando os genes *phaPCJ*, são capazes de acumular terpolímeros de P(3HB-*co*-HV-*co*-HHx) ou P(3HB-*co*-4HB-*co*-3HHx) (ZHAO et al., 2007). *A. hydrophila* 4AK4, abriga um gene truncado *tesA*, que codifica a thioesterase citosolica I de *E. coli* e que catalisa a conversão de acil-ACP em ácidos graxos livres, foi capaz de sintetizar P(3HB-*co*-3HHx), contendo 10,14 mol% de HHx, quando gluconato e glicose (QIU et al., 2004).

A produção de misturas de P3HB e PHA_{MCL}, em linhagens recombinantes de *Pseudomonas*, abrigando genes da biossíntese de PHA também tem sido reportada. Frações equimolares de 3HB e 3HO incorporadas ao PHA produzido por *P. oleovorans* ATCC29347 abrigando os genes da biossíntese de PHA de *R. eutropha* no cultivo com octanoato correspondendo a mais de 75% da massa seca celular, enquanto que no cultivo em glicose apenas P3HB produzido, correspondendo a menos de 10% da massa seca celular. A precipitação fracionada do PHA produzido por esta linhagem recombinante mostrou a formação de uma blenda de P3HB homopolímero e PHA_{MCL}, e não de um copolímero (TIMM; BYROM; STEINBUCHEL, 1990).

Tem sido demonstrado que a produção de PHA por linhagens recombinantes de *Pseudomonas* abrigando genes permitindo a utilização de novos substratos. *Pseudomonas acidóphila*, é uma linhagem bacteriana que produz copolímeros de PHA a partir de compostos orgânicos de baixo peso molecular, tais como formiato e acetato. Quando um plasmídeo

contendo os genes para o crescimento para crescimento quimiolitoautrofico de *Alcaligenes hydrogenophilus* foram introduzidos em *P. acidóphila*, este recombinante foi capaz de crescer sob uma mistura de gases de H₂, O₂ e CO₂, acumulando copolímeros de PHA, com uma proporção de 52,8 mol% de 3HB, 41,1 mol% de 3HO e 6,1mol% de 3HD. No entanto, o teor de polímero era relativamente baixo com 7% da massa seca celular (YAGI et al., 1996).

Do ponto de vista da composição e propriedades do polímero, as linhagens recombinantes despertam um grande interesse, já que é possível controlar a composição do polímero, fato que não acontece com as linhagens selvagens. O controle da composição do polímero permite com que a produção de PHA seja consistente e reproduzível; assim como permite ajustar e melhorar as propriedades do polímero para o uso de novas aplicações (TAPPEL et al., 2012; TRIPATHI et al., 2013).

Recentemente, estratégias de engenharia metabólica suportam a produção de copolímeros SCL-MCL, como a expressão heteróloga de genes da biossíntese de PHA, mais especificamente o gene phaC, que codifica a enzima PHA sintase (PhaC), pois dependendo da sua especificidade, determina a composição do PHA. A produção de copolímeros SCL-MCL requer de PHA sintases com um amplo rango pela especificidade do substrato, como a PhaC de Aeromonas caviae e Pseudomonas stutzeri 1317, enzimas que têm sido bem caracterizadas e expressadas para a produção de copolímeros. Por exemplo, Fukui e Doi (1997), estudaram a expressão heteróloga dos da PHA sintase de A. caviae em uma linhagem mutante PHA⁻ de Pseudomonas putida, a qual produziu P(3HB-co3HHx) a partir de gluconato, hexanoato e octanoato, acima de 48% da massa seca celular, com uma fracção molar relativamente alta de 3HHx, em comparação com o valor obtido pela linhagem recombinante de R. eutropha abrigando os mesmos genes (FUKUI; DOI, 1997). Também demonstrou-se recentemente que a linhagem recombinante de R. eutropha PHA⁻ pode expressar seu próprio gene phaC, sendo capaz de acumular P (3HB-co-3HHx) com conteúdo de PHA de 81% da massa seca celular, quando até mesmo ácidos graxos de cadeia com comprimento de cadeia igual ou superior a C6, foram fornecidos como fontes de carbono. A fracção molar de 3HHx no copolímero foi de 8% molar. Resultados semelhantes foram obtidos com mutantes PHA⁻ de Klebsiella e Pseudomonas putida GPp104,, expressando os genes phaC de R. eutropha. Estes resultados demonstraram uma especificidade para o substrato mais alargada do PHA sintase R. Eutropha do que se pensava (DENNIS et al., 1998).

Aplicando esta estratégia de engenheira metabólica, tem se demonstrado que a especificidade do substrato pela PHA sintase pode variar ampliando-a, porque a linhagem hospedeira proporciona por meio de outras vias metabólicas diferentes substratos, sendo aceitos pela enzima, caso que não acontece com a linhagem original. Recentemente, a PHA sintasa de *Pseudomonas stutzeri* 1317 expõe extraordinariamente especificidade por outros substratos, sendo capaz de sintetizar copolímeros PHA_{SCL-MCL}, constituídos por monómeros com 4-12 átomos de carbono de comprimento. Quando a linhagem PHA- de *Ralstonia eutropha* abrigava o gene *phaC2*_{PS} (LUO et al., 2005). Clemente e colaboradores (2000), demonstraram as preferencias por unidades de C5 das PHA sintases de *R. eutropha*, *R. Shaeroides* e *T. violácea*, quando foram expressos dentro de *R. eutropha* DSM541, suplementado com 0,4 (p/v) de propionato de etilo. A expressão da PHA sintase de *N. corrallina* dentro de *R. eutropha* DSM541, usando propionato 0,1% como fonte de carbono, também evidenciou a preferência em incorporar monômeros C5 na cadeia principal do polímero com uma fração molar de 76,4 mol% (CLEMENTE et al., 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o potencial de diferentes PHA sintases em promover a síntese de PHA com composições diferenciadas. Em especial busca-se por linhagens capazes de produzir polímeros contendo 3HB e 3HA_{MCL} em sua composição.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de PHA de isolados obtidos a partir de amostras de solo, em meio de cultura contento excesso de fonte de carbono.
- Identificar os genes *phaC* destes isolados e cloná-los em um plasmídeo adequado para sua expressão em outras bactérias.
- Analisar a produção e composição de PHA de bactérias recombinantes, usando diferentes fontes de carbono.

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 Micro-organismoss e Plasmídeos

Os micro-organismoss e plasmídeos utilizados estão listados na Tabela 2

Tabela 2 Micro-	organismoss	e Plasmídeos	utilizados
-----------------	-------------	--------------	------------

Micro-organismos	Descrição	Referência
SCU 63	Isolado proveniente de amostra de solo,	(Lício, 2011)
	produtor de P3HB	
SCU 66	Isolado proveniente de amostra de solo,	(Lício, 2011)
	produtor de P3HB	
E. coli DH5α	supE44, lacU169 (Ö80lacZÄM15), recA1	Invitrogen
	endA1, hsdR17, thi-1, gyrA96, relA1	
<i>E. coli</i> S17-1	Gene recA e tra do plasmídeo RP4	(Simon et al.,
	integrados ao cromossomo	1983)
Burkholderia sacchari	Linhagem selvagem, Sac ⁺ , PHA ⁺ , Hx ⁺ , Kan ^S ,	(Gomez, 1994)
LFM 101	Amp ^s , Tc ^s	
Burkholderia sacchari	Sac ⁺ , PHA ⁻ , Kan ^S , Amp ^S , Tc ^S , mutante obtido	(Filipov, 2000)
LFM 344	por radiação UV.	
Pseudomonas putida	Linhagem selvagem produtora de PHA _{MCL}	(Gomez, 2000)
LFM 046	isolada a partir de solo de canavial.	
Pseudomonas putida	Mutante LFM 046 deficiente no acúmulo de	(Gomez, 2000)
LFM 461	PHA, a partir de glicose e octanoato ($phaC$)	

Plasmídeo	Descrição	Referência
pBBR1MCS-2	Vetor de amplo espectro de	(Kovach et al.,
	hospedeiros, <i>lacPOZ</i> , Km ^R	1995)
pBBR1MCS-2::phaC _{SCU63}	Derivado pBBR1MCS-2 contendo o	Este trabalho
	gene phaC do isolado SCU 63	
pBBR1MCS-2::phaC _{SCU66}	Derivado pBBR1MCS-2 contendo o	Este trabalho
	gene <i>phaC</i> do isolado SCU 66	
pBBR1MCS-2:: <i>phaC</i> _{Bs}	Derivado pBBR1MCS-2 contendo o	Este trabalho
	gene phaC de Burkholderia sacchari	

4.2 Produção de Polihidroxialcanoatos (PHA) em frascos agitados

A partir de colônias isoladas em ágar Luria Bertani (LB) ou Luria Bertani com Canamicina (LBK), prepararam-se os inóculos em 25 mL de meio liquido LB ou LBK e incuba-se por 24h a 30 °C em agitador rotativo (150 rpm). Um volume de 2,5 mL desta cultura foi utilizado para inocular meio mineral (MM), completando um volume total de 25 mL. Ao MM adicionaram-se fontes de carbono (glicose e/ou ácido propanóico, butírico, valérico, hexanóico, heptanóico, nonanóico e 4-hidroxibutanoico), em concentrações ajustadas em cada experimento de modo a se obter multiplicação celular e acúmulo do polímero, conforme descrito ao longo do texto. A incubação foi realizada em agitador rotativo por 72h (30 °C e 150 rpm). Ao final do cultivo, foram feitas análises para determinar pH, massa seca celular (MSC), teor e composição de PHA acumulado. Para cada linhagem, a cultura foi feita em triplicata. A composição dos meios está no ANEXO A.

4.3 Massa seca celular (MSC)

Dez mililitros (10 mL) de suspensão celular foram centrifugados (8000 rpm, 15 min e 4 °C), o sobrenadante foi descartado e as células foram submetidas a liofilização. A massa seca celular foi determinada gravimetricamente em balança analítica.

4.4 pH

Foi medido no sobrenadante depois da centrifugação da cultura, no potenciômetro modelo Tec-2 (Tecnal) utilizando padrões de pH 4,0 e 7,0.

4.5 Teor e composição de polímero

A quantidade e composição de PHA foram determinadas por cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (RIIS E MAI, 1988). Cerca de 10 a 15 mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos, aos quais foram adicionados 2 mL de uma solução de acido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2- dicloroetano e 100 μ L de uma solução de acido benzoico (40 g/L) em propanol. Os tubos foram fechados fortemente e colocados em banho (100 °C) por 30 minutos. Após este período, foram colocados em agitação e postos novamente por duas horas e meia no banho, fazendo ao final também uma agitação. Posteriormente, após o resfriamento dos tubos, foram adicionados 4 mL de água destilada, sendo agitados por 30 segundos, para separar a fase orgânica e fase aquosa. Para retirada de resíduos de água, foi adicionado sulfato de sódio anidro, sendo a fase orgânica utilizada para a análise. Um volume de 1 μ L da fase orgânica foi analisado após fracionamento da amostra ("Split" 1:20) em cromatógrafo gasoso HP 7890 Series GC System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos) equipado com uma coluna HP-5 (5% fenil-metilsiloxano, comprimento 30

m, diâmetro 0,25 mm, espessura do filme 0,25 μm) (Agilent Technologies). A análise foi realizada com as seguintes condições:

- Gás de arraste: Hélio (0,8 mL/min)
- Temperatura do injetor: 250 °C
- Temperatura do detector: 300 °C
- Sistema de detecção: Ionização de chama (FID)
- Programa de temperatura no forno: 100 °C

por 1 min, elevação da temperatura até 210 °C a 8°C/min e 210 por 15 min

Ácido benzoico foi usado como padrão interno. Polímeros produzidos por *P*. *oleovorans*

ou *P. putida* a partir de diferentes fontes de carbono ou P3HB e P3HB-*co*-3HV (Aldrich) foram utilizados como padrões para a geração das curvas de calibração. O PHA total foi calculado somando-se as quantidades dos constituintes 3HB (3-Hidroxibutirato), 3HV (3-Hidroxivalerato), 3HHx (3-Hidroxihexanoato), 3HHp (3-Hidroxiheptanoato), 3HO (3-Hidroxioctanoato), 3HN (3-Hidroxinonanoato)3HD (3-Hidroxidecanoato) e 3HDD (3-Hidroxidodecanoato)

4.6 Determinação de PHA pelo corante Sudan Black B

As linhagens recombinantes foram cultivadas em meio apropriado para o acúmulo do polímero (GOMEZ, 1994) usando glicose como fonte de carbono. Após esse cultivo, foi adicionado o corante Sudan Black B 0,02% em etanol 96%. O corante foi deixado no meio de cultura com as colônias por dez minutos, seguido de lavagem com etanol 96%. Colônias que tivessem coloração azul teriam acumulado PHA e as que não, ficariam levemente azuis ou não se corariam (SCHLEGEL; LAFFERTY; KRAUSS, 1970). As composições do meio de cultura e dos reagentes utilizados estão no ANEXO A.

4.7 Extração de DNA

Para a extração do DNA as linhagens bacterianas foram cultivadas por 12 h em meio liquido Luria Bertani (LB) ou Luria Bertani suplementado com canamicina (LBK). A extração de DNA genômico foi feita utilizando o kit **DNeasy Blood e Tissue Kit (Qiagen)** e a extração de DNA plasmidial com o kit **QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos)** conforme instruções do fabricante.

4.8 Reações de PCR

Os oligonucleotídeos utilizados para a detecção do gene que codifica o rDNA 16S e para a detecção do gene *phaC* foram sintetizados e são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 (Dligonucleotídeos	usados nas PCR	para análise dos	genes rD	NA 16S e <i>phaC</i>
------------	-------------------	----------------	------------------	----------	----------------------

Oligonucleotídeos e Sequências	Referência
27F 5 ′ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3 ′ 1401R 5 ′ CGGTGTGTACAAGAAGACCC 3 ′	(Stackebrandt, 1991)
RECF1 5 ′ TGTTGCAGTACAAGCCGCTGA- 3 ′ RECR 5 ′ GGCACGATATGGTC- 3 ′	(Lício, 2011)

A amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) utilizando o kit Go*Taq* Master Mix (Promega, Madison, WI, Estados Unidos). Foram utilizados entre 50 e 250 ng de DNA molde, 1,0 mM de cada um dos oligonucleotídeos.

A programação das temperaturas utilizada para os pares de oligonucleotídeos 27F/1401R (STACKEBRANDT, 1991) e REC F1/R (LÍCIO, 2011), são apresentadas nas Tabelas 4 e 5. Foram feitos 35 ciclos a partir da temperatura de desnaturação até a temperatura de extensão.

Temperatura de desnaturação inicial	95 °C	3min
Temperatura de desnaturação	95 °C	40s
Temperatura de anelamento	44 °C	30s
Temperatura de extensão	72 °C	1:40min
Temperatura final de extensão	72 °C	5min

Tabela 4 Temperaturas usadas nas PCR com o par de oligonucleotídeos 27F/1401R

Temperatura de desnaturação inicial	95 °C	3min
Temperatura de desnaturação	95 °С	40s
Temperatura de anelamento	50 °C	30s
Temperatura de extensão	72 °C	40s
Temperatura final de extensão	72 °C	5min

4.9 Desenho de Oligonucleotídeos

Realizou-se um alinhamento múltiplo no Clustal W com genes phaC de várias espécies do gênero Burkholderia, encontradas na base de dados do GeneBank. Posteriormente ao alinhamento, avaliaram-se as regiões conservadas e desenharam-se os oligonucleotídeos phaCF e phaCR, que reconhecem as porções inicial e terminal do gene. Os amplicons resultantes desta PCR foram sequenciados e desenharam-se os oligonucleotídeos SCU 63 interno F/R e SCU 66 interno F/R, que amplificam a região interna dos genes phaC de cada um dos isolados e foram utilizados para obtenção da sequência completa dos genes phaC de SCU63 e SCU66. Para a clonagem do gene completo, bem como de regiões reguladoras de sua expressão (promotor e sítio de ligação do ribossomo), foram desenhados os oligonucleotídeos EcoRVcreator2 F/ SacIcreator R. Estes oligonucleotídeos foram desenhados com base nas sequências adjacentes ao gene phaC da linhagem B. cepacia GG4. Para facilitar a clonagem, as extremidades de cada um dos oligonucleotídeos continha sítios de restrição para as enzimas EcoRV ou SacI. Para este trabalho também foi clonado o gene phaC de Burkholderia sacchari LFM 101, com fins de ter um controle positivo para a os próximos experimentos. Os oligonucleotídeos PhaCBs F e PhaCBs R, foram desenhados com base na sequência do gene previamente sequenciada. Estes oligonucleotídeos além de carregar sequências para os sítios de restrição das enzima BamHI e SacI, amplificam a região promotora. As sequências dos oligonucleotídeos estão descritas na Tabela 6.

A programação de temperaturas utilizada para os pares de oligonucleotídeos phaCF/phaCR, SCU63 interno F /R, SCU66 interno F /R e *Eco*RVcreator2 F/ *Sac*Icreator R, PhaCBs F e PhaCBs R, são apresentadas nas Tabelas 7 ,8, 9, 10, 11. Foram feitos 35 ciclos a partir da temperatura de desnaturação até a temperatura de extensão.

As PCRs usando os oligonucleotídeos *Eco*RVcreator2 F/ *Sac*Icreator R e PhaCBs F/PhaCBs R foram feitas usando a enzima HotStar*Taq* DNA Polymerase da Quiagen.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1% (m/v) em TAE 1X aplicando-se uma corrente de 100 mA por 45 minutos utilizando a fonte de eletroforese modelo LPS-300V (loccus Biotechnologia, Cotia, SP, Brasil) e corados com SYBR® Safe DNA Gel Stain. Foi utilizado o sistema de fotodocumentação Multidoc-It Digital Imaging System (UVP, Uplan, CA, Estados Unidos) para a visualização das bandas com luz UV.

 Tabela 6 Oligonucleotídeos usados nas PCR para amplificação completa do gene do *phaC* e para a clonagem do mesmo

Oligonucleotídeos e Sequências	Fragmento
phaCF 5' GCAGGTAATGACAGCATCG -3'	
phaCR 5' CGTCAATCGCGCTGCAAC 3'	1875 pb
SCU 63 interno F: 5'GATGATGAACCTGCTCGGCG 3'	
SCU 63 interno R: 5' GCCCTTCAGGTAGTTGTCG 3'	697 bp
SCU 66 interno F: 5' GAACTGAAGGACCGCCGCTTC 3'	
SCU 66 interno R: 5' CGACGACGTAGTTCCACACG 3'	940 bp
EcoRVcreator2 F	
5' GCATTGGATATCCCATGCGTGCATGCGCAAGGTTTGTTG -3'	
SacIcreator R	2257 bp
5′ TACAATGAGCTCTCAATCGCGCTGCAACACGTAG -3′	
PhaCBs F	
5′GTAAGTGGATCCGTACTTCATGCGATTCAAATCAG-3′	
PhaCBs R	2380 bp
5'CGAATTGAGCTCCACGTTAAAAACCTTTCACC-3'	

Tabela 7 Temperaturas usadas nas PCR com o par de oligonucleotídeos phaCF /phaCR

Temperatura de desnaturação inicial	95 °C	3 min
Temperatura de desnaturação	95 °C	40 s
Temperatura de anelamento	48 °C	30 s
Temperatura de extensão	72 °C	2 min
Temperatura final de extensão	72 °C	5 min

Tabela 8 Temperaturas usadas nas PCR com o par de oligonucleotídeos SCU63 interno F/R.

Temperatura de desnaturação inicial	95 °C	3min
Temperatura de desnaturação	95 °C	1min
Temperatura de anelamento	53 °C	1min
Temperatura de extensão	72 °C	43 s
Temperatura final de extensão	72 °C	5min

Tabela 9 Temperaturas usadas nas PCR com o par de oligonucleotídeos SCU66 interno F / R.

Temperatura de desnaturação inicial	95 °C	3min
Temperatura de desnaturação	95 °C	1min
Temperatura de anelamento	55 °C	1min
Temperatura de extensão	72 °C	1min
Temperatura final de extensão	72 °C	5min

Tabela 10 Temperaturas usadas nas PCR com o par de oligonucleotídeos EcoRVcreator2 F/
SacIcreator R.

Temperatura de desnaturação inicial	95 °C	5 min
Temperatura de desnaturação	94 °C	15 s
Temperatura de anelamento	58 °C	1 min
Temperatura de extensão	72 °C	2:20 min
Temperatura final de extensão	72 °C	10 min

Tabela 11 Temperaturas usadas nas PCR com o par de oligonucleotídeos PhaCBs F e PhaCBs R

Temperatura de desnaturação inicial	95 °C	5 min
Temperatura de desnaturação	94 °C	15 s
Temperatura de anelamento	52 °C	1 min
Temperatura de extensão	72 °C	2:30 min
Temperatura final de extensão	72 °C	10 min

4.10 Reação de sequenciamento

Os produtos de PCR ou plasmídeos construídos foram purificados com o kit QIAquick PCR purification Microcentrifuge QIAGEN e utilizados para a reação de sequenciamento no centro de estudos do genoma humano – USP. O equipamento usado foi o ABI 3730 DNA Analyser (Applied Byosistems, USA), com o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits.

4.11 Análise das sequências

As sequências foram analisadas usando as ferramenta BLASTN e BLASTx encontradas no National Center for Biotechnology (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov</u>). Para a análise de sequências promotoras foi usada a ferramenta BPROM (Prediction of bacterial promoters), encontrada no site Softberry (<u>http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb</u>). Para predição das sequências de aminoácidos as sequências de nucleotídeos foram submetidas ao servidor Expasy Bioinformatics Resource Portal (<u>http://web.expasy.org/translate/</u>).

4.12 Construção de sequências consenso

A partir dos resultados de sequenciamento, as sequencias foram alinhadas no programa Pregap4 (BONFIELD; STADEN, 1996), buscando uma sequência consenso. Para formar a sequência consenso final dos genes *phaC*, foi necessário utilizar também o programa serial cloner 2.6, com base nas sequencias consenso resultantes de cada par de oligonucleotídeos.

4.13 Construção de árvores filogenéticas

Conforme às análises das sequencias utilizando as ferramentas BLASN e BLASTx. Análises filogenéticas, realizaram-se utilizando MEGA versão 5.2.2. As sequências foram alihadas utilizando o programa ClustalW. As árvores filogenéticas foram construídas pelo método neighbor-joining com distâncias genéticas calculadas usando o modelo de p-distância e análise de bootstrap de 1000 replicas raiz no ponto médio.

4.14 Clonagem de dos genes phaC

O produto de PCR usando os oligonucleotídeos *Eco*RVcreator2 F/ *Sac*Icreator R e PhaCBs F/PhaCBs R, foi diregido com as enzimas *Sac*I fast digest, *Eco*RV fast digest e *Bam*HI fast digest (Fermentas, Waltham, MA, Estados Unidos), bem como o plasmídeo pBBR1MCS-2 (KOVACH et al., 1995). A reação de ligação foi realizada com o uso da enzima T4 DNA ligase (Thermo) e o produto de ligação foi utilizado para transformar à linhagem *E. coli* DH5α e *E.coli* S17-1 (Simon, Priefer e Puhler, 1983), pelo método de transformação por choque elétrico.

Os clones da linhagem *E. coli* DH5α foram selecionados em meio Luria Bertani suplementado com canamicina, IPTG e X-gal. O DNA plasmidial total foi extraído e testado por PCR com os oligonucleotídeos *Eco*RVcreator2 F/ *Sac*Icreator R para conferir a presença dos genes.

4.15 Obtenção de linhagens recombinantes

Os plasmídeos pBBR1MCS-2::phaCSCU66, pBBR1MCS-2::phaCSCU63 e pBBR1MCS-2:: $phaC_{Bs}$, foram transferidos da linhagem *E.coli* S17-1 para as linhagens mutantes *Pseudomonas* sp. LFM 461 e *B. sacchari* LFM 344 por conjugação.

A conjugação foi realizada primeiro fazendo um inóculo das linhagens de *Pseudomonas, Burkholderia* e *E. coli* S17-1 com o plasmídeo, em meio LB e LBK. 1 mL das

células doadoras e receptoras foi centrifugado, lavado e resuspenso em 100 μ L de solução salina.

As suspensões provenientes das culturas de células doadoras e receptoras foram reunidas e espalhadas na superfície de meio mineral suplementado com glicose 10 g/L e Canamicina 10 μ g/mL (MMGK). Colônias recombinantes crescidas em meio mineral (MMGK), foram novamente estriadas nesse meio para confirmar o isolamento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de Polihidroxialcanoatos (PHA) por linhagens selvagens.

Os isolados SCU 63 e SCU 66 são provenientes de amostras de solo do Campus Universitário (Reserva Florestal da Cidade Universitária Armando Salles de Oliveira), por isolamento direto. Lício (2011) demostrou em um cultivo em frascos agitados em meio mineral com glicose como única fonte de carbono (10 g/L), que os isolados destacaram-se por atingir, após 72 horas de cultivo, massas secas celulares de 5 g/L, contendo 55% de P3HB. Valores estes próximos aos atingidos pelo organismo de referência (*Burkholderia sacchari* LFM 101).

Neste trabalho, os micro-organismos foram cultivados em um meio mineral, limitado na fonte de nitrogênio (1g/L de sulfato de amônio) e usando glicose como fonte de carbono (10 g/L), com o objetivo de confirmar os resultados obtidos previamente por Lício (2011). Além disso, também foi realizado um cultivo com uma concentração de glicose de 15 g/L. A Tabela 12 apresenta os resultados destes cultivos.

Os isolados SCU 63 e SCU 66 são produtores PHA contendo especificamente o monômero 3-hidroxibutirato (3HB). Para todos os ensaios realizados, houve pequena redução do pH do meio de cultivo, a massa seca celular do isolado SCU 63 atingiu 5,36 g/L usando uma concentração de glicose de 10 g/L e 5,75 g/L quando se usou a concentração de 15 g/L de glicose. Nas duas concentrações de glicose utilizadas, houve a produção de quantidades consideráveis de P3HB correspondendo a mais que 55% da massa seca celular, confirmando que estas bactérias isoladas utilizam eficientemente a glicose, principal carboidrato encontrado no meio ambiente.

Os valores obtidos da massa seca celular para o isolado SCU 66 foram de 4,65 g/L e 5,26 g/L, produzindo também quantidades relevantes de P3HB, correspondendo a 57,38% e 60,63% da massa seca celular. Foi observado pequena redução nos valores de pH das culturas, atingindo valores entre 6,49 e 6,55, indicando que as bactérias não liberam compostos que modificam o pH do meio.

A capacidade de produzir P3HB a partir de glicose sugere que estas bactérias são capazes de promover a condensação de duas moléculas de acetil-CoA para gerar acetoacetil-CoA, que após sua redução para 3-hidroxibutiril-CoA, poderia ser utilizado como monômero na biossíntese de P3HB.

Pode-se observar que usando várias concentrações da fonte de carbono, os valores tanto da produção de PHA, quanto da massa seca celular foram muito próximos para cada um dos isolados. Além disso, não se observou diferença significativa no desempenho entre as linhagens, embora os valores médios de massa seca celular e teor de polímero acumulado sejam maiores para o isolado SCU 63. Kim e colaboradores (1994) realizaram estudos sobre a produção de P3HB, avaliando diferentes concentrações de glicose e concluíram que as concentrações ótimas para a produção do polímero estavam entre 10 e 20 g/L (KIM et al., 1994). Logicamente, este valor depende de outros fatores, como a concentrações do nutriente que deverá limitar o crescimento celular e, desta forma, definir a extensão do crescimento celular e acúmulo de PHA. Um dos fatores que pode ter definido que a massa seca celular não aumentasse proporcionalmente ao aumento da concentração de glicose suprida é que esta não tenha sido completamente consumida.

Lício (2011) avaliou também a produção de PHA dos isolados SCU 63 e SCU 66, usando como única fonte de carbono ácido octanóico, no qual também foi evidenciada a produção de P(3HB) correspondendo a 55% da massa seca celular. Como o ácido octanóico pode ser oxidado a acetil-CoA no ciclo de β-oxidação de ácidos graxos, funciona como fonte de carbono para produção de P3HB. Além disso, intermediários de 4 carbonos da β-oxidação de ácidos graxos podem ser utilizados para gerar diretamente 3HB-CoA, que é polimerizado pela PHA sintase (GOMEZ; BUENO, 2001).

Outra característica a ressaltar é a especificidade e eficiência da PHA sintase em ligar diferentes monômeros à cadeia principal. Por um lado, a bactéria pode gerar monômeros que não são incorporados por sua PHA sintase. Por outro lado, a PHA sintase pode apresentar especificidade por monômeros que não é revelada na linhagem hospedeira devido a essa não ser capaz de sintetizar esse monômero. Assim, o melhor sistema para avaliação da PHA sintase, consiste em expressá-la em hospedeiro reconhecidamente capaz de gerar diferentes monômeros. Um dos objetivos deste trabalho foi expressar o gene *phaC* dos isolados SCU63 e SCU66 em *Pseudomonas* sp. LFM461 e *B. sacchari* LFM344. Estas linhagens são capazes de suprir diferentes monômeros à PHA sintase (GOMES, 2009; MENDONÇA et al., 2013; SILVA et al., 2000).

Cabe destacar a eficiência de diversas bactérias isoladas de solo para a produção de PHA, como foi demonstrado neste trabalho, os dois isolados foram capazes de produzir altos teores de polímero a partir de glicose. Resultados obtidos por Gomez e colaboradores (1996) apoiam esta afirmação, já que sete bactérias isoladas de solo de plantações de bagaço de cana, apresentaram altos teores de PHA a partir de glicose usando uma concentração de 15 g/L (GOMEZ et al., 1996).

Linhagan	Glicose	MSC	ոԱ	PHA (mol%)				PHA	
Linnagem	g/L	g/L	h11 -	3HB	3HH _x	ЗНО	3HD	3HD _d	(%MSC)
SCU 63	10	4,95	6,56	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	60,17
		4,83	6,54	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	76,49
		6,30	6,54	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	57,16
Média		5,36	6,55	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	64,60
Desvio-p	adrão	±0,82	±0,01	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	± 8,49
SCU 63		5,89	6,50	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	68,81
	15	5,77	6,49	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	67,00
		5,59	6,51	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	67,74
Média		5,75	6,50	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	67,85
Desvio-p	adrão	±0,15	±0,01	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,91
SCU 66	10	4,50	6,50	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	53,24
		4,48	6,50	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	61,72
		4,98	6,46	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	57,19
Méd	lia	4,65	6,49	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	57,38
Desvio-p	adrão	±0,28	±0,02	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	± 4,24
SCU 66	15	6,17	6,47	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	61,05
		4,34	6,49	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	65,44
		5,28	6,45	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	56,29
Méd	lia	5,26	6,47	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	60,93
Desvio-p	adrão	±0,92	±0,02	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	± 4,57

 Tabela 12 Produção de PHA pelos isolados SCU 63 e SCU 66 usando glicose como fonte de carbono

MSC- Massa seca celular; 3HB- 3- hidroxibutirato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; 3HO- 3-hidroxioctanoato; 3HD- 3-hidroxidecanoato; 9HA- Polihidroxiallcanoato

5.2 Análise da sequência de genes do rDNA 16S

A análise de sequências de rDNA 16S tem sido utilizada com o fim de explicar as afinidades taxonômicas de vários tipos de *taxa* sendo uma ferramenta útil e eficaz na avaliação da diversidade genética, já que apresenta regiões conservadas, o que facilita o alinhamento das sequências no momento de fazer comparações, assim como também contribui a diferenciar dos outros grupos filogenéticos (BAKER et al., 2003; PROSSER, 2002).

Com o objetivo de avaliar a similaridade do grupo taxonômico dos isolados SCU 63 e SCU 66, fora analisadas as sequências dos genes do rDNA 16S. Para isto, o gene que codifica o RNA ribossomal 16S foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos 27F e 1401R. Depois de terminar a PCR, os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1% com TAE1x e corados com SYBER safe.

O tamanho médio esperado desse amplicon é de aproximadamente 1400 bp. Os amplicons relativos ao genes do rDNA 16S dos isolados SCU 63 e SCU 66 apresentaram o tamanho esperado (APÊNDICE A).

Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados pelo mesmo par de oligonucleotídeos, posteriormente foi feita uma sequência consenso pelo software Pregap 4, a partir da análise dos picos visualizados no cromatograma. As sequências consenso obtidas para cada isolado foram as seguintes:

SCU 63

TGCAGTCGACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTG GGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACGATCTATGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGG GTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAG CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCA GGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA ${\tt ATTACTGGGCGTAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACCGATGTGAACTGCGGGAACTGCATTGGTGAACTGCGGGAACTGCATGGTGAACTGCGGGAACTGCATGGTGAACTGCGGGAACTGCAACTGGGAACTGCATGGTGAACTGCGGGAACTGCAACTGGAACTGCAACTGGAACTGCAACTGGAACTGCAACTGGAACTGCAACTGGAACTGCAACTGCAACTGGAACTGCAACTGCAACTGCAACTGCAACTGAACTGCAACTGAACTGCAACTGCAACTGCAACTGCAACTGCAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGCAACTGAACTGAACTGCAACTGACAACTGAACTGACA$ TGGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCG AGCAGCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCCTA AACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTGGCAAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGATTACGGTCG CAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCT TACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCCGCTGAGAGGTGGGGGGGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGT CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTA AGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCA AACTCGAGTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGATCAGC

SCU 66

TGCAGTCGACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTG GGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACGATCTATGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGG GTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAG ${\tt CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCA}$ GGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA ATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGA CTGGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGC GAAGGCAGCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCC ${\tt CTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGG$ TCCCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAA ${\tt CCTTACCTTGACATGGTCGGAATCCCGCTGAGAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGC$ TGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACT CTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACG TGCAACTCGAGTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGATCAG

As sequências consenso, foram analisadas pela ferramenta BLASTN na base de dados do NCBI. Nesta análise, ambos isolados tiveram uma semelhança com várias cepas pertencentes ao gênero *Burkholderia* sp. Para o isolado SCU 63 encontrou-se uma identidade do 98% com a sequência do gene 16S rDNA de *Burkholderia seminalis*, *B cepacia* e *B. diffusa*. Com relação à sequência do isolado SCU 66 teve 99% de identidade com esta *B. seminalis* e 98% de identidade com *Burkholderia diffusa* e *Burkholderia cepacia*. As sequências do rDNA 16S destes isolados apresentaram mais que 98% de identidade com as sequências desses genes em outras bactérias do gênero *Burkholderia* (APÊNDICE B).

A árvore filogenética foi montada a partir dos alinhamentos das sequências dos isolados (Figura 7), com as sequências provenientes do banco de dados, que apresentam maior similaridade de sequências do rDNA 16S. Os isolados SCU 63 e SCU 66 apresentaram proximidade filogenética com pelo menos outros quatro isolados de área de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro (BRUCE et al., 2010). Estes isolados foram identificados apenas no nível de gênero e, assim como os isolados SCU 63 e SCU 66 podem corresponder a novas espécies de *Burkholderia* sp.



Figura 7 Árvore filogenética do Gene rDNA 16S dos isolados SCU 63 e SCU 66 pelo método de Neighbor-joining com a utilização do programa MEGA 5.2.2.

Burkholderia sp. é um gênero bacteriano que pertence ao filo β - proteobacterias, composto por bacilos retos, Gram negativos, aeróbios, oxidase e catalase positivos. São bactérias móveis, com um flagelo polar, são mesófilas e não esporuladas, abundantes no solo

e em ambientes aquáticos, algumas espécies caracterizam-se por serem fitopatógeno. Existe um complexo chamado *Burkholderia cepacia*, composto por nove espécies bacterianas que compartilham as mesmas características fenotípicas mas têm suas características genotípicas diferentes, este complexo, caracteriza-se por serem patógenos oportunistas, especialmente em pessoas que sofrem de fibrose cística (COENYE; VANDAMME, 2003; MILLER; LIPUMA; PARKE, 2002).

Conforme apresentado na literatura, *Burkholderia* sp. possui a propriedade de produzir polihidroxialcanoatos. O primeiro trabalho descrevendo a produção de PHA neste gênero avaliou a produção de P3HB e P3HB-co-3HV a partir de frutose e ácido propiônico como fontes de carbono (RAMSAY et al., 1989). *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 é capaz de utilizar uma grande variedade de fontes de carbono para produzir polihidroxialcanoatos de cadeia curta (PHA_{SCL}) como poli-3-hidroxibutirato P(3HB) e poli-3-hidroxivalerato P(3HV), como também o copolímero (P3HB-*co*-PHV) (PAN et al., 2012). Também tem sido reportado que *Burkholderia cepacia* IPT 048, linhagem isolada de solo de canavial, foi capaz de produzir P3HB a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar acumulando polímero correspondente a 53% da massa seca celular (MICHELIN-RAMOS, 2003). A partir de óleo de soja, *Burkholderia cepacia* IPT 48 foi capaz de produzir o copolímero P(3HB-*co*-3HHx) com uma fração molar de 3HB de 52,0 mol% e de 3HHx de 48 mol% (VANZIN, 2008).

Burkholderia sacchari foi selecionada por ser eficiente na produção de grandes quantidades de P3HB a partir de sacarose (GOMEZ et al., 1996, 1997). Com o suprimento de carboidratos e propiônico essa bactéria acumula o copolímero P(3HB-*co*-3HV) (GOMEZ et al., 1996, 1997). Mutantes deficientes na oxidação do propionato foram obtidos e apresentaram maior eficiência na conversão do propionato em monômeros 3HV (SILVA et al., 2000). A via do 2-metilcitrato foi identificada como a principal rota de oxidação do acido propiônico em *B. sacchari* (BRÄMER et al., 2002), entretanto, outras vias devem contribuir nesse processo (PEREIRA et al., 2009). Mendonça e colaboradores (2014) avaliaram a capacidade de *B. sacchari* incorporar outros monômeros além do 3HB, usando trinta diferentes fontes de carbonos como co-substratos, além da glicose. A incorporação de monômeros 3HV atingiu até 65 mol% quando foi fornecido acido valérico como co-substrato. Com ácido hexanóico foi produzido o copolímero P(3HB-*co*-3HHx) , contendo 0,6 mol% de 3HHx. Com 4-hidroxibutirato como co-substrato, a incorporação de 4HB foi observada, representando 9,1 mol% (MENDONÇA et al., 2014).

Burkholderia xenovorans LB 400 é uma bactéria capaz de degradar policloretos de bifenila (PBC) e diversos outros compostos aromáticos. Urtuvia e colaboradores (2014) analisaram o genoma sequenciado de *Burkholderia xenovorans* e encontraram genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese e degradação de PHA. Diferentes compostos incluindo açúcares e ácidos graxos foram fornecidos como substratos para a produção de PHA. *B. xenovorans* LB 400 foi capaz de crescer em glicose, manitol e xilose como únicas fontes de carbono, produzindo P3HB (URTUVIA et al., 2014).

Burkholderia sp. F24 foi capaz de crescer e simultaneamente produzir P3HB, em xilose e compostos tóxicos (furfural, hidroximetilfurfural, acido fórmico e acético), que são formados durante processo de hidrolise ácida de bagaço de cana de açúcar. O copolímero P3HB-*co*-3HV foi produzido usando xilose e ácido levulínico. O conteúdo de 3HV no copolímero aumentou de 9 para 43 mol%, quando a concentração de acido levulínico aumentou de 1 para 5 g/L (LOPES et al., 2014).

5.3 Análise de genes da PHA sintase

5.3.1 Detecção e identificação do gene phaC nos isolados SCU 63 e SCU 66

A produção de PHAs em bactérias têm como enzima chave a PHA sintase, que é classificada em quatro classes (REHM, 2003). Com o objetivo de identificar a classe da PHA sintase presente nos isolados SCU 63 e SCU 66, foi feita uma PCR do gene *phaC*, que codifica a PHA sintase, utilizando os oligonucleotídeos RECF1/RECR desenhados por Lício (2011), estes oligonucleotídeos foram desenhados com base a um alinhamento múltiplo com dezenove linhagens bacterianas, que contém em seu genoma a organização do operon *phaCAB*, especifica para PHA sintase de classe I. Na Figura 8 estão apresentados os resultados da amplificação dos fragmentos internos ao gene *phaC*, dos isolados e também da linhagem *Burkholderia sacchari* LFM 101 como controle positivo.

Foram observadas amplificações tanto nos isolados quanto no controle positivo *B. sacchari* LFM 101, no tamanho esperado (778 pb), o que indica que ambos isolados possuem genes *phaC* de classe I.



Figura 8 Perfil eletroforético em gel de agarose 1% (m/v), resultante da amplificação por PCR, usando os oligonuleotídeos RECF1/RECR. Linha 1: Padraõ 1 Kb DNA Ladder Plus (Fermentas), Linha 2: Controle negativo (Agua), Linha 3: SCU 63, Linha 4: SCU 66, Linha5: B. Sacchari LFM 101 como controle positivo.

Na literatura, diversos autores recomendam o uso de provas moleculares tais como a amplificação por PCR do gene *phaC*. Este método permite selecionar especificamente os micro-organismos produtores de PHAs, minimizando possíveis falsos positivos de métodos qualitativos. López e colaboradores (1997) foram os primeiros a publicar técnica para a detecção da presença de genes *phaC* por PCR de todas as classes de PHA sintase em bactérias isoladas de água de rio. Posteriormente, Sheu e colaboradores (2000) desenharam oligonucleotídeos específicos para detecção por PCR de genes *phaC* da classe I e II de bactérias isoladas de diferentes ambientes, alinhando sequências altamente conservadas de genes da classe I e II de 13 bactérias Gram-negativas. Ambos autores apoiam a ideia que os genes *phaC* não possuem um alto grau similaridade, o que dificulta sua detecção entre diferentes espécies bacterianas (LOPEZ; PETTINARI; MÉNDEZ, 1997; SHEU; WANG; LEE, 2000).

Especificamente, para os genes *phaC* pertencentes à classe I, não existem oligonucleotídeos específicos para sua detecção. Assim como Sheu e colaboradores (2000), Romo e colaboradores (2007), também desenharam oligonucleotídeos degenerados para genes *phaC* da classe I e II do gene, sendo não específicos para esta classe porque também identificam genes *phaC* da classe II, o que gera inconvenientes no momento de detectar genes *phaC* unicamente da classe I (ROMO et al., 2007; SHEU, WANG; LEE, 2000). Os resultados obtidos por Lício (2011), utilizando os oligonucleotídeos RECF1/RECR, demostraram que estes não funcionam para a detecção de todos os gene de PHA sintases classe I (o gene *phaC* da classe

II . Isto é devido a baixa similaridade entre as sequências de nucleotídeos de genes *phaC* da classe I (LÍCIO, 2011; REHM, 2003).

Tzu e colaboradores (2012) isolaram bactérias de lodos ativados de uma estação de tratamento de águas residuais e desenharam oligonucleotídeos para a detecção de genes *phaC* de classes I e II, (phaCF1BO/phaCR2BO). Além de desenhar oligonucleotídeos mais eficientes na detecção dos genes *phaC*, foram detectados genes *phaC* de bactérias Gramnegativas e Gram-positivas. Os genes *phaC* foram detectados em α -proteobactérias, β -proteobactérias, indicando grande diversidade de produtores de PHA em águas residuais (TZU et al., 2012).

A detecção e diferenciação de genes *phaC* em bactérias selvagens por PCR, combinada com a caracterização preliminar do rDNA 16S, provê um instrumento para a seleção precisa e direcionada de bactérias de diferentes gêneros que tem o potencial de acumular PHAs (ROMO et al., 2007). Neste trabalho, a partir dos resultados obtidos da análises do rDNA 16S, foram desenhados oligonucleotídeos para a detecção específica do gene *phaC* em ambos isolados e confirmar a possível presença de uma PHA sintase classe I, segundo os resultados obtido anteriormente.

Os isolados SCU 63 e SCU 66 apresentaram maior similaridade taxonômica com o gênero *Burkholde*ria sp. Assim, foram desenhados os oligonucleotídeos phaCF e phaCR com o objetivo de confirmar os resultados anteriores tentando amplificar o gene completo. Para isso, primeiro foi feito um alinhamento múltiplo no Clustal W com genes *phaC* organizados na forma de operon *phaCAB* de várias espécies do gênero *Burkholderia* sp., encontradas na base de dados do NCBI (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov</u>). Posteriormente ao alinhamento, avaliaram-se as regiões conservadas e desenharam-se os oligonucleotídeos phaCF e phaCR, usando o software serial cloner 2.6 (<u>http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html</u>). Nos resultados de PCR *in silico*, o tamanho do amplicon gerado seria de 1875 pb. Estes oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar somente a região codificante do gene *phaC* (APÊNDICE C).

Na PCR foram testadas diferentes temperaturas de anelamento (47,1 - 53 °C). O melhor resultado obtido está apresentado na Figura 9 e foi obtido usando uma temperatura de anelamento de 48,6 °C, pois permitiu a obtenção de uma banda mais definida e com menos bandas inespecíficas. Os amplicons obtidos para os dois isolados foram no tamanho esperado de 1875 bp.



Figura 9 Perfil eletroforético em gel de agarose 1% (m/v), resultante da amplificação por PCR usando os oligonucleotídeos phaCF e phaCR Linha 1: Padraõ 1 Kb DNA Ladder Plus (Fermentas), Linha 2: SCU 63, Linha 3: SCU 66

Os produtos de PCR foram purificados e enviados ao serviço de sequenciamento e, posteriormente, as sequências (APÊNDICE D) foram analisadas pela ferramenta BLASTN, obtendo-se os seguintes resultados de similaridade:

- SCU 63, phaCF: *Burkholderia cepacia* strain JC-1 polyhydroxyalkanoate synthase (*phaC*) gene 89% de similaridade.
- SCU 63, phaCR: Burkholderia cepacia GG4 89% de similaridade.
- SCU 66, phaCF: *Burkholderia cepacia* strain JC-1 polyhydroxyalkanoate synthase (*phaC*) 90% de similaridade.
- SCU 66, phaCR: *Burkholderia cepacia* strain JC-1 polyhydroxyalkanoate synthase (*phaC*) 90% de similaridade.

Com base nas sequências analisadas, foram desenhados oligonucleotídeos SCU 63 interno F/R e SCU 66 interno F/R, para completar a sequência do gene *phaC* dos dois isolados, os resultados do sequenciamento estão apresentados no APÊNDICE E.

A partir dos resultados anteriormente obtidos, foram determinadas as sequências consenso do gene *phaC* de cada um dos isolados (APÊNDICE F). Realizou-se uma busca por sequências similares utilizando a ferramenta tBLASTx, detectando-se 90% de identidade com a sequências de aminoácidos do gene *phaC* de *Burkholderia cepacia* para o *phaC* do isolado SCU 63 e 97% para o *phaC* do isolado SCU 66. Com o gene *phaC* de *Burkholderia cepacia* obteve-se 90% de identidade com a sequência de aminoácido do gene *phaC* do isolado SCU 63 e 89% de SCU 66 (APÊNDICE G).

A árvore filogenética foi montada a partir dos alinhamentos das sequências de aminoácidos de PhaC dos isolados SCU 63 e SCU 66, bem como de outras bactérias



apresentando PHA sintases de classe I (Burkholderia sp.), II (Pseudomonas sp.), III (Allochromatium vinosum e Thiocapsa pfennigii) ou IV (Bacillus megaterium) (Figura 10).

Figura 10 Árvore filogenética com base em sequência de aminoácidos da PHA sintase dos isolados SCU 63 e SCU 66 e outras bactérias pelo método de Neighbor-joining com a utilização do programa MEGA 5.2.2.

Para predição das sequências de aminoácidos, a sequência consenso de nucleotídeos dos genes *phaC* de cada um dos isolados foi submetida ao servidor Expasy Bioinformatics Resource Portal (http://web.expasy.org/translate/), as sequências de aminoácidos foram as seguintes:

SCU 63

MPDLGGMVPFAGLKLPGAAIPPERLQTLQADYARDCMTLMQQAAAAKLESPELKDRRFSGDAWKASPAHAFAAAWYLLNARYL QELADALQTDPKTRERIRFTVQQWTAAAAPSNFLALNPDAQKSILETQGESLRQGMMNLLGDLQRGKISQTDESRFVVGKNLG CTEGAVVYENDLIQLIQYTPKTDKVFERPLLIVPPCINKFYILDLQPENSLVAHALSNGHQVFLVSWRNADASVAHKTWDDYM NEGLLAAIDAVQQVSGREQINTLGFCVGGTMLATALAVLAARGEHPAASMTLLTAMLDFTDTGILDVFVDEAHVQMREQTIGG KNGTQPGLMRGVEFANTFSFLRPNDLVWNYVVDNYLKGRTPAPFDLLYWNSDSTSLPGPMYGVPAQYLSRNRLREPGALTVCG ESVDLSLIDVPTFVYGSREDHIVPWQTAYASTSILSGPRIVWRVGSHRGRDQSAGRRRHVGQRHDRRHPRTLVVRCHRAAGKL VPTRSSGWARRPQGAPPPARSAQHASPV

SCU 66

MTWRVLDPAAPRLTRDRESVRDIPVPDFCPSGTVDARSRRHGPVRGAETAGAAIPPERLQTLQADYARDCMTLMQQAAAAKLE SPELKDRRFSGDAWKASPAHAFAAAWYLLNARYLQELADALQTDPKTRERIRFTVQQWTAAAAPSNFLALNPDAQKSILETQG ESLRQGMMNLLGDLQRGKISQTDESRFVVGKNLGCTEGAVVYENDLIQLIQYTPKTDKVFERPLLIVPPCINKFYILDLQPEN SLVAHALSNGHQVFLVSWRNADASVAHKTWDDYMNEGLLAAIDAVQQVSGREQINTLGFCVGGTMLATALAVLAARGEHPAAS MTLLTAMLDFTDTGILDVFVDEAHVQMREQTIGGKNGTQPGLMRGVEFANTSRSCGRTTSCGTTSSTTT

O resultado obtido (Figura 10) indicam fortemente que os isolados SCU 63 e SCU 66 pertence ao gênero *Burkholderia* e apresentam PHA sintases da classe I. Atualmente, somente um mecanismo tem sido proposto para a biossíntese de P(3HB) em *Burkholderia* sp., ou seja, o mesmo realizado por *Ralstonia eutropha* (Burkholderiaceae) no qual duas moléculas de acetil-CoA são condensadas formando acetoacetil-CoA, que é reduzido a 3-hidroxibutiril-CoA, incorporado à cadeia polimérica em crescimento. Estas três reações são catalisadas, respectivamente, pelos produtos dos genes *phaA*, *phaB* e *phaC*, que estão agrupados no operon *phaCAB* (RODRIGUES et al., 2000).

Entretanto existem evidências que uma linhagem de *Burkholderia cepacia* possui mais de um gene *phaC. Burkholderia cepacia* IPT 64 é capaz de produzir P3HB e poli-3-hidroxi-4-pentenotato P(3H4PE), usando sacarose ou gliconato como únicas fontes de carbono. Rodrigues e colaboradores (2000) geraram mutantes desta linhagem, inativando seu gene *phaC*, presente no operon *phaCAB*. Entretanto, ainda detectaram uma baixa atividade PHA sintase. A linhagem mutante acumulou correspondendo a 1% da massa seca celular e contendo 68,2 mol% de 3HB e 31,8 mol% de 3H4PE. Por outro lado, enquanto a linhagem selvagem acumulou PHA correspondendo a 49,3% da massa seca celular e continha 96,5 mol% de 3HB e 3,5 mol% de 3H4PE. Estes resultados , indicam a existência de outro gene *phaC* responsável pela formação do P(3H4PE).

Recentemente, foi isolada a partir de amostras de solo contaminado com petróleo *Burkholderia caryophylli* AS 1.2741, , que foi capaz de produzir simultaneamente PHA_{SCL} e PHA_{MCL}(HANG et al., 2002). Quando glicose foi fornecida como única fonte de carbono, foi produzido PHA correspondendo a 1,3% da massa seca celular, contendo 4,3 mol% de 3-hidroxihexanoato (3HHx), 12,8 mol% de 3-hidroxioctanoato (3HO) e 82,9 mol % de 3-hidroxidecanoato (3HD). Esta mesma linhagem, quando suprida com ácido octanóico como única fonte de carbono, acumulou 24,1% de PHA, contendo 5,6 mol% de 3HHx , 89,9 mol% de 3HO e 4,5 mol% de 3HD,. Hang e colaboradores (2002) usaram estratégias de PCR para

clonar os loci PHA de *B. caryophylli* AS 1.2741 e demonstraram claramente a existência de dois genes *phaC*. Assim, além de possuir o o gene *phaC* de classe |I, que tem maior especificidade por monômeros 3HB, também carrega em seu genoma, genes *phaC* de classe II, que tem especificidade por monômeros 3HHx, 3HO e 3HD (HANG et al., 2002).

No caso dos isolados SCU 63 e SCU 66 não é possível propor a existência de outro gene *phaC*, já que os resultados obtidos neste trabalho, bem como por Lício (2011), demonstram o acúmulo apenas de P3HB, tanto a partir de glicose como de ácido octanóico.

5.3.2 Clonagem dos genes phaC dos isolados SCU 63 e SCU 66

Após a detecção do gene *phaC* dos isolados SCU 63 e SCU 66, o passo seguinte consistiu na clonagem destes no plasmídeo pBBR1MCS-2 (KOVACH et al., 1995). Para a clonagem, foram desenhados os oligonucleotídeos *Eco*RVcreator2 F e *Sac*Icreator R. Estes oligonucleotídeos além de carregar sequências para os sítios de restrição das enzima *Eco*RV e *Sac*I, amplificam uma região a montante da região codificadora e que compreende uma possível região promotora.

Os oligonucleotídeos foram desenhados com base na sequência deste locus gênico em *Burkholderia cepacia* GG4, uma vez que correspondia a uma das linhagens que apresentava maior similaridade e seu genoma inteiro já havia sido sequenciado. A PCR *in silico* indicava um amplicon de 2257 pb. O resultado da amplificação dos genes *phaC* dos isolados SCU 63 e SCU 66 estão apresentados na Figura 11.



Figura 11 Perfil eletroforético em gel de agarose 1% (m/v), resultante da amplificação por PCR usando os oligonucleotídeos *Eco*RV 2creator F e *SacI* creator R. Linha 1: SCU 63, Linha 2: SCU 66, Linha 3: Padraõ 1 Kb *DNA Ladder* Plus (Fermentas).

Para este trabalho, também foi clonado o gene *phaC* de *Burkholderia sacchari* LFM 101, com fins de ter um controle de referência para os experimentos de produção de PHA em

linhagens recombinantes. Os oligonucleotídeos PhaCBs F e PhaCBs R, foram desenhados com base na sequência do gene previamente sequenciada. Estes oligonucleotídeos além de carregar sequências para os sítios de restrição das enzima *Bam*HI e *Sac*I, amplificam a região promotora e PCR *in silico* indicava um tamanho de amplicon de 2380 bp. Na Figura 12 é apresentado a amplificação do gene *phaC* de *B. sacchari* apresentado o tamanho esperado.



Figura 12 Perfil eletroforético em gel de agarose 1% (m/v), resultante da amplificação por PCR usando os oligonucleotídeos PhaCBs F e PhaCBs R. Linha 1: Padraõ 1 Kb *DNA Ladder* Plus (Fermentas), Linha 2: *B. sacchari* LFM 101.

Os amplicons e o plasmídeo pBBR1MCS-2 foram digeridos com as enzimas de restrição *Eco*RV e *Sac*I, *Bam*HI e *Sac*I. Em seguida, realizou-se a ligação com a enzima T4 DNA ligase dos fragmentos de DNA contendo os genes de interesse ao plasmídeo (Figura 13). A orientação de clonagem esta de tal forma que a transcrição do gene pode ser dirigida tanto pelo promotor *lac* como por seu próprio promotor.





Figura 13 Representação dos plasmídeos pBBRMCS-2 contendo os genes clonados. Este vetor apresenta resistência à canamicina (kan), com genes de mobilização (mob) e replicação (rep) e o promotor lac. A-) pBBRMCS-2::phaC de Burkholderia sacchari, indicando os sítios de restrição BamHI e SacI. B-) pBBRMCS-2::phaC dos isolados SCU 63 e SCU 66, indicando os sítios de restrição EcoRV e SacI.

Os produtos de ligação foram transferidos à linhagem *E. coli* DH5 α por transformação com choque elétrico, sendo posteriormente semeadas em meio mineral. A seguir, foram selecionadas pelo método da alfa-complementação, doze colônias que possivelmente continham o gene *phaC* do isolado SCU 66 e duas colônias que continham possivelmente o gene *phaC* do isolado SCU 63.

Para confirmar o resultado foi feito uma PCR usando os oligonucleotídeos EcoRVcreator2 F e SacIcreator R. Na Figura 14, das doze colônias selecionadas relacionadas à clonagem do gene *phaC* da linhagem SCU 66, sete apresentaram amplicons do tamanho esperado (2257 pb). Com relação ao isolado SCU 63, foram avaliadas duas colônias brancas e duas colônias azuis para conferir a existência de clones positivos com o gene *phaC* do isolado SCU 63. Como se observa na Figura 15, os dois clones brancos apresentaram o amplicon esperado, ou seja, devem conter o gene *phaC*.

Com o intuito de confirmar se a inserção do gene *phaC* dos isolados foi feita com sucesso no plasmídeo pBBRMCS-2, foi realizado o sequenciamento a partir de produtos de PCR do clone pBBRMCS-2::*phaC*_{SCU66C3} e pBBRMCS-2::*phaC*_{SCU63C1}, usando todos os oligonucleotídeos anteriormente desenhados neste trabalho para a identificação do gene *phaC* de cada um dos isolados.

Buscando-se por sequências similares com a ferramenta BLASTN, para o clone pBBRMCS-2::*phaC*_{SCU63C1}, observou-se uma similaridade entre 91 e 96% com o gene *phaC* da linhagem *Burkholderia cepacia* GG4 e, para o clone pBBRMCS-2::*phaC*_{SCU66C3},

observou-se uma similaridade de 94% na maioria das sequências analisadas para este clone, confirmando assim, que o gene foi inserido como esperado no plasmídeo.



Figura 14 Perfil eletroforético em gel de agarose 1% (m/v), resultante da amplificação por PCR utilizando clones positivos para clonagem do gene *phaC* do isolado SCU 66. Linha 1: Padraõ 1 Kb *DNA Ladder* Plus (Fermentas), Linha 2: colônia 1, Linha 3: colônia 2, Linha 4: colônia 3, Linha 5: colônia 4, Linha 6: colônia 5, Linha 7: colônia 6, Linha 8: colônia 7, Linha 9: colônia 8, Linha 10: colônia 9, Linha 11: colônia 10, Linha 12: colônia 11, Linha 13: colônia 12, Linha 14: controle positivo DNA genômico do isolado SCU 66, Linha 15: controle negativo (agua).



Figura 15 Perfil eletroforético em gel de agarose 1% (m/v), resultante da amplificação por PCR utilizando clones positivos (brancos) e negativos (azuis) para a clonagem do gene *phaC* de SCU 63. Linha 1: Padraõ 1 Kb *DNA Ladder* Plus (Fermentas), Linha 2: DNA genômico do SCU 63, Linha 3: colônia azul 1, Linha 4: colônia azul 2, Linha 5: colônia branca 1, Linha 6: colônia branca 2.

Para a análise de regiões promotoras, usou-se o programa BPROM como foi descrito anteriormente, sendo que nas duas sequências analisadas, encontrou-se uma região promotora.

pBBRMCS-2::phaC_{SCU63C1}

> EcoRVCreator2 F -35 box -10 box

> test sequence	
Length of sequence- 442	
Threshold for promoters - 0.20	
Number of predicted promoters -	1
Promoter Pos: 145 LDF- 3.09	
-10 box at pos. 130 TGATAAAAA Score	e 37
-35 box at pos. 109 TTCACA Score	e 46
Oligonucleotides from known TF binding	g sites:
fur: ATAATGAT at position	126 Score - 6
argR: ATAAAAAT at position	132 Score - 10

pBBRMCS-2::phaC_{SCU66C3}

> EcoRVCreator2 F

> test sequence					
Length of sequence- 476					
Threshold for promoters - 0.20					
Number of predicted promoters -	1				
Promoter Pos: 170 LDF- 3.09					
-10 box at pos. 155 TGATAAAAA Sco	ore 37				
-35 box at pos. 134 TTCACA Sco	ore 46				
Oligonucleotides from known TF binding sites:					
For promoter at 170:					
fur: ATAATGAT at position	151 Score - 6				
argR: ATAAAAAT at position	157 Score - 10				

5.3.3 Produção de polihidroxialcanoatos por linhagens recombinantes

Para a construção das linhagens recombinantes, foi necessário transferir os plasmídeos pBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU66}$ e pBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU63}$ para a linhagem *E.coli* S17-1, que possui a propriedade de transferir material genético horizontalmente por conjugação. Esta última linhagem foi submetida à conjugação com *Pseudomonas* sp. LFM 461 e *B. sacchari*

LFM 344, linhagens que se caracterizam por ser deficientes no acúmulo de PHA (PHA⁻). Para a seleção dos transconjugantes, cada um dos clones foi semeado em meio mineral com glicose e canamicina MMGK, pois *E. coli* S17-1 não consegue crescer em meio mineral e *B. sacchari* LFM344 e *Pseudomonas* sp. LFM461 são sensíveis a canamicina .

Posteriormente a obtenção das linhagens recombinantes de *B. sacchari* LFM344 e *Pseudomonas* sp. LFM461, realizou-se a prova qualitativa de Sudan Black B para detecção da produção de PHA, que consiste em um corante azul que determina a produção desse polímero (SCHLEGEL; LAFFERTY; KRAUSS, 1970). Um dos clones obtidos foi semeado em meio MMGK, incubado por 96 horas a 30 °C e corado. Como controles negativos foram usadas as linhagens LFM 461 e LFM 344 com o pBBR1MCS-2 sem inserto e como controles positivos as linhagens *B. sacchari* LFM 101 e *Pseudomonas* sp LFM 046 abrigando o mesmo plasmídeo sem inserto (Figura 16).

Foi demonstrado que para as linhagens recombinantes de *Burkholderia sacchari* LFM 344, contendo o PBBR1MCS-2::*phaC*_{SCU66}, houve um acúmulo de PHA, porque atingiram uma cor azul igual à do controle positivo (LFM 101). Como também para as linhagens recombinantes de *Pseudomonas* sp. LFM 461, contendo o plasmídeo PBBR1MCS-2::*phaC*_{SCU66}, demostrando ter um acúmulo de PHA.



B




Figura 16 Análise qualitativa de acúmulo de PHA nas linhagens recombinantes, usando o corante lipofílico Sudan Black. A: LFM 461 com pBBRMCS-2::*phaC*_{SCU66} controle positivo (+) LFM 046, controle negativo (-) LFM 461 com pBBRMCS-2 sem inserto. B: LFM 344 com pBBRMCS-2::*phaC*_{SCU66}, controle positivo (+) LFM 101, controle negativo (-) LFM 344 com pBBRMCS-2 sem inserto. C: LFM 344 com pBBRMCS-2::*phaC*_{SCU63}, controle negativo (-) LFM 461 com pBBRMCS-2::*phaC*_{SCU63}, controle negativo (-) LFM 461 com pBBRMCS-2 sem inserto. D: LFM 461 com pBBRMCS-2::*phaC*_{SCU63}, controle negativo (-) LFM 461 com pBBRMCS-2 sem inserto.

No caso das linhagens recombinantes contendo o plasmídeo PBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU63}$, foram obtidos resultados parecidos. As linhagens *B. sacchari* LFM 344 com o plasmídeo PBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU63}$, apresentaram uma cor azul intensa comparada com o controle negativo (*B. sacchari* LFM 344 com o plasmídeo pBBBRMCS-2 sem inserto), indicando que são capazes de acumular PHA. A coloração nas linhagens recombinantes de *Pseudomonas* sp. LFM 461 é apresentada em uma baixa intensidade, mas foi maior do que a obtida pelo controle negativo (*Pseudomonas* sp. LFM 461 com o plasmídeo pBBR1MCS-2 sem inserto).

Os corantes lipofílicos como o Sudan Black B, Nile blue A e Nile red A, são normalmente utilizados para corar colônias e distinguir entre linhagens que acumulam e não acumulam PHA. São métodos muitos sensíveis e a aplicação destes protocolos para a seleção de um grande número de clones é muito eficiente (SPIEKERMANN et al., 1999).

A prova qualitativa do Sudan Black B precisa de outros métodos para confirmar a capacidade de produção de PHA em bactérias porque o corante sendo lipofílico pode as vezes detectar grânulos de lipídeos que diferem na natureza e composição de PHAs (CHAUDHRY

D

et al., 2011). Por isso, decidiu-se realizar provas quantitativas de produção de PHA para todas as linhagens recombinantes, mesmo que não tivessem produzido coloração.

Com objetivo de confirmar os resultados anteriores, procederam-se com os cultivos de acúmulo em frascos agitados, usando glicose como fonte de carbono (10 g/L). Os cultivos de acúmulo com a linhagem recombinante *Pseudomonas* sp. LFM 461 são apresentados na Tabela 13. Novamente, os controles positivo e negativo para este ensaio foram, respectivamente, a linhagem selvagem *Pseudomonas* sp. LFM 046 e seu mutante *Pseudomonas* sp. LFM 461, ambas contendo o plasmídeo pBBRMCS-2 sem inserto.

Após de 72 horas de cultivo, como esperado, não foi detectado qualquer PHA no cultivo do mutante *Pseudomonas* sp. LFM461 e para linhagem selvagem (*Pseudomonas* sp. LFM 046) observou-se em média o acúmulo de PHA correspondendo a 40% da massa seca celular. O principal monômero detectado foi o 3-hidroxidecanoato (3HD), como é observado comumente em PHA produzidos por *Pseudomonas* a partir de carboidratos (GOMEZ, 2000). As linhagens recombinantes *Pseudomonas* sp. LFM461 pBBRMCS-2::*phaC*_{SCU66} acumularam PHA correspondendo a 3,93 e 2,48% da massa seca celular, respectivamente. A composição do PHA produzido foi similar para as duas linhagens, sendo detectados os constituintes 3HB, 3HO e 3HD, embora, a fração de 3HB foi maior para a linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 pBBRMCS-2::*phaC*_{SCU63}. De qualquer forma, as duas linhagens recombinantes apresentaram teores de PHA acumulados bastante baixos.

Gomes (2009) avaliou a capacidade de produção de PHA com a linhagem *Pseudomonas* sp. LFM 461 abrigando o gene *phaC* de *Ralstonia eutropha*, obtendo valores de acúmulo de PHA correspondendo a 30,16% da massa seca celular e uma fração molar de 3HB de 95,10 mol%, usando glicose como fonte de carbono. Os monômeros detectados em frações menores foram 3HHx e 3HO, sugeriram a produção do copolímero P(3HB-co-3HHx-co-3HO) (GOMES, 2009).

Outro trabalho que demonstra o potencial do gene *phaC* de classe I em incorporar monômeros HA_{MCL} à cadeia principal do polímero a partir dos produtos metabólicos de espécies de *Pseudomonas* sp., foi realizado por Shin e colaboradores (2002), que inseriram o operon *phaCAB* de *Ralstonia eutropha* H16, na linhagem *Pseudomonas putida* KT2440. Após a inserção do operon, a linhagem recombinante foi cultivada com diferentes fontes de carbono, como glicose, gliconato e vários ácidos graxos, para identificar a fonte de carbono mais adequada para a produção de misturas de PHA. O maior acúmulo de PHA foi de 41% da massa seca celular (MSC), dos quais 77,9 mol% é de 3HB, 2,4 mol% 3HHx, 4,5 mol% 3HO, 11,8 mol% 3HD e 3,4 mol% 3HDD (SHIN et al., 2002).

63 e SCU 66. MSC PHA (mol%) PHA Linhagem pН (g/L)**3HB** 3HHx ЗНО **3HD** 3HDd (%MSC) 2,43 6.55 0,00 0,00 0,00 0.00 0,00 0,00 LFM 461 6,50 2,52 0,00 0.00 0.00 0,00 0.00 0.00 pBBRMCS-2 2,41 6,53 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 2,45 6,53 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 Média ±0,06 ±0,03 ±0,00 ±0,00 ±0,00 ±0,00 ±0,00 ±0,00 Desvio-padrão 4,46 6,48 0,00 3,58 31,73 60,03 4,66 42,62 LFM 046 pBBRMCS-2 4,30 6,47 0,00 3,29 33,43 58,93 4,34 39,31 0,00 4,01 6,47 3,21 32,72 60,73 3,34 38,16 Média 4.26 6.47 0,00 3,36 32,63 59.90 4.11 40.03 ±0,22 ±0,01 ±0,00 ±0,19 ±0,85 ±0,91 ±0,69 $\pm 2,32$ Desvio-padrão 2,65 6,16 87,34 0,00 0,00 6,38 6,28 5,45 LFM 461 pBBRMCS-0,00 2,46 6,44 86,46 0.00 7,28 6,26 2,23 $2::phaC_{SCU63}$ 2.486.48 85,76 0.00 0.00 7,52 6,71 4,12 Média 2,53 86,52 0,00 7,06 6,36 0,00 6,42 3,93 Desvio-padrão 0,79 0,00 0,10 0,17 0,00 0,60 0,25 1,62 1,95 6,42 53,70 0,00 0,00 23,24 23,06 2,47 LFM 461 pBBRMCS-1,73 4,93 60,51 0,00 0,00 19,67 19,82 2,47 $2::phaC_{SCU66}$ 2,40 6,47 55,95 0,00 0,00 22,76 21,29 2,51 2,03 Média 5,94 56,72 0,00 0,00 21,89 21.39 2.48 0,00 0,00 1,94 Desvio-padrão 0,34 0,88 3,47 1,62 0,02

 Tabela 13
 Produção de PHA usando glicose (10g/L) como fonte de carbono por linhagens recombinantes de *Pseudomonas* sp. LFM461 abrigando os genes *phaC* dos isolados SCU 63 e SCU 66.

MSC- Massa seca celular; 3HB- 3- hidroxibutirato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; 3HO- 3-hidroxioctanoato; 3HD- 3-hidroxidecanoato; 3HDDd-3-hidroxidodecanoato; PHA- Polihidroxialcanoato.

Lício (2011) realizou ensaios de acúmulo com a linhagem *Pseudomonas* sp. LFM 461 a qual continha o gene *phaC* do isolado RMP 1058B II, obtendo como resultado a produção de PHA correspondendo a 1% da massa seca celular (MSC), sugerindo que, além do gene *phaC*, também deve ser clonado o gene *phaR*, já que outros estudos demostraram que a ausência do gene *phaR* pode causar níveis baixos de acúmulo de PHA em linhagens recombinantes de *Pseudomonas* (CHAUDHRY et al., 2011; LÍCIO, 2011; MATSUSAKI et al., 1998).

No trabalho realizado por Matsusaki e colaboradores (1998), foi isolada a partir de amostras de solo a linhagem *Pseudomonas* sp. 61-3, a qual produz uma mistura de um homopolímero (3HB) e um copolímero aleatório P(3HB-*co*-3HA), formando dois diferentes tipos de grânulos de poliésteres na mesma célula. Os autores sugeriram que a linhagem *Pseudomonas* 61-3 possuía dois tipos de PHA sintases com diferentes especificidades pelo substrato. Para confirmar tal hipótese, clonaram e sequenciaram os genes que participam na

biossíntese de P(3HB) e P(3HB-co-3HA), avaliando seu potencial por expressão heteróloga com linhagens mutantes de P. putida e R. eutropha. A existência de dois tipos de PHA sintase foi confirmado e o gene phaC apresentava homologia com o gene phaC de Ralstonia eutropha, mas a organização na qual se encontrou o gene não era igual à de Ralstonia eutropha, a organização do operón no qual estava o gene phaC de classe I da linhagem 61-3 era phaBAC, a montante do gene phaB foi encontrado uma ORF com uma orientação oposta aos outros três genes. Aquela ORF foi denominada phaR, cuja sequência de aminoácidos era similar com proteínas reguladoras de transcrição que pertencem à família AraC, tais como OruR de P. aeruginosa. Quando foram feitos experimentos de expressão heteróloga com as linhagens mutantes de P. putida e Ralstonia eutropha, o operón phaBAC sem o phaR, foi capaz de restabelecer a capacidade de acúmulo de PHA em mutante de Ralstonia eutropha, mas não em mutante de P. putida. Contudo, quando o phaR foi inserido junto com o operon phaBAC, a linhagem recombinante apresentou um acúmulo de PHA correspondendo a 20 % da massa seca celular, dos quais 100 mol% eram de 3HB. Também, se observou, acúmulo só quando apenas os genes *phaC* e *phaR* foram inseridos, entretanto, o teor de PHA acumulado correspondeu a 1% da massa seca celular, concluindo que a ativação do gene phaC depende do produto de *phaR* em linhagens pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. (MATSUSAKI et al., 1998).

Os ensaios de acúmulo com as linhagens derivadas de *Burkholderia sacchari* estão apresentados na Tabela 14. Os controles positivos para este experimento foram a linhagem selvagem *Burkholderia sacchari* LFM 101 e *B. sacchari* LFM344 pBBRMCS-2::*phaC*_{Bs}.

Contrário aos resultados obtidos com as linhagens recombinantes obtidas a partir de *Pseudomonas* sp. LFM 461 (Tabela 13), os ensaios de acúmulo de PHA utilizando a linhagens recombinantes de *Burkholderia sacchari* LFM 344 (Tabela 14) demonstraram que todos as linhagens conseguiam acumular PHA, especificamente P3HB. A linhagem recombinante *B. sacchari* LFM 344 pBBRMCS-2::*phaC*_{SCU63} foi a que mais acumulou PHA, correspondendo a 50,64% da massa seca celular (MSC). A que menos acumulou foi *B. sacchari* LFM 344 pBBRMCS-2::*phaC*_{BS}, que atingiu um teor de polímero correspondendo a aproximadamente 27% da massa seca celular (MSC), o pH do meio não diminuiu expressivamente em nenhuma das linhagens recombinante.

A transcrição dos genes *phaC* em linhagens recombinantes de *Burkholderia* PHA⁻ é independente de um regulador transcricional como o PhaR. O mesmo ocorre em linhagens recombinantes de *Ralstonia eutropha* P3HB⁻, quando albergam genes *phaC* de *Pseudomonas*,

sugerindo que a expressão de *phaC* é regulada por um promotor cuja função não depende de PhaR, ou de um regulador próprio da linhagem que pode substituir PhaR (KESSLER; WITHOLT, 2001).

I inhe som	MSC	nЦ		PHA	A (mol%)		PHA	PHA
Linnagem	(g/L)	pn –	3HB	3HH _x	ЗНО	3HD	3HD _d	(%MSC)	(g/L)
LEN 101	4,81	6,59	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	48,16	2,32
pBBR1MCS-2	4,90	6,59	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	38,92	1,91
pbbR1wic5-2	5,01	6,57	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	36,87	1,85
Média	4,91	6,58	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	41,32	2,02
Desvio-padrão	±0,10	±0,01	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	± 0,00	±6,01	±0,26
LFM 344	4,61	6,58	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	27,84	1,28
pBBR1MCS-	4,61	6,57	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	23,00	1,06
$2::phaC_{BS}$	4,61	6,56	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	29,89	1,38
Média	4,61	6,57	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	26,91	1,24
Desvio-padrão	±0,00	±0,01	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±3,54	±0,16
LFM 344	4,66	7,12	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	54,75	2,55
pBBR1MCS-	4,58	7,12	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	53,42	2,45
$2::phaC_{SCU63}$	4,32	7,12	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	43,73	1,89
Média	4,52	7,12	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	50,64	2,30
Desvio-padrão	±0,18	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±6,01	±0,36
LFM 344	4,39	7,13	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	42,71	1,87
pBBR1MCS-	4,51	7,14	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	45,99	2,07
$2::phaC_{SCU66}$	4,45	7,13	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	42,34	1,88
Média	4,45	7,13	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	43,68	1,94
Desvio-padrão	±0,06	±0,01	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±2,01	±0,11

Tabela 14 Produção de PHA por linhagens recombinantes de Burkholderia sacchari LFM 344 abrigando os genes phaC dos isolados SCU 63 e SCU 66 usando glicose (10g/L) como fonte de carbono em 72 h de cultivo

MSC- Massa seca celular; 3HB- 3- hidroxibutirato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; 3HO- 3- hidroxioctanoato; 3HD- 3- hidroxidecanoato; 3HDd- 3- hidroxidodecanoato PHA- Polihidroxialcanoato

Com este experimento foi possível confirmar que os genes *phaC* dos isolados SCU 63 e SCU 66 têm especificidade para incorporar monômeros de 3HB na cadeia principal para formar o polímero usando glicose como fonte de carbono. Entretanto, tem se demostrado que as PHA sintases podem ter uma especificidade mais ampla pelo substrato, quando são realizados cultivos de acúmulo utilizando outras fontes de carbono como os ácidos propiônico, valérico e hexanóico. Dennis e colaboradores. (1998) demostraram que o gene *phaC* de *Ralstonia eutropha* era capaz de incorporar, além de monômeros 3HB, monômeros 3HHx, formando o copolímero P(3HB-*co*-3HHx) em linhagens recombinantes de *Klebsiella aerogenes, Pseudomonas putida* GPp104 e em mutantes de *Ralstonia eutropha*, usando como fonte de carbono diferentes ácidos graxos, como o ácido hexanóico, octanóico, decanóico e oléico (DENNIS et al., 1998).

Assim, neste trabalhou decidou-se avaliar a capacidade metabólica das bactérias recombinantes *B.sacchari* LFM 344 pBBRMSC-2:: $phaC_{SCU63}$ e *B.sacchari* LFM 344 pBBRMSC-2:: $phaC_{SCU66}$, na incorporação de outros monômeros além do 3HB, usando glicose e, como co-substrato, os ácidos propiônico, butírico, valérico, hexanóico, heptanóico, octanóico, nonanóico e 4-Hidroxibutirico.

As linhagens recombinantes inicialmente foram cultivadas em meio LB por 24 h a 30 °C. Após esse período, inoculou-se meio mineral, contendo nitrogênio em concentração limitada e glicose em excesso. Com 24 h de cultivo, quando o nitrogênio estava totalmente consumido, um dos ácidos era adicionado para uma concentração de 1 g/L (ácidos propiônico, butírico, valérico, hexanóico, heptanóico, octanóico, nonanóico e 4-Hidroxibutirico), por 48 h a 30 °C. Foram retiradas amostras após 24 h e 72 h de cultivo para análises posteriores (pH, massa seca celular e PHA).

Na tabela 15 são apresentados os resultados correspondentes aos experimentos nos quais o ácido propiônico foi fornecido como co-substrato para linhagens estudadas de *B. sacchari*.

Micro-	Tempo	MSC		P	HA (mol	%)	PHA	РНА
organismo	(h)	(g/L)	рн	3HB	3HV	3HHx	(%MSC)	(g/L)
	24h	2,65	6,15	100,0	0,00	0,00	50,90	1,35
LFM 101	2411	±0,11	±0,14	±0,00	±0,00	±0,00	±3,50	±0,13
pBBR1MCS-2	70 h	4,82	7,38	96,53	3,49	0,00	52,69	2,54
	72 II	±0,40	±0,05	±0,10	±0,12	±0,00	±4,25	±0,33
	24 h	2,46	6,41	100,0	0,00	0,00	41,70	1,02
LFM 344	24 11	±0,09	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±4,23	±0,07
2nhaCps	72 h	4,69	7,26	100,0	0,00	0,00	34,76	1,42
2pha CBS	72 11	±0,17	±0,02	±0,00	±0,00	±0,00	±2,58	±0,13
	24 h	2,03	6,62	100	0,00	0,00	50,08	1,01
DBBR1MCS-	24 11	±0,26	±0,21	±0,00	±0,00	±0,00	±6,24	±0,10
2nhaCscuce	70 h	4,39	7,91	97,46	2,54	0,00	38,27	1,69
$2::pnaC_{SCU63}$	72 II	±0,64	±0,22	±0,45	±0,45	±0,00	±6,34	±0,44
	24 h	1,94	6,25	100,0	0,00	0,00	52,08	1,01
LFM 344 pBBR1MCS-	24 11	±0,02	±0,09	±0,00	±0,00	±0,00	±3,59	±0,08
2nhaCscuce	72 h	3,85	7,73	97,35	2,65	0,00	33,15	1,28
2	72 11	±0,11	±0,02	±0,31	±0,31	±0,00	±5,60	±0,22

Tabela 15 Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* usando glicose (10g/L) e ácido propiônico (1g/L) como fontes de carbono. Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão.

MSC- Massa seca celular; 3HB- 3- hidroxibutirato; 3HV- 3-hidroxivalerato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; PHA-Polihidroxialcanoato

Durante as primeiras 24 h de cultivo todas as linhagens avaliadas atingiram massas secas celulares com valores de aproximadamente 2 g/L, sendo maior para a linhagem selvagem *B. sacchari* LFM 101 com 2,65 g/L. Quanto ao pH, os valores caíram após as primerias 24 horas de cultivo. O teor de PHA acumulado já correspondia a aproximadamente 50% da massa seca celular, exceto para a linhagem *B. sacchari* LMF344 pBBR1MCS- $2::phaC_{BS}$

Após as primeiras 24 h de cultivo, todas as linhagens avaliadas atingiram massas secas celulares com valores de aproximadamente 2 g/L, sendo maior para a linhagem selvagem *B. sacchari* LFM 101 com 2,65 g/L. Quanto ao pH, os valores caíram após as primerias 24 horas de cultivo. O teor de PHA acumulado já correspondia a aproximadamente 50% da massa seca celular, exceto para a linhagem *B. sacchari* LMF344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{BS}$.

Após de 72 h de cultivo, as massas secas celulares atingiram mais que 4g/L, exceto para a linhagem LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU66}$ que atingiu 3,85 g/L. Os valores de pH aumentaram, atingindo valores superiores a 7,0. Com relação ao teor de PHA acumulado, apenas para linhagem selvagem *B. sacchari* LFM 101 foi observado um aumento. Além disso, detectou-se a incorporação de monômeros 3HV, correspondendo a 3,49 mol%. Este resultado é compatível com a literaratura, que confirma a produção do copolímero P(3HB-co-3HV) quando o ácido propiônico é oferecido como co-substrato (GOMEZ et al., 1996; SILVA, 1998).

Para as linhagens recombinantes o resultado foi inverso, ou seja, após de 72 h de cultivo, o teor de PHA acumulado é inferior àquele detectado com 24 horas de cultivo, embora ainda se observe um aumento na concentração de PHA. Não se observa a incorporação do monômero 3HV à cadeia polimérica.

Existem várias razões pelas quais o monômero 3HV não foi evidenciado. Uma delas seria a não detecção do monômero pela cromatografia gasosa, devido as quantidades do monômero nestas condições serem muito pequenas. Geralmente a fração de 3HV incorporada ao polímero é baixa, uma vez que, além de servir como co-substrato para unidades 3HV, o acido propiônico também pode ser assimilado para o crescimento celular (DOI et al., 1987). O ácido propiônico é rápidamente e eficientemente degradado pelas células bacterianas, e seu uso durante a fase de multiplicação celular ou mesmo para manutenção celular, implica em um maior desperdício, impedindo que sejam sintetizadas as unidades 3HV (CHANPRATEEP, 2010).

Silva e colaboradores (2000) a partir da construção de mutantes, obtidos por irradiação ultravioleta, de *Burkholderia sacchari* LFM 101, determinaram que a baixa conversão de ácido propiônico a 3HV pela via de síntese de polímero é decorrente da existência de ao menos duas vias do catabolismo que competem pelo substrato, a α-oxidação e o ciclo de 2-metilcitrato (2MCC), sendo esta última comprovada no nível molecular (SILVA et al., 2000).

A segunda razão pode ser que a concentração utilizada de ácido propiônico afete a incorporação de unidades 3HV à cadeia principal do polímero, podendo ser, que a concentrações maiores ou menores, a incorporação do monômero seja mais eficiente. Kim e colaboradores (1992) verificaram o efeito do ácido propiônico na produção de P(3HB-co-3HV) por Ralstonia eutropha ATCC 17699 a partir de frutose e ácido propiônico, sob limitação de nitrogênio. Relataram que o crescimento microbiano foi completamente inibido em concentrações de ácido propiônico maiores que 1,5 g/L e que a maior velocidade de produção de unidades 3HV, foi obtida quando a concentração de ácido foi de 0,5 g/L, obtendo mais de 70% de polímero com a fração de unidades de 3HV correspondendo a 50% (KIM et al., 1992). Matsumoto e colaboradores (2011) avaliaram a produção do copolímero P(3HBco-3HV) em linhagens recombinantes de Corynebacterium glutamicum abrigando os genes da biossíntese de PHA de Ralstonia eutropha. As bactérias inicialmente cresceram usando glicose e posteriormente os cultivos foram alimentados com diferentes concentrações entre 0-2% (m/v) de acido propiônico como precursor do monômero 3HV, conseguindo frações molares entre 0,2-11 mol% de 3HV. O conteúdo de PHA aumentou proporcionalmente com a adição de ácido propiônico embora a fração molar de 3HV no polímero foi baixa (MATSUMOTO et al., 2011).

A terceira razão pode ser que o gene *phaC* pertencente aos isolados SCU 63 e SCU 66 não tenha especificidade por incorporar monômeros 3HV à cadeia principal do polímero, apesar da bactéria fornecer os substratos para a incorporação. Esta hipótese é negada logo a seguir, pois, utilizando ácido valérico com co-substrato, a fração de 3HV atingida com a expressão das PHA sintases destes isolados é igual ou mesmo maior que os valores atingindos pela expressão da PHA sintase de *B. sacchari*. Assim, uma quarta hipótese é que a reação de condensação de propionil-CoA e acetil-CoA está limitada na mutante *B. sacchari* LFM344, uma vez que nenhuma das linhagens recombinantes produziu polímeros contendo 3HV. Schubert e colaboradores (1988) verificaram que mutações no gene *phaC* produzium efeitos polares nos genes *phaA* e *phaB*, reduzindo seu nível de expressão. Se PhaA desempenhar um papel importante na condensação de unidades 3HV em *B. sacchari*, efeitos polares da

mutação no gene *phaC* sobre o gene *phaA*, explicariam os resultados obtidos com o mutante *B. sacchari* LMF344. Entretanto, segundo Slater e colaboradores (1988), a β -cetotiolase codificada por *bktB* que desempenha o principal papel na condensação de acetil-CoA e propionil-CoA (SCHUBERT et al., 1988; SLATER et al., 1998).

Na Tabela 16 são apresentados os resultados quando o ácido butírico foi fornecido como co-susbstrato. Observou-se que em todas as linhagens somente houve acúmulo de monômeros 3HB, tanto nas primeiras 24 h como nas 72 h do experimento. Para a linhagem selvagem *B. sacchari* LFM 101 a massa seca celular aumentou de 2,46 g/L (24h) para 5,17 g/L (72h), na concentração total do polímero também houve um aumento considerável de 2,18 g/L no final do ensaio. Enquanto a linhagem a pesar de que houve um aumento da massa seca celular, a concentração total do polímero resultou em um pouco aumento já que de 0,98 g/L de PHA nas primeiras 24 h, passou para 1,61 g/L com um teor de 34,76% da massa seca celular ao final do ensaio. Nas linhagens recombinantes construídas neste ensaio a que maior concentração de polímero apresentou depois de 72 h, foi a linhagem LFM 344 pBBRMCS-2:*phaC*_{SCU63} 2,12 g/L de PHA pertencentes a 47,70% da massa seca celular comparada quanto a linhagem LFM 344 pBBRMCS-2:*phaC*_{SCU66} que produziu uma quantidade de 1,48 g/L, com um teor de polímero de 38,27% da massa seca celular.

Fukui, Abe e Doi (2002) citaram que *R. eutropha* recombinante abrigando o gene *bktB* era capaz de incorporar 3-hidroxihexanoil-CoA à cadeia principal do polímero, gerado pela ação da enzima BktB ao condensar acetil-CoA com butiril-CoA, fornecido pela ação da crotonil-CoA redutase de *Streptomyces cinnamonensis* sobre o substrato crotonil-CoA. Slater e colaboradores (1998) já haviam avaliado a afinidade do produto de *bktB* de *R. Eutropha* na atividade de tiolase frente a diferente substratos. Embora tenha preferência por 3-cetrovaleril-CoA, também catalisa de modo eficiente tiólise de 3-cetohexanoil-CoA (FUKUI; ABE; DOI, 2002).

Os resultados deste trabalho indicam que *B. sacchari* não é capaz de promover a condensação de aceil-CoA e butiril-CoA para formar 3-cetohexanoil-CoA, que seria posteriormente reduzido a 3HHx, em um mecanismo celular ao de *Ralstonia eutropha*. Detectando apenas monômeros 3HB nas linhagens recombinantes

Micro-	Tempo	MSC	nН	PH	IA (mol%)	PHA	PHA
organismo	(h)	(g/L)	pm -	3HB	3HV	3HHx	(%MSC)	(g/L)
	24 h	2,46	6,02	100,00	0,00	0,00	40,14	0,98
LFM 101	24 11	±0,07	±0,03	±0,00	±0,00	±0,00	±1,41	±0,00
pBBR1MCS-2	72 h	5,17	7,34	100,00	0,00	0,00	42,29	2,18
	72 11	±0,06	±0,02	±0,00	±0,00	±0,00	±1,55	±0,09
	24 h	2,51	6,39	100,00	0,00	0,00	38,64	0,98
LFM 344 pBBR1MCS-	24 11	±0,27	±0,01	±0,00	±0,00	±0,00	±6,88	±0,27
2nhaCps	72 h	4,63	7,30	100,00	0,00	0,00	34,76	1,61
2phaoBS	72 11	±0,08	±0,02	±0,00	±0,00	±0,00	±2,58	±0,09
	24 h	2,00	6,70	100,00	0,00	0,00	41,63	0,82
DBBR1MCS-	24 11	±0,10	±0,07	±0,00	±0,00	±0,00	±14,78	±0,26
2nhaCaguca	72 h	4,20	7,71	100,00	0,00	0,00	47,70	2,12
2pnaC _{SCU63}	/2 II	±0,11	±0,03	±0,00	±0,00	±0,00	±1,95	±0,13
LFM 344 pBBR1MCS-	24 h	1,99	6,16	100,00	0,00	0,00	49,78	0,99
	24 II	±0,08	±0,03	±0,00	±0,00	±0,00	±5,14	±5,14
2nhaCacuse	72 h	3,90	7,78	100,00	0,00	0,00	38,27	1,48
2	1211	±0,31	±0,03	±0.00	±0,00	±0.00	±7,14	±0,24

 Tabela 16 Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* usando glicose (10g/L) e ácido butírico (1g/L) como fontes de carbono. Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão

MSC- Massa seca celular; 3HB- 3- hidroxibutirato; 3HV- 3-hidroxivalerato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; PHA-Polihidroxialcanoato

O uso do ácido valérico (Tabela 17) promoveu o acúmulo de PHA em todas as linhagens contendo monômeros 3HB e 3HV, tendo uma maior fração molar de 3HV para aquela que abriga o gene *phaC* do isolado SCU 63, com um valor de 21,38 mol%. A que abriga o gene *phaC* do isolado SCU 66 apresenta uma maior fração molar comparada quanto a linhagem selvagem, obtendo um valor de 15,19 mol% na sua composição. Enquanto à concentração total do polímero, todas as linhagens avaliadas apresentaram um aumento considerável ao longo do ensaio, sendo maior para a linhagem selvagem *B. sacchari* LFM 101, com um valor de 2,28 g/L que equivalem a 44,52 % da massa seca celular. O crescimento não foi inibido na presença do ácido durante o ensaio, já que em baixas concentrações de este ácido o crescimento pode ser afetado (YU et al., 2002).O ácido valérico também é utilizado como precursor de unidades de 3HV, sendo incorporado ao polímero diretamente via valeril-CoA, o qual é oxidado a hidroxivaleril-CoA.

O uso do acido valérico proporciona uma maior incorporação de unidades 3HV ao copolímero quando comparado ao precursor ácido propiônico (HUSCHNER et al., 2014).

Khanna e Srivastava (2007), avaliaram em detalhe o efeito do ácido valérico na produção de copolímero P(3HB-*co*-3HV) com relação ao seu tempo de adição e a concentração de ácido inicial na linhagem selvagem de *Ralstonia eutropha* NRRL B 14690.

Inicialmente, analisaram a capacidade de adicionar unidades 3HV usando diferentes ácidos além do valérico, com contrações de 2 e 4 g/L e frutose com uma concentração de 40 g/L. Os ácidos eram adicionados 20 h logo do crescimento celular, determinando a biomassa e teor de PHA depois de 60 h. Nos resultados obtidos pelos pesquisadores citados, primeiro confirmam que o ácido valérico é um excelente precursor de unidades de 3HV, por outra parte, determinaram que usando a concentração maior de 4 g/L a incorporação do monômero foi mais eficiente obtendo uma fração molar 62,06 mol% de 3HV, mas inversamente afetando o crescimento celular. Logo disso, adicionaram ácido valérico em diferentes horas de cultivo e na fase inicial comprovaram uma vez mais o efeito inibitório no crescimento celular. Quando o ácido valérico era adicionado às 20 h de cultivo, quando o nitrogênio do meio estava quase consumido e a síntese de polímeros praticamente iniciando, uma alta concentração tanto de copolímero como de fração molar foi obtida com valores de 5,96 g/L e 24,8 mol% de 3HV. Quando foi adicionado às 30 horas, uma grande quantidade de PHB já tinha sido acumulado nas células, levando à pouca utilização do ácido. Por conseguinte, a produção do copolímero era muito baixa (KHANNA; SRIVASTAVA, 2007).

Micro-	Tempo	MSC	nH	PH	[A (mol%)	PHA	PHA
organismo	(h)	(g/L)	pm -	3HB	3HV	3HHx	(%MSC)	(g/L)
	24 h	2,92	6,05	100,00	0,00	0,00	42,71	1,24
LFM 101	24 11	±0,28	±0,07	±0,00	±0,00	±0,00	±1,83	±0,07
pBBR1MCS-2	72 h	5,12	7,20	88,31	11,69	0,00	44,52	2,28
	72 11	±0,05	±0,01	±0,67	±0,67	±0,0	±4,80	±0,26
LEN 244	24 h	2,31	6,38	100,00	0,00	0,00	37,75	0,87
DFM 344	24 11	±0,02	±0,01	±0,00	±0,00	±0,00	±2,32	±0,04
2nhaCps	72 h	4,14	7,19	84,41	15,59	0,00	28,95	1,20
2phaeBS	/2 11	±0,04	±0,02	±1,31	±1,31	±0,00	±0,85	±0,03
LEM 244	24 h	2,18	6,17	100,00	0,00	0,00	28,76	0,58
DFM 544	24 11	±0,22	±0,29	±0,00	±0,00	±0,00	±3,32	±0,08
2::phaCscus	72 h	4,40	7,22	78,65	21,35	0,00	25,81	1,12
2::pnaC _{SCU63}	72 11	±0,19	±0,05	±6,98	±6,98	±0,00	±4,32	±0,20
	24 h	2,03	6,71	100,00	0,00	0,00	45,30	0,92
LFM 544 pBBR1MCS-	24 11	±0,08	±0,08	±0,00	±0,00	±0,00	±7,25	±0,18
2nhaCacuse	72 h	3,81	7,59	84,81	15,19	0,00	36,30	1,47
2pha 0 50066	1211	±0,16	±0,08	±2,77	±2,77	±0,00	±4,74	±0,08

 Tabela 17 Produção de PHA por linhagens de B. sacchari usando glicose (10g/L) e ácido valérico (1g/L) como fontes de carbono. Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão

MSC- Massa seca celular; 3HB- 3- hidroxibutirato; 3HV- 3-hidroxivalerato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; PHA-Polihidroxialcanoato

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a capacidade de espécies de *Burkholderia* sp., em proporcionar diferentes monômeros para sua incorporação em uma cadeia polimérica, especificamente unidades de 3HV, usando ácido valérico como co-substrato. Chee e colaboradores (2012) construíram una linhagem recombinante de *Burkholderia* sp. JCM abrigando os gene *phaC* de *Aeromonas caviae*, conservando o gene *phaC* nativo da bactéria. Com o objetivo de determinar a habilidade de esta linhagem em incorporar monômeros diferentes ao 3HB, foi cultivada em valerato de sódio como co-substrato. Copolímeros de P(3HB-*co*-3HV), foram produzidos por esta linhagem recombinante com uma massa seca celular de 1 g/L, um teor de polímero de 21% da massa seca celular, uma concentração de polímero total do ensaio (72 h) de 0,2 g/L e uma fração molar de 91 mol% de 3 HV (CHEE et al., 2012).

Com relação à incorporação de monômeros 3HV usando valerato de sódio e propionato de sódio. Bhubalan e colaboradores (2008) reportaram que a incorporação de monômeros 3HV foi melhor usando valerato de sódio que a mesma quantidade de propionato de sódio (BHUBALAN et al., 2008).

Com o uso do acido hexanóico (Tabela 18) os resultados são muito interessantes já que a enzima PHA sintase dos isolados SCU 63 e SCU 66, foi capaz de incorporar monômeros 3HHx à cadeia principal do polímero. Comparando com as linhagens de *B. sacchari* usadas como controles, as linhagens recombinantes abrigando os genes *phaC* dos diferentes isolados, acumulam frações maiores de 3HHx com valores de 1, 55 mol% para a linhagem LFM 344 pBBR1MCS-2::*phaC*_{SCU63} e 1,00 mol% para a linhagem LFM 344 pBBR1MCS-2::*phaC*_{SCU66}. Como pode ser verificado no experimento com a linhagem selvagem LFM 101 pBBR1MCS-2, houve um acúmulo de 0,30 mol% do monômero de 6 carbonos. Em estudos anteriores, a linhagem selvagem de *B. sacchari* demonstrou capacidade para produzir PHA com uma fração molar do monômero 3HHx igual a1,06 mol% na presença de glicose 10 g/L e ácido hexanóico 1g/L (MENDONÇA et al., 2014).

Com relação à massa seca celular, em todas as linhagens avaliadas neste estúdio, apresentou-se um aumento entre as primeiras 24h e no final do ensaio, sendo maior na linhagem selvagem que de 2,43 g/L nas primeiras 24h passou para 4,93 g/L no final do ensaio. Para linhagem LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{BS}$ apesar de que aumentou a massa seca celular foi menor a quantidade comparada quanto linhagem selvagem com um valor de 3,96 g/L. No que respeita às linhagens que abrigam os genes phaC dos isolados avaliados neste trabalho que que maior massa seca celular apresentou foi LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU63}$

com uma massa seca celular final de 4 g/L. De acordo com estes resultado pode-se evidenciar que a concentração de 1 g/L de ácido hexanóico não inibe o crescimento celular das linhagens avaliadas de *B. sacchari*.

O efeito da modificação das condições de cultivo e acumulo na capacidade da linhagem selvagem de *B. sacchari* para produzir o copolímero P(3HB-*co*-3HHx) foi avaliado anteriormente por Mendonça e colaboradores (2014), comprovando que com um aumento na concentração de ácido hexanóico acima de 1g/L resulta num efeito inibitório sobre o crescimento, mas também utilizando-se uma concentração de glicose a 10 g/L, foi observado um aumento nas frações molares de 3HHx do copolímero, à medida que se aumentava a concentração de acido hexanóico fornecida (MENDONÇA et al., 2014).

triplic	ata e seu res	pectivo de	svio padi	rão.				
Micro-	Tempo	MSC	пЦ	PH	[A (mol%)	PHA	PHA
organismo	(h)	(g/L)	рп -	3HB	3HHx	ЗНО	(%MSC)	(g/L)
	24 h	2,43	6,16	100,00	0,00	0,00	41,53	1,01
LFM 101	24 11	±0,10	±0,21	±0,00	±0,00	±0,00	±0,97	±0,05
pBBR1MCS-2	72 h	4,93	7,08	99,70	0,30	0,00	31,23	1,53
	72.11	±0,20	±0,03	±0,07	±0,07	±0,00	±5,86	±0,23
	24 h	2,44	6,38	100,0	0,00	0,00	38,60	0,94
LFM 344 pBBR1MCS- 2:: <i>phaC</i> BS	24 11	±0,11	±0,01	±0,00	±0,00	±0,00	±3,43	±0,08
	72 h	3,96	7,10	99,59	0,41	0,00	22,15	0,88
2phaeBS	72.11	±0,14	±0,02	±0,13	±0,13	±0,00	±1,53	±0,04
LEM 244	24 h	2,10	6,22	100,0	0,00	0,00	38,53	0,80
nBBR1MCS-	24 11	±0,25	±0,06	±0,00	±0,00	±0,00	±5,24	±0,14
2::phaCscues	72 h	4,00	7,53	98,45	1,55	0,00	26,44	1,07
2 <i>pnu</i> C _{SCU63}	72.11	±0,22	±0,10	±0,37	±0,37	±0,00	±4,61	±0,23
LEM 244	24 h	2,07	6,54	100,0	0,00	0,00	52,39	1,08
LFM 344 pBBR1MCS-	24 11	±0,15	±0,06	±0,00	±0,00	±0,00	±1,18	±0,06
2phaCsource	72 h	3,80	7,60	99,00	1,00	0,00	31,0	1,18
2pha 0 SCU06	/ 2 11	±0,17	±0,03	±0,07	±0,07	±0,00	±9,85	±0,35

Tabela 18 Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* usando glicose (10g/L) e ácido hexanóico (1g/L) como fontes de carbono. Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão.

MSC- Massa seca celular; 3HB- 3- hidroxibutirato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; 3HO- 3-hidroxioctanoato; PHA-Polihidroxialcanoato

Enquanto à concentração total de polímero resultante para cada uma das linhagens avaliadas, não se apresentou um aumento relevante ao longo do tempo, na linhagem LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{BS}$ foi evidenciada uma pequena diminuição entre a concentração no tempo de 24h com um valor de 0,94 g/L e a concentração de 72h, a qual atingiu 0,88 g/L. A que maior concentração conseguiu, foi a linhagem selvagem LFM 101 pBBR1MCS-2 com uma concentração final de 1,53 g/l. Entre as linhagens que abrigam os genes *phaC* dos

isolados avaliados neste trabalho a que maior concentração obteve foi a linhagem LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU66}$ com um valor de 1,18 g/L equivalentes ao 31% da massa seca celular, entretanto, a linhagem LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU63}$ obteve uma concentração final de PHA com um valor de 1,07 g/L com um teor de polímero de 26,44%, não havendo muita diferença com o valor da concentração da linhagem LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU66}$.

No que diz respeito a linhagens de *Burkholderia* sp., existem poucos estudos publicados. Lau e colaboradores (2010) estudaram a síntese de PHA, em *B. cepacia*, comparado a selvagem e um recombinante com o gene da PHA sintase de *Aeromonas caviae*. Contudo, estes autores não tinham como objetivo a produção do copolímero. Por outra parte Chee e colaboradores (2012) determinaram a produção de polímeros de PHA com o monômero 3HHx em *Burkholderia* sp. Com gene de PHA sintase de *A. caviae*, conseguindo um polímero com uma fração molar com 1 mol% de 3HHx a partir de óleo de palmeira. Neste estúdio, nos recombinantes construídos LFM 344 pBBR1MCS-2::*phaC*_{SCU63} possibilitou obter um copolímero com frações molares de 3HHx, superiores àquele produzido pela linhagem selvagem e às outras linhagens recombinantes construídas.

Na Tabela 19 são apresentados os resultados quando o ácido heptanóico foi fornecido como co-substrato. Em este ensaio as linhagens LFM 101 pBBR1MCS-2, LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU63}$ e LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU66}$, foram capazes de acumular o copolímero P(3HB-*co*-3HV) com frações molares ressaltantes de 3HV. A linhagem LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU63}$ obteve frações molares de 74,13 mol% de 3HB e 25,87 mol% de 3HV, conseguindo valores maiores comparados quanto à linhagem selvagem LFM 101 pBBR1MCS-2, a qual produziu 78,71 mol% de 3HB e 21,29 mol% de 3HV. A linhagem LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU66}$, obteve uma fração molar de 80,06 mol% de 3HB e 19,94 mol% de 3HV. LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{Bs}$ foi a única linhagem que além de apresentar a incorporação dos monômero 3HB e 3HV à cadeia principal do monômero também apresentou a presença do monômero 3HHp. Nesta linhagem os valores das frações molares foram de 69, 66 mol% de 3HB, 29,13 mol% de 3HV e 1,21 mol% de 3HHp, acumulando um valor maior de unidades 3HV comparada quanto as outras linhagem avaliadas.

Nas linhagens que apresentaram um acúmulo do monômero 3HV, resultaram com uma pequena diminuição em relação à concentração final do polímero acumulado, uma vez que os valores no tempo de 24 h para a linhagem LFM 101 pBBR1MCS-2 foram de 1,21 g/L de

PHA com um teor de polímero de 48,92 % da massa seca celular e os valores no tempo de 72 h foram de 1,08 g/L com um teor de polímero de 30,79% da massa seca celular. Com a linhagem LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{BS}$ resultou um valor de 0,88 g/L com um teor de 40,87% da massa seca celular nas primeiras 24 h e no final do ensaio diminuiu para 0,78 g/L com um teor de 22,46% da massa seca celular. A que menos diminuição apresentou com relação à concentração do polímero foi a linhagem LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU63}$, no qual nas primeiras 24 h proporcionou uma concentração de PHA de 0,70 g/L equivalentes a 34,20% da massa seca celular, e no final de ensaio 0,64 g/L, com um teor de polímero foi a linhagem LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU66}$, que atingiu um valor de concentração final de 0,66 g/L.

Tabela 19 Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* usando glicose (10g/L) e ácido heptanóico(1g/L) como fontes de carbono. Os dados correspondem à média dos experimentos emtriplicata e seu respectivo desvio padrão.

Micro-	Tempo	MSC	nH	P	HA (mol%	%)	PHA	PHA
organismo	(h)	(g/L)	pn	3HB	3HV	ЗННр	(%MSC)	(g/L)
	24 h	2,5	6,21	100,0	0,00	0,00	48,92	1,21
LFM 101 pBBR1MCS-2	24 11	±0,15	±0,34	±0,00	±0,00	±0,00	±0,76	±0,08
	72 h	3,47	6,95	78,71	21,29	0,00	30,79	1,08
	72 11	±0,42	±0,03	±7,23	±7,23	±0,00	±10,38	±0,40
	24 h	2,10	5,93	100,0	0,00	0,00	40,87	0,88
LFM 344 pBBR1MCS	24 11	±0,38	±0,20	±0,00	±0,00	±0,00	±3,43	±0,20
2.:.nhaCps	72 h	3,45	6,91	69,66	29,13	1,21	22,46	0,78
$2::phaC_{BS}$		±0,47	±0,08	±4,95	±4,59	±0,36	±6,69	±0,27
	24 h	2,00	6,29	100,0	0,00	0,00	34,20	0,70
nBBR1MCS-	24 11	±0,24	±0,04	±0,00	±0,00	±0,00	±2,14	±0,12
2::phaCscucz	72 h	3,4	6,98	74,13	25,87	0,00	18,78	0,64
	72 h	±0,18	±0,02	±4,82	±4,82	±0,00	±1,35	±0,08
	24 h	1,63	5,29	100,0	0,00	0,00	31,73	0,52
LFM 344 pBBR1MCS- 2phaCscuce	2 4 II	±0,25	±0,09	±0,00	±0,00	±0,00	±4,77	±0,10
	72 h	2,06	5,36	80,06	19,94	0,00	32,09	0,66
=F	12 11							

MSC- Massa seca celular; 3HB- 3- hidroxibutirato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; 3HO- 3-hidroxioctanoato; PHA-Polihidroxialcanoato

No trabalho de Mendonça e colaboradores (2014) *Burkholderia sacchari* LFM 101 consegue acumular unidades de 3HB e 3HV não evidenciando a presença de unidades 3HHp, quando o ácido heptanóico é suprido como co-substrato com valores obtidos de 71,9 mol% de 3HB e 28,1 mol% de 3HV, com um teor de PHA total de 23,4% da massa seca celular, valores muitos próximos aos obtidos neste trabalho (MENDONÇA et al., 2014).

Trabalhos encontrados na literatura confirmam que PHA sintases têm especificidade por unidades 3HV quando ácidos graxos impares como ácido heptanóico são fornecidos como fonte de carbono, assim como a incorporação de monômeros 3HHp observado na linhagem LFM 344 pBBR1MCS-2::*phaC*_{BS}. Taguchi e colaboradores (2003) avaliaram a produção de linhagens recombinantes de *Ralstonia eutropha* abrigando vários mutantes do gene *phaC* de *Ralstonia eutropha* bem como o gene original, quando era fornecido unicamente acido heptanóico (1 g/L) como fonte de carbono, durante 12 h por um período total de 72 h. Observando a produção do copolímero P(3HB-*co*-3HV-*co*-3HHp) em 7 linhagens avaliadas incluindo a que abrigava o gene original, o qual conseguiu acumular mais unidades de 3HV com um valor de 66,3 mol% e unidades de 3HHp com um valor de 0,7 mol%, mas com uma concentração de massa seca celular total de 0,87 g/l e um teor de polímero de 41% da massa seca celular (TAGUCHI et al., 2003).

Por outro lado, a especificidade dos genes *phaC* dos isolados SCU 63 e SCU 66 é levada a consideração parece apresentar maior especificidade por monômeros 3HV que por monômeros 3HHp, já que não foram detectados neste ensaio.

Para este trabalho também foi avaliada a produção de copolímeros a partir de ácido octanóico e assim determinar se as PHA sintases dos isolados são capazes de incorporar monômeros 3HO (Tabela 20). O uso do ácido octanóico em ensaios de acúmulo também funciona como um indicador para definir se os ácidos orgânicos de cadeia maior, são uma opção para a produção industrial de PHAs híbridos, de modo que ácidos graxos derivados de óleos vegetais poderiam ser empregados como substratos prometedores.

O ácido octanóico, é metabolizado na β -oxidação de ácidos graxos, gerando intermediários com seis carbonos, 2-*trans*-hexenoil-CoA ou 3-hidroxihexanoil-CoA. Podendo gerar intermediários com outo ou dez carbonos, por exemplo pela simples metabolização, à 3-hidroxioctanoil-CoA, ou pela condensação daquele com acetil-CoA, originando 3-hidroxidecanoil-CoA.

Em todas as linhagens analisadas unicamente foi detectada a produção do monômero 3HB a partir de glicose e ácido octanóico, indicando que o direcionamento de intermediários da β-oxidação de seis ou oito carbonos não foi eficiente. Trabalhos realizados por Mendonça (2010) confirmam os resultados obtidos neste ensaio, uma vez que cultivando *B. sacchari* selvagem em glicose (10g/L) e ácido octanóico (1g/L), não foi observado acúmulo de monômero 3HHx, unicamente foi detectado 3HB. Lício e colaboradores (2009) avaliaram a produção de PHAs em *B. sacchari* a partir de ácido octanóico como única fonte de carbono,

com uma concentração de 1,44 g/L e uma limitação no nitrogênio de 0,2 g/L, nestas condições *B. sacchari* consegue acumula 0,36 mol% de monômeros 3HHx (LÍCIO et al., 2009).

Micro-	Tempo	MSC	nH	PH	[A (mol%)	PHA	РНА
organismo	(h)	(g/L)	P11	3HB	3HHx	ЗНО	(%MSC)	(g/L)
	24 h	2,33	5,37	100,00	0,00	0,00	28,88	0,67
LFM 101 pBBR1MCS-2	24 11	±0,80	±0,03	±0,00	±0,00	±0,00	±2,46	±0,27
	72 h	4,07	6,77	100,00	0,00	0,00	20,26	0,96
	7211	±0,96	±0,12	±0,00	±0,00	±0,00	±7,00	±0,31
	041	1,70	5,86	100,00	0,00	0,00	42,10	0,72
LFM 344	24 11	±0,74	±0,15	±0,00	±0,00	±0,00	±3,23	±0,28
pBBRIMCS-	72 h	2,75	6,75	100,00	100,00	0,00	17,10	0,47
2phaeBS	/2 11	±0,10	±0,02	±0,00	±0,00	±0,00	±4,27	±0,13
	24 h	2,30	5,83	100,00	0,00	0,00	41,85	1,00
LFM 344 pBBR1MCS-	24 11	±0,24	±0,10	±0,00	±0,00	±0,00	±3,50	±0,20
2phaCoouce	72 h	3,15	4,61	100,00	0,00	0,00	28,93	0,92
$2phaC_{SCU63}$	12 11	±0,27	±0,07	±0,00	±0,00	±0,00	±4,56	±0,22
	24.1	2,01	5,76	100,00	0,00	0,00	43,47	0,88
LFM 344 pBBR1MCS- 2::phaCoover	24 11	±0,34	±0,20	±0,00	±0,00	±0,00	±2,34	±0,18
	70 h	2,27	4,70	100,00	0,00	0,00	28,02	0,64
2pha CSCU66	12 11	±0,15	±0,03	±0,00	±0,00	±0,00	±4,41	±0,14

Tabela 20 Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* usando glicose (10g/L) e ácido octanóico (1g/L) como fontes de carbono. Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão.

MSC- Massa seca celular; 3HB- 3- hidroxibutirato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; 3HO- 3-hidroxioctanoato; PHA-Polihidroxialcanoato

Conforme na literatura, Dennis e colaboradores (1998) estudaram a produção de distintas linhagens recombinantes, que abrigavam os genes *phaC* de *Ralstonia eutropha* em diferentes espécies bacterianas, determinando que o maior rendimento na produção do copolímero P(3HB-*co*-3HHx) foi obtido na linhagem recombinante de *R. eutropha* usando acido octanóico e acido hexanóico, demonstrando que a medida que aumenta o tamanho da fonte de carbono as quantidades das unidades 3HHx no polímero acumulado diminuíam. Também avaliaram a influência na concentração de acido e fonte de nitrogênio para otimizar a produção do copolímero P(3HB-*co*-3HHx). Concluindo que concentrações mais altas que 0,4% de acido octanóico causavam toxicidade nas células afetando o seu crescimento. O melhor resultado com respeito à massa seca celular, teor de polímero e peso molecular foi obtido a partir de concentrações entre 0,2 e 0,4% de octanoato e 0,075% NH₄Cl (DENNIS et al., 1998).

Com relação a outras linhagens recombinantes abrigando genes *phaC* de classe I. Shin e colaboradores (2002) observaram que linhagem recombinante de *Pseudomonas putida*

KT2440 com os genes *phaCAB* de *Ralstonia eutropha* produziam PHA com composições muito variável de acordo com a fonte de carbono fornecida. A partir de gliconato, o PHA produzido tinha um teor de cerca de 80% de 3HB e a partir de octanoato cerca de 95% de monômeros HA_{MCL}. Ensaios com misturas destas dois fontes de carbono permitiram a produção de PHAs com composições intermediárias. Determinando que o nível da expressão de enzimas PHA sintase de classe I é importante para promover a síntese desses monômeros ou sua incorporação ao PHA (SHIN et al., 2002).

Na Tabela 21 estão os resultados de produção de PHA, usando glicose e ácido nonanóico como fontes de carbono. As linhagens LFM 101 pBBR1MCS-2 e LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{BS}$ apresentaram um acúmulo de unidades 3HV além do 3HB. Com valores de 94,19 mol% de 3HB e 5,81 mol% de 3HV para a linhagem selvagem LFM 101 pBBR1MCS-2, do mesmo modo, a linhagem LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{BS}$, produz uma fração de 81,64 mol% de 3HB e 18, 36 mol% de 3HV, não foram detectados monômeros 3-hidroxinonanoato (3HN). Caso contrario apresentou-se com as linhagens recombinantes LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU63}$ e LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU66}$ as quais conseguiram acumular como único constituinte o monômero 3HB.

Os resultados neste trabalho são confirmados pelo descrito por Mendonça e colaboradores (2014), quando *B. sacchari* LFM 101 é capaz de acumular monômeros 3HB e 3VH quando glicose e ácido nonanóico são fornecidos como fonte de carbono, com valores de 80,2 mol% de 3HB e 18,8 mol% de 3HV, com uma massa seca total de 1,81 g/L e um teor total de polímero de 26,2% da massa seca celular, não foi detectado a incorporação de monômeros 3HN.

Em relação a outras linhagens selvagens em *Rasltonia eutropha* foi evidenciada a produção do copolímero P(3HB-*co*-3HV) quando ácido oleico e ácido nonanóico foram supridos como fonte de carbono, também *Herbaspirillum seropediciae* quando o ácido nonanóico é fornecido unicamente como fonte de carbono esta bactéria consegue produzir o copolímero, sendo impossível a evidencia de unidades 3HN para as duas linhagens (EGGINK et al., 1993; CATALÁN et al., 2007). Para a formação de unidades 3HV a partir de ácidos carboxílicos contendo 5 ou mais átomos de carbono é necessário primeiro a ação de uma acil-CoA sintetase ou de uma CoA tranferase, formando o acil-CoA correspondente, sendo convertidos a 3-cetovaleril-CoA, pela ação de enzimas responsáveis pela oxidação de ácidos graxos, posteriormente, o 3-cetovaleril-CoA é convertido a D(-)-3-hidroxivaleril-CoA pela enzima 3-cetoacil-CoA redutase NADPH dependente.

Enquanto à incorporação do monômero 3-hidroxinonanoato (3HN) como único constituinte, tem sido evidenciada em bactérias como *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas oleovorans*, pela especificidade da PHA sintases presentes em estas bactérias por ter a capacidade de incorporar com preferência monômeros 3HN respectivamente (BRANDL et al., 1988; SUN et al., 2002).

Micro-	Tempo	MSC	nЦ	PH	A (mol%))	PHA	PHA
organismo	(h)	(g/L)	pn -	3HB	3HV	ЗНО	(%MSC)	(g/L)
	24 h	2,30	6,01	100,00	0,00	0,00	50,08	1,16
LFM 101	24 II ·	±0,28	±0,32	±0,00	±0,00	±0,00	±3,91	±0,22
pBBR1MCS-2	70 h	3,30	5,87	94,19	3HB 3HV 3HO $0,00$ $0,00$ $0,00$ $0,00$ $\pm 0,00$ $\pm 0,00$ $0,00$ $\pm 0,00$ $\pm 0,00$ $0,19$ $5,81$ $0,00$ $0,06$ $\pm 8,06$ $\pm 0,00$ $0,00$ $0,00$ $0,00$ $0,00$ $\pm 0,00$ $\pm 0,00$ $0,00$ $0,00$ $0,00$ $0,00$ $\pm 0,00$ $\pm 0,00$ $0,00$ $\pm 0,00$ $\pm 0,00$ $0,00$ $\pm 0,00$ $\pm 0,00$ $0,00$ $0,00$ $\pm 0,00$	39,84	1,30	
	/2 11	±0,34	±0,74	±8,06	±8,06	±0,00	±7,01	±0,20
I EM 244	24 h	2,60	5,59	100,00	0,00	0,00	36,13	0,91
LFM 344 pBBR1MCS-	24 11	±0,52	±0,49	±0,00	±0,00	±0,00	±4,11	±0,14
2nhaCpg	72 h	3,00	6,65	81,64	18,36	0,00	9,44	0,28
2phaeBS	12 11	±0,20	±0,19	±5,22	±5,22	±0,00	±0,17	±0,01
LEM 244	24 h	2,10	5,89	100,00	0,00	0,00	42,11	0,87
DFM 344	24 11	±0,40	±0,06	±0,00	±0,00	±0,00	±1,36	±0,19
2phaCsouce	72 h	3,33	5,52	100,00	0,00	0,00	28,66	0,96
2::pnaC _{SCU63}	72.11	±0,18	±0,01	±0,00	±0,00	±0,00	±2,64	±0,13
LFM 344 pBBR1MCS-	24 h	2,05	6,43	100,00	0,00	0,00	40,32	0,82
	∠ + 11	±0,15	±0,71	±0,00	±0,00	±0,00	±1,07	±0,05
2::phaCsouce	72 h	2,19	5,62	100,00	0,00	0,00	21,34	0,47
	12 11	±0,18	±0,01	±0,00	±0,00	±0,00	±2,64	±0,11

Tabela 21 Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* usando glicose (10g/L) e ácido nonanóico (1g/L) como fontes de carbono. Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão.

MSC- Massa seca celular; 3HB- 3- hidroxibutirato; 3HV- 3-hidroxivalerato; 3HO- 3-hidroxioctanoato; PHA-Polihidroxialcanoato

Possivelmente as linhagens recombinantes LFM 344 pBBR1MCS-2::*phaC*_{SCU63} e LFM 344 pBBR1MCS-2::*phaC*SCU66, conseguiram acumular pequenas quantidades de unidade 3HV mas que não foram detectadas pela cromatografia gasosa, isto porque ácidos graxos com mais de cinco átomos de carbono, quando são utilizados como co-substratos, a cadeia carbonada do polímero aumenta, e a fração molar de 3HV diminui no copolímero, porque seria obtido mais acetil-CoA, resultando num aumento da fração de 3HB. Mesmo obtendo unidades 3HV nas linhagens usadas como controles a fração molar diminui usando ácido nonanóico em relação aos outros ácidos impares, quanto as linhagens recombinantes.

Por ultimo, foi analisado a capacidade de acumulo de PHA usando como fonte de carbono ácido 4-Hidroxibutirato de sódio (1g/L) e glicose (10 g/L) (Tabela 22). Neste ensaio foi evidenciado que as duas linhagens recombinantes que abrigam os genes *phaC* dos isolados

avaliados neste trabalho são capazes de acumular unidades de 4HB. A linhagem LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU63}$, foi a que produziu mais unidades de 4HB com um valor de 14,01 mol% acompanhado com uma fração molar de 85,99 mol% de 3HB. Por outro lado, a linhagem LFM 344 pBBR1MCS-2:: $phaC_{SCU66}$ 12,39 mol% de 4HB e 87,61 mol% de 3HB.

Micro-	Tempo	MSC	nH	PH	[A (mol%	(0)	PHA	PHA
organismo	(h)	(g/L)	PII	3HB	4HB	3HHx	(%MSC)	(g/L)
	24 h	2,10	5,51	100,00	0,00	0,00	31,16	0,67
LFM 101	24 11	±0,38	±0,05	±0,00	±0,00	±0,00	±6,22	±0,24
pBBR1MCS-2	72 h	4,90	7,20	86,28	13,72	0,00	30,19	1,48
	12 11	±1,05	±0,03	±8,39	±8,39	±0,00	±7,62	±0,43
I EM 244	24 h	2,40	6,41	100,00	0,00	0,00	42,62	1,02
LFM 344 pBBR1MCS- 2::phaC _{BS}	24 11	±0,07	±0,08	±0,00	±0,00	±0,00	±11,7	±0,26
	72 h	4,50	7,19	66,02	33,98	0,00	42,22	1,89
2pha0B5	72 11	±0,11	±0,06	±2,43	±2,43	±0,00	±1,36	±0,11
LEM 244	24 h	2,40	6,03	100,00	0,00	0,00	42, 46	1,04
nBBR1MCS-	24 11	±0,46	±0,14	±0,00	±0,00	±0,00	±1,24	±0,22
2::phaCscue2	72 h	5,73	7,09	85,99	14,01	0,00	49,03	2,21
2:: <i>phaC</i> _{SCU63}	12 11	±0,16	±0,05	±1,94	±1,94	±0,00	±5,64	±0,16
LFM 344 pBBR1MCS-	24 h	1,38	6,13	100,00	0,00	0,00	44,12	0,62
	24 11	±0,55	±0,10	±0,00	±0,00	±0,00	±3,91	±0,28
	70 h	4,46	7,11	87,61	12,39	0,00	49,04	2,19
2phuCSCU66	12 11	+0.13	+0.08	+2.65	+2.65	+0.00	+1.94	+0.15

Tabela 22Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* usando glicose (10g/L) e ácido 4-
Hidroxibutirico (1g/L) como fontes de carbono. Os dados correspondem à média dos
experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão.

MSC- Massa seca celular; 3HB- 3- hidroxibutirato; 4HB- 4-hidroxibutirato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato PHA-Polihidroxialcanoato

O Poli(3-hidroxibutirato-*co*-4-hidroxibutirato) [P(3HB-*co*-4HB)] é um dos PHAs que ganharam a atenção como um biomaterial promissor, especialmente na aplicação médica e farmacêutica. Estudos mostraram que a degradação de P(3HB-*co*-4HB) produz o ácido 3-hidroxibutanóico e o ácido 4-hidroxibutanóico, que são metabolitos naturais presentes no organismo humano. Além disso, o ácido 4-hidroxibutanóico também é menos ácido do que o ácido glicólico e ácido láctico produzidos a partir do ácido poli-glicólico (PGA) e ácido poliláctico (PLLA), usados para implantes. Este copolímero resulta difícil de produzir, e por tanto, não tem sido suficientemente estudado (IQBAL; AMIRUL, 2014).

O ácido 4-Hidroxibutirato de sódio como co-substrato é conduzido para a incorporação de monômeros 4HB dentro de a cadeia principal do polímero, produzido por *B. sacchari*. Mendonça e colaboradores (2010) demonstraram a habilidade de *B. saccahari* em incorporar monômero 4HB à cadeia principal do polímero, a partir de ácido 4-hidroxibutirico

com fração molar de 9,1 mol% de 4HB (MENDONÇA et al., 2014). A incorporação de unidades de 4HB dentro de uma cadeia polimérica de PHAs, foi inicialmente detectada em *Ralstonia eutropha* (KUNIOKA; KAWAGUCHI; DOI, 1989).

De acordo com a literatura descrita sobre a composição do copolímero P(3HB-co-4HB) é provável que existam altercações na sua composição, devido à diferença no uso da fonte de carbono. Usando como fontes de carbono γ -butirolactona e 1,4-butanediol, primeiro existe uma oxidação que forma o ácido 4-hidroxibutirico, em seguida, a 4-hidroxibutiril-CoA antes de converter para 4HB. No entanto, uma porção de 4-hidroxibutiril-CoA é metabolizada em 3-hidroxibutiril-CoA e posteriormente se transforma em 3-hidroxibutirato, diminuindo assim a composição de 4HB. Por outro lado, usando como fonte de carbono 1,6-hexanodiol, primeiro este composto é oxidado para 6-hidroxihexanoato e 6-hidroxihexanoil-CoA pela via da ω -oxidação. Além disso a oxidação de 6-hidroxihexanoil-CoA conduz à produção de ácido adípico, que mais tarde é catabolizado em succinil-CoA é conduzido à via metabólica do 3HB para produzir este monômero. Assim, 1,6-hexanodiol como precursor na biossíntese de unidades 4HB, aumentaria as composições do monômero a uma cadeia polimérica de P(3HB), ideal para ser usado em futuros ensaios em avaliar a capacidade da produção do copolímero P(3HB-co-4HB) (IQBAL; AMIRUL, 2014).

Cesário e colaboradores (2014) avaliaram a capacidade de *Burkholderia sacchari* DSM 17165 em acumular o copolímero P(3HB-*co*-4HB) com glicose (20 g/L) e a adição de gama-butirolactona (GBL) (5 g/L) ao meio, depois de 27 h foi obtido uma concentração total de polímero de 4,3 g/l com uma fração molar de 1 mol% de 4HB, sendo a GBL um bom precursor para a produção deste polímero. A inibição do crescimento celular é observada a concentrações acima de 10 g/L de GBL (CESÁRIO et al., 2014).

Lau e Sudesh (2012) clonaram e caracterizaram o gene da PHA sintase de *Burkholderia* sp. USM (JCM 15050). Quando foi inserido o gene *phaC* em linhagens de *Ralstonia eutropha* PHA⁻, demonstrou-se que a linhagem recombinante era capaz de acumular poli(3-hidroxibutirato-*co*-4-hidroxibutirato), P(3HB-*co*-4HB) com uma alta proporção de 4-hidroxibutirato (4HB), resultado que não foi observado na linhagem selvagem quando eram cultivadas usando γ -butirolactona ou 4-hidroxibutirato de sódio. O que evidencia que PHA sintases do gênero *Burkholderia* são capazes de ter especificidade por outros monômeros, gerados a partir de outras fontes de carbono, quando são expressas em linhagens hospedeiras neste caso em *Ralstonia eutropha* (LAU; SUDESH, 2012).

Por outro lado, neste trabalho também foi avaliada a produção de PHAs nas linhagens recombinantes LFM 344 pBBR1MCS-2::*phaC*_{SCU63} e LFM 344 pBBR1MCS-2::*phaC*_{SCU66}, a partir de glicose 10 g/L e da mistura de ácido heptanóico e ácido hexanóico com diferentes proporções, mas sempre com uma concentração final de 1 g/L, o ácido hexanóico sempre estava em maior proporção com relação ao ácido heptanóico. No começo do ensaio, as linhagens recombinantes eram inoculadas em meio mineral suplementado com canamicina e glicose (MMGK) a 30 °C, após de 24 h, a mistura dos ácidos foi adicionada ao meio, completando no total 72 h de cultivo.

Na Tabela 23 estão apresentados os resultados obtidos pela linhagem recombinante LFM 344 pBBR1MCS-2::phaC_{SCU63}, quando foram usadas misturas de ácido hexanóico e heptanóico em diferentes proporções, como co-substrato. Para a proporção de 9:1 nas primeiras 24 h quando a glicose esta como única fonte de carbono na produção de polímero somente é detectado monômeros 3HB, com uma concentração de massa seca celular de 1,60 g/l e um teor de polímero total de 29,83% da massa seca celular. No tempo de 72 h, tanto a massa seca celular como o teor de polímero aumentaram com valores de 2,80 g/L e 30, 20%. Enquanto às frações molares, apresentou-se a detecção de unidades 3HB, 3HV e 3HHx, com valores de 95,90 mol%, 3,10 mol% e 1 mol%. Quando a proporção da mistura era de 8:1 os resultados das primeiras 24 horas não variaram com relação à proporção anteriormente descrita. Depois de 72 h a concentração da massa seca celular foi de 3,60 g/L, com um teor total de polímero de 19,24%, evidenciou-se em maior proporção fracções molares de 3HB com 84,18 mol% e em menor proporção 15,82 mol% de 3VH, não foi evidenciada a presença de monômeros 3HHx. A ultima proporção avaliada 7:3 foi obtida uma concentração de massa seca celular de 2,40 g/L, com um teor total de polímero de 15,66%, usando esta proporção não foi evidenciado a incorporação de monômero 3HHx, unicamente de unidades 3HB com um valor de fração molar 70,26 mol% e de 3HV com 29,74 mol%.

Dronoroão	Tempo	MSC	nH	Pl	HA (mol%)	PHA	РНА
rroporçao	(h)	(g/L)	рп	3HB	3HV	3HHx	PHA (%MSC) 29,83 ±6,17 30,20 ±4,73 30,78 ±1,94 19,24 ±14,40 28,25 ±6,36 15,66 ±8,18	(g/L)
	24 h	1,60	6,29	100,00	0,00	0,00	29,83	0,46
Hexanoico/Heptanoico 9:1	24 11	±0,29	±0,10	±0,00	±0,00	±0,00	±6,17	±0,01
	72 h	2,80	5,58	95,90	3,10	1,00	30,20	1,19
	72 11	±0,89	±0,60	±0,20	±0,20	±0,20	±4,73	±0,26
	24 h	1,90	6,19	100,00	0,00	0,00	30,78	0,58
Hexanoico/Heptanoico	24 11	±0,11	±0,26	±0,00	±0,00	±0,00	±1,94	±0,07
8:2	70 1	3,60	7,40	84,18	15,82	0,00	19,24	0,73
	72.11	±0,66	±0,06	±18,1	±18,10	±0,00	±14,40	±0,59
	24 h	1,40	6,06	100,00	0,00	0,00	28,25	0,41
Hexanoico/Heptanoico 7:3	24 11	±0,17	±0,46	±0,00	±0,00	±0,00	±6,36	±0,14
	72 h	2,40	7,40	70,26	29,74	0,00	15,66	0,59
	72 h	±0,10	±0,06	±18,30	±18,30	±0,00	±8,18	±0,38

 Tabela 23
 Produção de PHA pela linhagem 344 pBBRMCS.2::phaC_{SCU63} usando glicose (10g/L)

 Acido hexanóico e heptanóico em diferentes proporções com uma concentração final (1g/L), como fontes de carbono.

MSC- Massa seca celular; 3HB- 3- hidroxibutirato; 3HV- 3-hidroxivalerato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato PHA-Polihidroxialcanoato

Na Tabela 24 estão apresentados os resultados dos ensaios de acúmulo de polímero da linhagem recombinante LFM 344 pBBRMCS.2:: $phaC_{SCU66}$ quando foram fornecidas glicose e diferentes proporções da mistura dos ácidos hexanóico e heptanóico. Para o período de 24 h em todas a proporções utilizadas neste ensaio, foi detectada a presença unicamente de unidades 3HB, o teor de polímero total que foi detectado em maior quantidade foi de 43,74% da massa seca celular, para a proporção de 9:1 e uma massa celular total de 2,10 g/L. Com relação à proporção 9:1, no final do ensaio, foi obtido um valor de massa seca celular de 2,80 g/L com um teor de polímero de 53,13% da massa seca celular, foi detectado unicamente o monômero 3HB. Enquanto à proporção de 8:2, a presença de monômeros 3HB, 3HV e 3HHx com valores de 93,88 mol%, 3,95 mol% e 2,17 mol%. A concentração da massa seca celular final foi de 3,60 g/L, com um teor total de polímero de 13,55% pertencente à da massa seca celular. Para a proporção 7:3 no final do ensaio (72 h), somente foi detectada unicamente frações molares dos monômeros 3HB 90,91 mol% e 3HV 9,09 mol%. A concentração da massa seca celular total foi de 2,40 g/L e o teor total de polímero foi de 11,30% da massa seca celular.

Proporção	Tempo	MSC	nH	PH	IA (mol%	(0)	РНА	РНА
TTOPOTÇao	(h)	(g/L)	pii	3HB	3HV	3HHx	PHA (%MSC) 43,74 ±2,45 53,13 ±3,73 37,50 ±9,42 16,70 ±13,55 41,82 ±1,94 11,30 ±0,63	(g/L)
	24 h	2,10	5,86	100,0	0,00	0,00	43,74	0,91
Hexanoico/Heptanoico 9:1	24 11	±0,22	±0,32	±0,00	±0,00	±0,00	±2,45	±0,14
	72 h	2,80	5,58	100,00	0,00	0,00	53,13	1,49
	72 11	±0,89	±0,60	±0,00	±0,00	±0,00	±3,73	±0,56
	24 h	2,27	6,28	100,00	0,00	0,00	37,50	0,83
Hexanoico/Heptanoico	24 11	±0,29	±0,15	±0,00	±0,00	±0,00	±9,42	±0,30
8:2	70 h	3,60	7,40	93,88	3,95	2,17	16,70	0,70
	72.11	±0,66	±0,06	±1,26	±0,77	±0,95	±13,55	±0,64
	24 h	1,90	5,88	100,00	0,00	0,00	41,82	0,78
Hexanoico/Heptanoico 7:3	24 11	±0,38	±0,31	±0,00	±0,00	±0,00	±1,94	±0,18
	72 h	2,40	7,40	90,91	9,09	0,00	11,30	0,27
	/ Z II	±0,10	±0,06	±7,97	±7,97	±0,00	±0,63	±0,02

Tabela 24Produção de PHA pelas linhagem LFM 344 pBBRMCS.2::phaC_{SCU66} usando glicose
(10g/L). Acido hexanóico e heptanóico em diferentes proporções com uma
concentração final (1g/L), como fontes de carbono.

MSC- Massa seca celular; 3HB- 3- hidroxibutirato; 3HV- 3-hidroxivalerato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato PHA-Polihidroxialcanoato

A produção de terpolímeros foi evidenciada nas duas linhagens recombinantes, no caso da LFM 344 pBBRMCS.2::phaC_{SCU66} apresentou-se uma maior fração molar no monômero 3HHx e 3HV comparada quanto a linhagem LFM 344 pBBRMCS.2::phaC_{SCU63}. Até a data, a PHA sintase de Aeromonas caviae é conhecida para produzir tais terpolímeros P(3HB-co-3HV-co-3HHx), quando o gene foi inserido em linhagens recombinantes de Ralstonia eutropha e foram realizados ensaios de acúmulo de PHA usando como fontes de carbono misturas de óleo de palma com precursores do monômero 3HV como propionato de sódio e valerato de sódio, sendo este último mais eficiente na conversão de monômeros 3HV, com uma concentração de 8 g/L sendo adicionado após 12 h de cultivo, atingindo frações molares de 38 mol% para 3HB, 60 mol% de 3HV e 2 mol% de 3HHx (BHUBALAN et al., 2008). O gene phaC de A. caviae foi inserido na linhagem Burkholderia sp. USM, comprovando também a capacidade de produzir terpolímeros a partir de óleo de palma bruto e propionato e valerato de sódio com uma concentração de 2,5 g/L, adicionados desde o inicio do ensaio como também após 36 h. O melhor resultado obtido foi quando o valerato de sódio era adicionado no período de 36 h de ensaio apresentando valores de frações molares de 60 mol% de 3HV, 34 mol% para 3HV e 6 mol% de 3HHx (CHEE et al., 2012).

Neste trabalho, confirmou-se que as linhagens recombinantes LFM 344 pBBRMCS.2:: $phaC_{SCU63}$ e LFM 344 pBBRMCS.2:: $phaC_{SCU66}$ possuem a capacidade de produzir polímeros de PHA com composições diferenciadas quando são fornecias diferentes fontes de carbono.

6 CONCLUSÕES

Os isolados SCU 63 e SCU 66, são bactérias isoladas a partir de amostras de solo, que são capazes de produzir P(3HB) com altos teores de polímero que superam a microorganismos de referência como *Burkholderia sacchari* LFM 101.

Estes isolados foram identificados pela análise do gene 16S rDNA como pertencentes ao gênero *Burkholderia* sp. apresentando proximidade filogenética com pelo menos outros quatro isolados de área de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro.

A partir de resultados na detecção, identificação e a construção de uma árvore filogenética do gene *phaC* dos isolados SCU 63 e SCU 66, indicam fortemente que possuem uma PHA sintases da classe I, na qual o gene *phaC* está agrupado na forma do operon *phaCAB*.

A expressão dos genes dos isolados levou à produção de monômeros 3HB, 3HD e 3HDd em mutante de *Pseudomonas* sp. LFM 461 e P(3HB) em mutante de *Burkholderia sacchari* LFM 344, quando glicose (10 g/L) era fornecida como única fonte de carbono, por um período de 72 h.

Em experimentos fornecendo-se glicose (10 g/L) com ácido butírico e ácido octanóico (1g/L) foi detectado unicamente P(3HB), não gerando unidades 3HHx em linhagens recombinantes de *Burkholderia sacchari* LFM 344, abrigando os genes *phaC* dos isolados.

Quando foram usados ácidos graxos impares, propiônico, valérico e heptanóico como co-substratos, foi detectada a presença tanto de monômeros 3HB quanto de monômeros 3HV, obtendo maiores proporções deste monômero quando o ácido heptanóico foi suprido. No caso do ácido nonanóico não foi possível evidenciar a incorporação do monômero 3HV à cadeia principal do monômero.

As linhagens recombinantes de *B. sacchari* foram capazes de acumular P(3HB-*co*-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanóico com frações molares de 1,55 e 1,00 mol%, indicando que as PHA sintases dos isolados SCU 63 e SCU 66 permite a formação de PHA com teores combinados de 3HB e 3HHx.

Também foi evidenciada a produção do copolímero P(3HB-*co*-4HB) em ambas linhagens recombinantes com valores alto na fração molar de 4HB na linhagem recombinante LFM 344 pBBR1MCS-2::*phaC*_{SCU63} com uma fração molar de 14,01 mol% e também foi observado um alto teor de polímero total com um valor de 49,03% da massa seca celular.

A produção de terpolímeros P(3HB-co-3HV-co-3HHx) usando varias proporções de ácidos hexanóico e heptanóico como co-substratos foi evidencia em ambas linhagens recombinantes, confirmando que as PHA sintases são capazes de incorporar diferentes monômeros além do 3HB à cadeia principal do polímero, quando são usadas diferentes fontes de carbono como co-substratos.

REFERÊNCIAS¹

AHN, W. S; PARK, S. J.; LEE, S. Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 3624-3627, 2000.

AMARA, A. A.; REHM, B. H. Replacement of the catalytic nucleophile cysteine-296 by serine in class II polyhydroxyalkanoate synthase from Pseudomonas aeruginosa-mediated synthesis of a new polyester: identification of catalytic residues. **Biochem. J.**, v. 374, n. Pt 2, p. 413-421, 2003.

ASHBY, R. D.; SOLAIMAN, D. K. Y.; FOGLIA, T. A. The synthesis of short- and mediumchain-length poly(hydroxyalkanoate) mixtures from glucose- or alkanoic acid-grown *Pseudomonas oleovorans*. J. Ind. Micro. Biotech., v. 28, p. 147-153, 2002.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol. Rev.**, v. 54, p. 450–472, 1990.

BABEL, W.; STEINBÜCHEL, A. Biopolyesters. Berlin: Springer-Verlag, 2001. 342 p.

BAKER, G.; SMITH, J.; COWAN, D. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. J. Micro. Meth., v. 55, n. 3, p. 541-555, 2003.

BEEBY, M.; CHO, M.; STUBBE, J.; JENSEN, J. J. Growth and Localization of Polyhydroxybutyrate Granules in *Ralstonia eutropha*. J. Bacteriol., v. 194, n. 5, p. 1092-1099, 2012.

BHUBALAN, K.; LEE, W. H.; LOO, C. Y.; YAMAMOTO, T.; TSUGE, T.; DOI, Y.; SUDESH, K. Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxy-valerate-*co*-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palmkernel oil and 3HV-precursors. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 93, p.17–23, 2008.

BRÄMER, C. O.; SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; VANDAMME, P.; STEINBÜCHEL, A. *Burkholderia sacchari* sp. Nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar cane plantation in Brazil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 1709-1713, 2001.

BRÄMER, C. O.; SILVA, L. F.; GOMEZ, J. C. G.; PRIEFERT, H.; STEINBÜCHEL, A. Identification of the 2-methylcitrate pathway involved in the catabolism of propionate in the polyhydroxyalkanoate producting strain *Burkholderia sacchari* IPT 101 and analysis of a mutant accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate content. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 271-279, 2002.

BRUCE, THIAGO.; MARTINEZ, I. B.; NETO, O. M.; VICENTE, A. C. P.; KRUGER,

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

R. H.; THOMPSON, F. L. Bacterial Community Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Soils. **Microb. Ecol.**, v. 60, p. 840–849, 2010.

BONFIELD, J. K.; STADEN, R. Experiment files and their application during large-scale sequencing projects. **DNA. Seq.**, v. 6, n. 2, p. 109-117, 1996.

RANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(p-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible and biodegradable polyes- ters. **Adv. Biochem.Engin.Biotechnol**. v.41, p. 77-93, 1990.

BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: Technology and economics. **Trends. Biotechnol.**, v. 5, p. 246-250.

CASTANEDA, M.; GUZMAN, J.; MORENO, S.; ESPIN, G. The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. J. **Bacteriol.**, v. 182, p. 2624–2628, 2000.

CATALÁN, A. I.; FERREIRA, F.; GILLA, P. R.; BATISTA, S. Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the *lacZlacY* genes. **Enz. Micro. Techn.**, v. 40, p. 1352–1357, 2007.

CESÁRIO, T. M.; RAPOSO, R. S.; DE ALMEIDA, M. C. M. D.; KEULEN, F. V.; FERREIRA, B. S.; TELO, J. P.; DA FONSECA, M. M. R. Production of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate) by *Burkholderia sacchari* using wheat straw hydrolysates andgamma-butyrolactone. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. XX, p. 9, 2014.

CHANG, H. M.; WANG, Z. H.; LUO, H. N.; XU, M.; REN, X. Y.; ZHENG, G. X.; WU, B. J.; ZHANG, X. H.; LU, X. Y.; CHEN, F.; JING, X. H.; WANG, L. Poly(3-hydroxybutyrateco-3-hydroxyhexanoate)-based scaffolds for tissue engineering. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.47, n. 7, p. 533-539, 2014.

CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanaoates. J. Biosci. Bioeng., v. 110, n. 6, p. 621-632, 2010.

CHAUDHRY, N. W.; JAMIL, N.; ALI, I.; AYAZ, H. M.; HASNAIN, S. Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources. **Ann. Microbiol.**, v. 61, p. 623–629, 2011.

CHEE, J. Y.; LAU, N. S.; SAMIAN, M. R.; TSUGE, T.; SUDESH, K. Expression of *Areomonas caviae* polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Burkholdeia* sp. USM (JCM15050) enables the biosynthesis of SCL-MCL PHA from pal oil products. J. Appl. Microbiol., v.112, n. 1, p. 45-54, 2012.

CHEN, G. G. Q. **Plastics from Bacteria: natural functions and applications**. Berlin: Springer Science & Bussines Media, 2009. 450 p.

CHEN, Q.; LIANG, S.; THOUAS, G. A. Elastomeroc biomaterials for tissue engineering. **Prog. Polym. Sci.**, v. 38, p. 584-671, 2013.

CHEN, G. Q.; PATEL, M. K. Plastics derived from biological sources: present and future: a technical and environmental review. **Chem. Rev.**, v. 112, n. 4, p. 2082-2099, 2012.

CHO, M.; BRIGHAM, C. J.; SINSKEY, A. J.; STUBBE, J. Purification of polyhydrixybutyrate synthase from its native organism, *Ralstonia eutropha*: Implications for the initiation and elongation of polymer formation in vivo. **Biochemistry.**, v. 51, p. 2276-2288, 2012.

CLEMENTE, T.; SHAH, D.; TRAN, M.; STARK, D.; PADGETTE, S.; DENNIS, D.; BRUCKENER, K.; STEINBUCHEL, A.; MITSKY, T. Sequence of PHA synthase gene from two strains of *Rhodospirillum rubrum* and in vivo substrate specificity of four PHA synthases across two heterologous expression systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 420-429, 2000.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. **Environ. Microbiol.**, v. 5, n. 9, p. 719-729, 2003.

DENNIS, D.; MCCOY, M.; STANGL, A.; VALENTIN, H. E.; WU, Z. Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from Ralstonia eutropha. J. Biotechnol., v. 64, n. 2-3, p. 177-186, 1998.

DOI, Y. Microbial polyesters. New York: VCH Publishers, 1990. 166 p.

DOI, Y.; KUNIOKA, M.; NAKAMURA, Y.; SOGA, K. Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from ¹³C-labeled acetate and propionate. **Macromolecules.,** v. 20, p. 2988–2991, 1987.

DOI, Y.; TAMAKI, A.; KUNIOKA, M.; SOGA; K. Biosynthesis of terpolyesters of 3hydroxybutyrate, 3-hydroxyvalerate, and 5-hydroxyvalerate, in *Alcaligenes eutrophus* from 5chloropentanoic and pentanoic acids. **Makromol. Chem. Rapid Commun.,** v. 8, p. 631–635, 1987.

DOI, Y.; KUNIOKA, M.; NAKAMURA, Y.; SOGA, K. Nuclear magnetic resonance studies on unusual bacterial copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate. **Macromolecules.**, v. 21, p. 2722–2727, 1988.

EGGINK, G.; VAN DER WAL, H.; HUIJBERTS, G. N. M.; DE WAARD, P. Oleic acid as a substrate for poly-3- hydroxybutyrate formation in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas putida*, **Ind. Crops. Prod.**, v. 1, p. 157–163, 1993.

ELLAR, D.; LUNDGREN, D. G.; OKAMURA, K.; MARCHESSAULT, R. H. Morphology of Poly-β-hydroxybutyrate Granules. **J. Mol. Biol.**, v. 35, p. 489-502, 1968.

FIGUEIREDO, T. V. B.; CAMPOS, M. I.; SOUSA, J. R.; DRUZIAN, I. J. Produção E Caracterização De Polihidroxialcanoatos Obtidos Por Fermentação Da Glicerina Bruta Residual Do Biodiesel, **Quim. Nova.,** v. 37, n. 7, p. 1111-1117, 2014.

FILIPOV, M. C. O. Obtenção e caracterização de mutantes de *Burkholderia* sp. IPT 101 deficientes na síntese ou no reconsumo de poli-3-hidroxibutirato. 2000. 154 f (Mestrado

em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

FORMIGONI, A.; RODRIGUES, E. F. A Busca Pela Sustentabilidade Do PET, Através Da Sustentabilidade Da Cadeia De Suprimentos. International Workshop Advances in Cleaner Production. São Paulo, 2009. p. 1-10.

FOSTER, L. J. R.; ZERVAS, S. J.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. The biodegradation of poly-3-hydroxyalkanoates, PHAs, with long alkyl substituents by *Pseudomonas maculicola*. **Biodegradation**, v. 6, p. 67-73, 1995.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros Biodegradáveis – Uma Solução Parcial Para Diminuir A Quantidade Dos Resíduos Plásticos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

FUKUI, T.; DOI, Y. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxybexanoate) biosynthesis gene of *Aeromonas caviae*. J. Bacteriol., v. 179, p. 4821-4830, 1997.

FUKUI, T.; SHIOMI, N.; DOI, Y. Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 3, p. 667-673, 1998.

FUKUI, T.; ABE, H.; DOI, Y. Engineering of Ralstonia eutropha for production of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) from fructose and solid-state properties of the copolymer. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 618-624, 2002.

GAO, X.; CHEN, J. C.; WU, Q.; CHEN, G. Q. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 22, n.6, p. 768-774, 2011.

GAO, X.; YUAN, X. X.; SHI, Z. Y.; GUO, Y. Y.; SHEN, X. W.; CHEN, J. C.; WU, Q.; CHEN, G. Q. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by E. coli containing an optimized PHA synthase gene. **Microbial. Cell. Factories.**, v. 11, n. 130, p. 1-10, 2012.

GOMES, R. Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para o controle da composição monomérica. 2009. 100 f (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GOMEZ, J. G. C. **Isolamento e caracterização de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos**. 1994. 92 f (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

GOMEZ, J. G. C.; RODRIGUES, M. F. A.; ALLII, R. C. P.; TORRES, B. B.; BUENO NETTO, C. L.; OLIVEIRA, M. S.; SILVA, L. F. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 45, p. 785-791, 1996.

GOMEZ, J. G. C.; FONTOLAN, V.; ALLII, R. C. P.; RODRIGUES, M. F. A.; BUENO NETTO, C. L.; SILVA, L. F.; SIMÕES, D. A. Production of poly-3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate (P3HB-*co*-3HV) by soil isolated bacteria able to use sucrose. **Rev. Microbiol.**, v. 28, p. 43-48, 1997.

GOMEZ, J. G. C Produção por Pseudomonas sp de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: Avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes. 2000. 155 f (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

GOMEZ, J. G. C; BUENO, C. Produção de poliésteres bacterianos. In: LTDA, E. B. (Ed.). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, v.3 Procesos fermentativos e enzimáticos, 2001.

GRAGE, K.; JAHNS, A. C.; PARLANE, N.; PALANISAMY, R.; RASIAH, I. A.; ATWOOD, J. A.; REHM, B. H. A. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. **Biomacromolecules.**, v. 10, p. 660-669, 2009.

GRILLO, R.; PEREIRA, A.; MELO, N. F. S.; PORTO, R. M.; FEITOSA, L. O.; TONELLO, P. S.; FILHO, N. L. D.; ROSA, A. H.; LIMA, R.; FRACETO, L. F. Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: preparation, characterization and release kinetics in water. J. Hazard. Mater., v. 186, n. 2-3, p. 1645-1651, 2011.

GROSS, R. A.; BRANDL, H.; ULMER, H. W.; POSADA, M. A.; FULLER, R. C.; LENZ, R. W. The biosynthesis and characterization of new poly(P-hydroxyalkanoates). **Polymer. Prepr.**, v. 30, p. 492-493, 1989.

GUMEL, A. M.; ANNUAR, M. S. M.; CHISTI, Y. Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. **J Polym. Environ.**, v. 21, p. 580–605, 2013.

HANG, X.; ZHANG, G.; WANG, G.; ZHAO, X.; CHEN, G. PCR cloning of polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes from *Burkholderia caryophylli* and their functional expression in recombinant *Escherichia coli*. **FEMS. Microbiology. Letters.**, v. 210, p. 49-54, 2002.

HÄNGGI, U. J. Requirements on bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumer goods. **FEMS. Microbiol. Rev.**, v. 16, p. 213-220, 1995.

HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A. J.; CHU, L.; DAWES, E. A. Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS. Microbiol. Lett.,** v. 52, p. 91–96, 1988.

HENDERSON, R. A.; JONES, C. W. Poly-3-hydroxybutyrate production by washed cells of *Alcaligenes eutrophus*; purification, characterization and potential regulatory role of citrate synthase. **Arch. Microbiol.**, v. 168, p. 486–492, 1997.

HOFFMANN, N.; AMARA, A. A.; BEERMANN, B. B.; QI, Q.; HINZ, J.; REHM, B. H. A. Biochemical characterization of the Pseudomonas putida 3-hydroxyacyl ACP:CoA transacylase, which diverts intermediates of fatty acid de novo biosynthesis. **J Biol. Chem.**, v. 277, n. 45, p. 42926-42936, 2002.

HOLMES, P. A.; COLLINS, S. H.; WRIGHT, L. F. **3-Hydroxybutyrate Polymers**. U.S. patent 4,477,654, 1984.

HUIJBERTS, G. N. M.; DE RIJK, T. C.; DE WAARD, P.; EGGINK, G. ¹³C Nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. **J. Bacteriol.**, v. 176, p.1661–1666, 1995.

HUSCHNER, F.; GROUSSEAU, E.; BRIGHAM, C. J.; PLASSMEIER, J.; POPOVICB, M.; RHA, C.; SINSKEY, A. J. Development of a feeding strategy for high cell and PHA densityfed-batch fermentation of *Ralstonia eutropha* H16 from organic acidsand their salts. **Process. Biochemestry.**, v. XX, p. 8, 2014.

IQBALA, N. M. D.; AMIRUL, A. A. Synthesis of P(3HB-*co*-4HB) copolymer with targetspecific 4HB molar fractions using combinations of carbon substrates. J Chem. Technol. Biotechnol., v. 89, p. 407–418, 2014.

JENDROSSEK, D.; HANDRICK, R. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 56, p. 403-432, 2002.

JUNG, Y. M.; PARK, J. S.; LEE, Y. H. Metabolic engineering of *Alcaligenes eutrophus* through the transformation of cloned *phaCAB* genes for the investigation of the regulatory mechanism of polyhydroxyalkanoate biosynthesis. **Enzyme. Microb. Technol.**, v. 26, p. 201–208, 2000.

KANG, C. K.; LEE, H. S.; KIM, J. H. Accumulation of PHA and its copolyesters by *Methylobacterium* sp. KCTC 0048. **Biotechnol. Lett.**, v. 15, p. 1017–1020, 1993.

KESSLER, B.; WITHOLT, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 97–104, 2001.

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

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) having a high hydroxyvalerate content with valeric acid feeding. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., v. 34, p. 457–461, 2007.

KIM, B. S.; LEE, S. C; LEE, S.Y; CHANG, H. N.; CHANG, Y. K.; WOO, S. I. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of Alcaligenes eutrophus with glucose concentration control. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 43, n. 9, p. 892-898, 1994.

KIM, D. Y.; RHEE, Y. H. Biodegradation of microbial and synthetic polyesters by fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 61, p. 300-308, 2003.

KIM, J. H; KIM, B. G; CHOI, C. Y. Effect of propionic acid on Poly (beta-hydroxybutyric*co*-beta-hydroxyvaleric) acid production by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnol. Lett.,** v. 14, p. 903–906, 1992.

KOVACH, M. E.; ELZER, P. H.; HILL, D. S.; ROBERTSON, G. T.; FARRIS, M. A.; ROOP, R. M.; PETERSON, K. M. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **Gene.**, v. 166, n. 1, p. 175-176, 1995.

KUNIOKA, M.; NAKAMURA, Y.; DOI, Y. New bacterial copolyesters produced in *Alcaligenes eutrophus* from organic acids. **Polym. Commun.**, v. 29, p. 174–176, 1989.

LAFFERETY, R. M.; KORSATKO, B.; KORSATKO, W. **Microbial production of poly-β-hydroxybutyric acid.** In: RHEM, H. J.; REED, G. (ends) Biotechnology. Weinheim: VCH, 1988. v. 6b, p. 136-176.

LANGENBACH, S.; REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Functional expression of the PHA synthase gene PhaC1 from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 150, p. 303–309, 1997.

LAU, N. S.; CHEE, J. Y.; TSUGE, T.; SUDESH, K. Biosynthesis and mobilization of a novel polyhydroxyalkanoate containing 3-hydroxy-4-methylvalerate monomer produced by *Burkholderia* sp. USM (JCM15050). **Bioresour. Technol.,** v. 101, n. 20, p. 7916-7923, 2010.

LAU, N. S.; SUDESH, K. Revelation of the ability of *Burkholderia* sp. USM (JCM 15050) PHA synthase to polymerize 4-hydroxybutyrate monomer. **AMB. Express.**, v. 2, n.41, p. 2-9, 2012.

LAYCOCK, B.; HALLEY, P.; PRATT, S.; WERKER, A.; LANT, P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science.,** v. 38, p. 536-583, 2013.

LEAF, T. A.; SRIENC, F. Metabolic modeling of polyhydroxybutyrate biosynthesis. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 57, p. 557–570, 1998.

LEE, H. J.; CHOI, M. H.; KIM, T. U.; YOON, S. C. Accumulation of polyhydroxyalkanoic acid containing large amounts of unsaturated monomers in *Pseudomonas fluorescens* BM07 utilizing saccharidesand its inhibition by 2-bromooctanoic acid. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 4963-4974, 2001.

LEE, I. Y.; KIM, M. K.; CHANG, H. N., PARK, Y. H. Regulation of poly-betahydroxybutyrate biosynthesis by nicotinamide nucleotide in *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS**. **Microbiol. Lett.**, v. 131, p. 35–39, 1995.

LEE, M. Y; PARK, W. H. Preparation of bacterial copolyesters with improved hydrophylicity by carboxilation. **Macromol. Chem. Phys.,** v. 201, p. 2771-2774, 2000. 1v.

LEE, S. Y.; CHOI, J. I. Production of microbial polyester by fermentation of recombinant microorganisms. Adv. Biochem. Eng. Biotecnhol., v. 71, p. 183-207, 2001.

LEE, W. H.; LOO, C. Y.; NOMURA, C. T.; SUDESH, K. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. **Bioresour. Technol.**, v. 99, n. 15, p. 6844-6851, 2008.

LENZ, R. W.; MARCHESSAULT, R. H. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegrabable plastics and biotechnology. **Biomacromolecules.**, v. 6, p. 1-7, 2005.

LIEBERGESELL, M.; SCHMIDT, B. ; STEINBÜCHEL, A. Isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in Chromatium vinosum D. **FEMS. Microbiol. Lett.,** v. 78, n. 2-3, p. 227-32, 1992.

LÍCIO, D.; GOMEZ, J. G.C.; SILVA, L. F. Avaliação da produção de PHA por linhagens bacterianas isoladas de amostra de lodo de esgoto. SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 17., 2-5 ago. 2009, Natal. **Anais...**Natal- RN: UFRN, 2009.

LÍCIO, D. Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos e caracterização molecular de sua PHA sintase. 2011.(Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LOPES, M. S. G.; GOMEZ, J. G. C.; TACIRO, M. K.; MENDONÇA, T. T.; SILVA, L. F. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and simultaneous remotion of organic inhibitors from sugarcane bagasse hydrolysate by *Burkholderia* sp. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., v. 41, p.1353–1363, 2014.

LOPEZ, N. I.; PETTINARI, J. M.; MENDEZ, B. S. Detection of reserve polymer synthesis genes in natural bacterial populations. **FEMS. Microbiology. Ecology.**, v. 22, p. 129-136, 1997.

LU, X. Y.; WU, Q.; CHEN, G. Q. Production of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) with flexible 3-hydroxyhexanoate content in *Aeromonas hydrophila* CGMCC 0911. **App. Microbiol. Biotechnol.,** v. 64, p. 41-45, 2004.

LUO, R.; CHEN, J.; ZHANG, L.; CHEN, G. Polyhydroxyalkanoate copolyesters produced by *Ralstonia eutropha* P3HB–4 harboring a low-substrate-specificity PHA synthase PhaC2_{Ps} from *Pseudomonas stutzeri* 1317. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 218–225, 2005.

LUTZ, S.; BORNSCHEUER, U. T. **Protein Engineering Handbook.** Alemanha: Protein Engineering Handbook, 2012.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. **Micro. Mol. Bio. R.**, v. 63, n. 1, p. 21-53, 1999.

MATAVULJ, M.; MOLITORIS, H. P. Fungal degradation of polyhydroxyalkanoates and a semiquantitative assay for screening their degradation by terrestrial fungi. **FEMS. Micriobiol. Rev.**, v. 9, p. 323-331, 1992.

MATSUDA, T. S.; SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; PRADELLA, J. G. C. Produção de PHA em *Aeromonas* isoladas de lodo de esgoto. CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador/BA.

MATSUMOTO, K.; KEI, K.; JO, S. J.; SONG, Y.; TAGUCHI, S. Production of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* using propionate as a precursor. **J. Bio.**, v. 152, p. 144-146, 2011.

MATSUSAKI, H.; MANJI, S.; TAGUCHI, K.; KATO, M.; FUKUI, T.; DOI, Y. Cloning and molecular analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in Pseudomonas sp. strain 61-3. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 24, p. 6459-6467, 1998.

MCCOOL, G. J.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. J. Bacteriol., v. 181, p. 585–592, 1999.

MCCOOL, G. J.; CANNON, M. C. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in Bacillus megaterium. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 14, p. 4235-4243, 2001.

MENDONÇA, T. T. Avaliação do potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolimero biodegradavel Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) P(3HB-co-3HHx). 2009.(Mestrado em Biotecnologia). - Instituto de Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MENDONÇA, T. T.; GOMEZ, J. G.; BUFFONI, E.; SÁNCHEZ, R. J.; SCHRIPSEMA, J.; LOPEZ, M. C. G.; SILVA, L. Exploring the potential of Burkholderia sacchari to produce polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v.116, p. 815-829, 2013.

MICHELIN-RAMOS, M. E. Caracterização de linhagens bacterianas para a produçao de poli-3-hidroxibutiraro (P3HB) a partir de hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar. 2003. 93. Tese- Instituto de ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

MILLER, S. C.; LIPUMA, J. J.; PARKE, J. L. Culture-based and non-growth-dependent detection of the Burkholderia cepacia complex in soil environments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 8, p. 3750-3758, 2002.

MIYAMOTO, C. M.; SUN, W. Q.; MEIGHEN, E. A. The LuxR regulator protein controls synthesis of polyhydroxybutyrate in *Vibrio harveyi*. **BBA. Protein. Struct. Mol. Enzym.**, v. 1384, p. 356–364, 1998.

NAIK, S.; GOPAL, V.; SOMAL, P. Bioproduction of polyhydroxyalkanoates from bacteria: A metabolic approach. **World. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, p. 2307–2314, 2008.

NODA, I.; SATKOWSKI, M. M.; DOWREY, A. E.; MARCOTT, C. Polymer alloys of Nodax copolymers and poly(lactic acid). **Macromol. Biosci.,** v.4, n. 3, p. 269-75, 2004.

OEDING, V.; SCHLEGEL, H. β -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H-16 and its significance in the regulatio of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. **Biochem. J.**, v. 134, p. 239-248, 1973.

PARK, J. S.; HUH, T. L.; LEE, Y. H. Characteristics of cell growth and poly-β-hydroxybutyrate biosynthesis of *Alcaligenes eutrophus* transformants harboring cloned *phaCAB* genes. **Enzyme. Microb. Technol.**, v. 21, p. 85-90, 1997.

PARK, J. S.; LEE, Y. H. Metabolic characteristics of isocitrate dehydrogenase leaky mutant of *Alcaligenes eutrophus* and its utilization for poly-beta-hydroxybutyrate production. J. Ferment. Bioeng., v. 81, p. 197–205, 1996.

PARK, J. S.; AHN, W. S.; GREEN, P. R.; LEE, S. Y. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxybaterate-*co*-3-hydroxybexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 74, p. 81-86, 2001.

PAN, W.; PERROTTA, J. A.; STIPANOVIC, A. J.; NOMURA, C. T.; NAKAS, J. P. Production of polyhydroxyalkanoates by Burkholderia cepacia ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 39, n. 3, p. 459-469, 2012.

PEREIRA, E. M.; SILVA, Q. S. R.; GOMEZ, C. J. G.; SILVA, L. F. Disruption of the 2methylcitric acid cycle and evaluation of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate biosynthesis suggest alternate catabolic pathways of propionate in *Burkholderia sacchari*. **Can. J. Microbiol.**, v.55, n. 6, p. 688-697, 2009.

PEOPLES, O. P.; SINSKEY, A. J. Poly-beta-hydroxybutyrate (P3HB) biosynthesis in Alcaligenes eutrophus H16. Identification and characterization of the P(3HB) polymerase gene (*phaC*). J. Biol. Chem., v. 264, n. 26, p. 15298-15303, 1989.

PRADELLA, J.G.C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos.** Relatório técnico n. 84396-205. Centro de Tecnologia de Processos e Produtos. Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP. São Paulo, 2006.

PRIETO, M. A. From Oil to Bioplastics, a Dream Come True?. Journal Of Bacteriology, v. 189, n. 2, p. 289–290, 2007.

PROSSER, J. Molecular and functional diversity in soil microorganisms. Plant and Soil, v. 244, n. 1-2, p. 9-17, 2002.

QIU, Y. Z.; OUYANG, S. P.; SHEN, Z.; WU, Q.; CHEN, G. Q. Metabolic Engineering for the Production of Copolyesters Consisting of 3-Hydroxybutyrate and 3-Hydroxyhexanoate by *Aeromonas hydrophila*. **Macromol. Biosci.,** v. 4, p. 255-261, 2004.

QU, X. H.; WU, Q.; LIAN, J.; ZOU, B.; CHEN, G. Q. Effect of 3-hydroxyhexanoate content in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on *in vitro* growth and differentiation of smooth muscle cells. **Biomaterials.**, v. 27, p. 2944 - 2950, 2006.

RAI, R.; KESHAVARZ, T.; ROETHER, J. A.; BOCCACCINI, A. R.; ROY, I. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. **Mat. Sci. Eng. R.**, v. 72, p. 29 - 47, 2011.

RAMSAY, B. A.; JULIANA, A.; COOPER, D. G. Production of Poly-3-Hydroxyalkanoic Acid by *Pseudomonas cepacia*. **App. Env. Micro**., v. 55, p. 584-589, 1989.
RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBE, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J. A. Production of poly(β -hydroxybutyric-*co*- β -hydroxyvaleric) acids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2093-2098, 1990.

ROMO, D. M. R.; GROSSO, M. V. N.; SOLANO, C. M.; CASTAÑO, D. M. A most effective method for selecting a broad range of short and medium- chain-length polyhidroxyalcanoate producing microorganisms. **Elec. J. Biot.**, v.10, n. 3, 2007.

REDDY, C. S.; GHAI, R.; RASHMI, K. V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bio.** Tech., v. 87, p. 137-146, 2003.

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

REHM, B. H. Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases. **Biotechnol. Lett.**, v. 28, n. 4, p. 207-213, 2006.

REN, Q. Biosynthesis of medium chain length poly-3-hydroxyalkanoates: from *Pseudomonas* to *Escherichia coli*. 1997. (PhD Thesis). ETH Zürich, Switzerland.

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, n. 0021-9673, p. 285-289, 1988.

RODRIGUES, M. F.; VICENTE, E. J.; STEINBÜCHEL, A. Studies on polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation in a PHA synthase I-negative mutant of Burkholderia cepacia generated by homogenotization. **FEMS. Microbiol. Lett.,** v. 193, n. 1, p. 179 -185, 2000.

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

SCHEMBRI, M. A.; BAYLY, R. C.; DAVIES, J. K. Phosphate concentration regulates transcription of the *Acinetobacter* polyhydroxyalkanoic acid biosynthetic genes. J. Bacteriol., v. 177, p. 4501–4507, 1995.

SCHLEGEL, H. G.; LAFFERTY, R.; KRAUSS, I. The isolation of mutants not accumulating poly-beta-hydroxybutyric acid. **Arch. Mikrobiol.**, v. 71, n. 3, p. 283-294, 1970.

SCHUBERT, P.; STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H. G. Cloning of the Alcaligenes eutrophus genes for synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in Escherichia coli. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 5837 – 5847, 1988.

SENIOR, P. J.; DAWES, E. A. P3HB-biosynthesis and regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Biochem. J.**, v. 134, p. 225–238, 1971.

SHEN, L.; HAUFE, J.; PATEL, M. K. **Product overview and market projection of emerging bio-based plastics (PRO-BIP 2009)**. Universiteit Utrech. The Netherlands, p. 226, 2009.

SHEU, D. S.; WANG, Y. T.; LEE, C. Y. Rapid Detection Of Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Bacteria Isolated From The Environment By Colony Pcr. **Microbiology**, v. 146, p. 2019-2025, 2000.

SHIN, H. D.; LEE, J. N.; LEE, Y. H. In vivo blending of medium chain length polyhydroxyalkanoates and polyhydroxybutyrate using recombinant *Pseudomonas putida* harboring *phaCAB* operon of *Ralstonia eutropha*. **Biotechnology Letters**, v. 24, p.1729–1735, 2002.

SILVA, L. F. Estudo do catabolismo de propionato em *Burkholderia* sp visando o aumento da eficiência na produção de poli-3-hisroxibutirato-*co*-3hidroxivalerato (P3HB-*co*-3HV) - um plástico biodegradável [Dissertação]. São Paulo: Programa de doutorado em Microbiologia apresentada ao ICB USP; 1998.

SILVA, L.; GOMEZ, J. G.; OLIVEIRA, M. S.; TORRES, B. B. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate (P3HB-*co*-3HV) production by *Burkholderia* sp. **Journal of Biotechnology**, v. 76, p. 165–174, 2000.

SILVA, L.; GOMEZ, J. G.; COSTA, R.; KEICO, M.; PRADELLA, J. G. Produção Biotecnológica De Poli-Hidroxialcanoatos Para A Geração De Polímeros Biodegradáveis No Brasil. **Quim. Nova.,** v. 30 No. 7, p. 1732-1743, 2007.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PUHLER, A. A Broad Host Range Mobilization System For Invivo Genetic-Engineering - Transposon Mutagenesis In Gram-Negative Bacteria. **Bio-Technology.**, v. 1, n. 9, p. 784-791, 1983.

SLATER, S. C.; VOIGE, W. H.; DENNIS, D. E. Cloning and expression in Escherichia coli of the Alcaligenes eutrophus H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. J. Bacteriol., v. 170, n. 10, p. 4431-446, 1988.

SLATER, S. C.; GALLAHER, T.; DENNIS, D. Production of poly-(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 58, p. 1089-1094, 1992.

SPIEKERMANN, P.; BERND, H. A.; REHM, R. K.; BAUMEISTER, D.; STEINBÜCHEL, A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. **Arch. Microbiol.**, v. 171, p. 73–80, 1999.

SQUIO, C. R.; FALCÃO, G. M. Estratégias De Cultivo Para Produção Dos Plásticos Biodegradáveis Poli(3- Hidroxibutirato) E Poli(3-Hidroxibutirato-Co-3-Hidroxivalerato) Por Bactérias. **Quim. Nova.,** v. 27, No. 4, p. 615-622, 2004.

STACKEBRANDT, E. A. G., MICHAEL. 16S/23S rRNA Sequencing. In: LTD, J. W. A. S. (Ed.). Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. New York, NY, USA, 1991. p.115-175.

STEINBÜCHEL, A.; HEIN, S. Biochemical and Molecular Basis of Microbial Synthesis of Polyhydroxyalkanoates in Microorganisms. Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology., v. 71, p. 82-119, 2001.

STUBBE, J.; TIAN, J.; HE, A.; SINKEY, A. J.; LAWRENCE, A. G.; LIU, P. Nontemplate-Dependent polymerization processes: Polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 74, p. 433-480, 2005.

SUN, Z.; RAMSAY, J. A.; GUAY, M.; RAMSAY, B. Increasing the yield of MCL-PHA from nonanoic acid by co-feedingglucose during the PHA accumulation stage in two-stage fed-batchfermentations of *Pseudomonas putida* KT2440. J. Bio., v. 132, p. 280–282, 2007.

SURIYAMONGKOL, P., WESWLAKE, R., SURESH, N., MOLONEY, M., S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review. **Bio. Adv.,** v. 25, p. 148-175, 2007.

TAGUCHI, S. A. B.; NAKAMURAC, H.; KICHISE, T. A.; TSUGE, T. D.; YAMATO, I. C.; DOI, Y. Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) from renewable carbon sources in recombinant *Ralstonia eutropha* using mutants of original PHA synthase. **Bio. Eng. J.**, v. 16, p. 107–113, 2003.

TAN, G. Y. A.; CHEN, C. L.; LI, L.; GE, L.; WANG, L.; RAZAAD, I. M. N.; LI, Y.; ZHAO, L.; MO, Y.; WANG, J. Y. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. **Polymers.**, v. 6, p. 706-754, 2014.

TAPPEL, R. C.; KUCHARSKI, J. M.; MASTROIANNI, J. M.; STIPANOVIC, A. J.; NOMURA, C. T. Biosynthesis of Poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] Copolymers with Controlled Repeating Unit Compositions and Physical Properties. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 2964–2972, 2012.

TIAN, J.; SINSKEY, A. J.; STUBBE, J. Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in Wautersia eutropha H16 by transmission electron microscopy. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 11, p. 3814-3824, 2005.

TIMM, A.; BYROM, D.; STEINBUCHEL. Formation of blends of various poly(3-hydroxyalkanoic acids) by a recombinant strain of *Pseudomonas oleovorans*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 33, p. 296-301, 1990.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B. P. Degradation of microbial polyesters. **Biotechnol. Lett.,** v. 26, p. 1181-1189, 2004.

TRIPATHI, L.; WU, L. P.; DECHUAN, M.; CHEN, J.; WU, Q.; CHEN, G. Q. *Pseudomonas putida* KT2442 as a platform for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with adjustable monomer contents and compositions. **Bioresource Technology**, v.142, p. 225–231, 2013.

TZU, H. Y.; CHEN, P. L.; SEMBLANTE, G. U.; YOU, S. J. Detection of Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Bacteria from Domestic Wastewater Treatment Plant Using Highly Sensitive PCR Primers. J. Microbiol. Biotechnol., v. 22, n. 8, p. 1141–1147, 2012.

UEDA, S.; MATSUMOTO, S.; TAKAGI, A.; YAMANE, T. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from methanol and n-amyl alcohol by the methylotrophic bacteria *Paracoccus denitrificans* and *Methylobacterium extorquens*. Appl. Environ. Microbiol., v. 58, p. 3574–3579, 1992.

ULMER, H. W.; GROSS, R. A.; WEISBACH, P.; FULLER, R. C.; LENZ, R. W. The bacterial synthesis of functional poly(b-hydroxyalkanoate). **Polymer. Prep.**, v. 30, n. 2, p. 402-407, 1989.

URTUVIA, V.; VILLEGAS, P.; GONZÁLEZ, M.; SEEGER, M. Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 70, p. 208–213, 2014.

VANZIN, C. Estudo da biossintese de poli-3-hisroxiburitato-co-hidroxialcanoatos de cadeia média (P3HB-co-3HAmcl) a partir de ácidos graxos livres e óleo vegetal. 2008. 202 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

WANG, Y.; YIN, J.; CHEN, G. Q. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 30, p. 59-65, 2014.

WEI, X.; HU, Y. J.; XIE, W. P.; LIN, R. L.; CHEN, G. Q. Influence of poly(3-hydroxybutirate-*co*-4-hydroxybutirate-*co*-3-hydroxyhexanoate) on growth and osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. J. Biomed. Mater. **Res. A.**, v. 90, p. 894-895, 2009.

WILLIAMS, S. F.; MARTIN, D. P. Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHA) in Medicine and Pharmacy. In: WILEY-VCH. (Ed.). **Polyesters III - Applications and Commercial Products,** v.4, 2005. p. 91-128.

WITT, U.; EINING, T.; YAMAMOTO, M.; KLEEBERG, I.; DECKWER, W. D.; MÜLLER, R. J. Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: Evaluation of the final biodegradability and ecotoxilogical impact of degradation intermediates. **Chemosphere.**, v. 44, p. 289-299, 2001.

YAGI, K.; MIYAWAKI, I.; KAYASHITA, A.; KONDO, M.; KITANO, Y.; MURAKAMI, Y.; MAEDA, I.; UMEDA, F.; MIURA, Y.; KAWASE, M.; MIZOGUCHI, T. Biosynthesis of poly(3-hydroxyalkanoic acid) copolymer from CO₂ in *Pseudomonas acidophila* through introduction of the DNA fragment responsible for chemolithoautotrophic growth of *Alcaligenes hydrogenophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p.1004-1007, 1996.

YOO, S.; KIM, W. S. Cybernetic model for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid in *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 43, p. 1043–1051, 1994.

YU, J.; SI, Y.; KEUNG, W.; WONG, R. Kinetics modeling of inhibition and utilization of mixed volatile fatty acids in the formation of polyhydroxyalkanoates by *Ralstonia eutropha*. **Process. Biochem.**, v. 37, p. 731-738, 2002.

ZHANG, X.; WEI, C.; HE, Q.; REN, Y. Enrichment of chlorobenzene and onitrochlorobenzene on biomimetic adsorbent prepared by poly-3-hydroxybutyrate (P3HB). **J Hazard. Mater.,** v. 177, n. 1-3, p. 508-515, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Perfil eletroforético em gel de agarose 1% (m/v), resultante da amplificação por PCR usando os oligonucleotídeos 27F e 1401R



Linha 1: Padraõ 1 Kb *DNA Ladder* Plus (Fermentas) λ *Hind III*, Linha 2: SCU 63, Linha 3: SCU 63, Linha 4: SCU 66. Linha 5: SCU 66.

APÊNDICE B- Análise BLASTn das sequências consenso pertencentes ao gene 16S rDNA dos isolados SCU 63 e SCU 66





APÊNDICE C- Alinhamento múltiplo das sequências dos genes *phaC* de quatro linhagens com organização *phaCAB* e posição dos oligonucleotídeos desenhados phaC F e phaC R.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	AGACGCCTCTCCAGAGCATGACGGCCCGGCTCGCAACCGGCACGCGCGCG	60 60 60 60
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	TTTCACGATTGACGCTCACGAATCACCGGTAACGCAGGTAATGACAGCATCGAAAAATTC TTTCACGATTGACGCTCACGAATCACCGGTAACGCAGGTAATGACAGCATCGAAAAATTC TTTCACGATTGACGCTCACGAATCACCGGTAACGCAGGTAATGACAGCATCGAAAAATTC TTTCGCGATTGACGCTCACGAATCACCGGTAACGCAGGTAATGACAGCATCGAAAAATTC ****	120 120 120 120
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	GTCGACGTCCGCTCAGGCGGGCACTTTCGCGGGCAGCACCGGATTCGATCCGGCCGCACA GTCGACGTCCGCGCATGCGGGCACTTCCGCGGGCAGCACCGGTTTCGATCCGGCCGCCCA GTCGACGTCCGCTCAGGCGGGCACTTCCGCGGGCAGTACGGGCTTCGATCAGGCTGCCCA GTCGACGTCCGCTGCGGCGGGCACTTCCGCGGGCAATACGGGATTCGGTTCCGCCGCGCA ***********	180 180 180 180
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	GCCGATGCAGCAGATGTTCGAGGCGTGGCTGAACGCATGGCGCGGGTTTCGCTGATCCGGC GCCGATGCAGCAGATGTTCGAGTCGTGGTTGAACGCGTGGCGCGGGTTTTGCAGATCCGGC GCCGATGCAGCAGATGTTCGAGTCGTGGTTGAATGCATGGCGCGGGTTTTGCCGATCCGGC GCCGATGCAGCAGATGTTCGAAGCTTGGCTGAATGCATGGCGCGCGATTTTGCCGATCCGGC *********	240 240 240 240
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	CCGCGCCGCGACGGCAGCGACCACGGCCAACCCGTTCGCCGCATTCCAGTTCCCGAAGTC GCGCGCCGCGACGGCATCGGCCTCCGTCAATCCGTTCGCGACATTCCAGTTCCCGACGTC GCGCGCGGCCACCGCGGCGAGCGCGGCGAATCCGTTCGCCGCATTCCAGTTCCCGAAGTC GCGTGCCGCGACTGCGTCGCCCGCCGTCAATCCGTTCGCTTCGTTCCCAGTTTCCGAAGTC ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **	300 300 300 300
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	GTTTCCGTTCCAGATGCCGTCGATGCCCGACCTGGGGGGGG	360 351 360 351
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	GTTCGCGGGGCTGAAGTTGCCGGTTGCCGCGATCCCGCCCG	420 411 420 411

Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	GGCCGACTATGCGCGCGACTGTGTGTACGCTGATGCAGCAGGCCGCCGCCGCGAAGCTCGA GGCCGACTACGCACGCGGATTGCATGACGCTGATGCAGCAGGCGGCCGCCGCGAAGCTCGA GGCCGACTACGCGCGCGACTGCATCACGCTGATGCAGCAGGCGGCGCCGCGCGAAGCTCGA GGCCGACTATGCGCCGCGACTGCGTCGCGCCGCAGCGAGGCGCCGCAGCGAAGCTCGA ********* ** ***** ** ***************	480 471 480 471
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	GTCGCCGGAACTGAAGGACCGCCGCGTTCAGCGCGGACGCCTGGAAGGCGTCGCCTGCGCA GTCGCCGGAGCTGAAGGACCGCCGCCTTCAGCGGCGACGCATGGAAGGCGTCCCCCGCGCA ATCTCCCGAGTTGAAAGACCGCCGCTTCAGCGGCGACGCATGGAAGGCGTCGCCGCGCA GGCTCCCGAGCTGAAGGATCGGCGCCTTCAGCGGCGACGCATGGAAGGCATCGCCGGCCCA * ** ** ***************************	540 531 540 531
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	TGCGTTCGCGGCTGCGTGGTACCTGCTCAACGCGCGCTACCTGCAGGAACTGGCCGACGC TGCGTTCGCGGCCGCCTGGTATCTGCTCAACGCGCGCCTATCTGCAGGAGCTGGCCGACGC CGCGTTCGCGGCGGCGTGGTATCTGCTCAATGCGCGTTATCTGCAGGAGCTGGCCGACGC TGCATTCGCGGCCGCGTGGTATCTGCTCAATGCACGTTATCTGCAGGAACTCGCCGACGC ** ******* ** ***** ** ****** ** ** **	600 591 600 591
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	GCTCGAGACTGATCCGAAGACGCGCGCGCGCGCGCCCCGTTTCTCGGTCCAGCAATGGACGGC GCTTCAGACCGATCCGAAGACGCGTGAGCGCATCCGTTTCACGGTCCAGCAATGGACGGC GCTCGAGACCGATCCGAAAACGCGCGGAGCGCATCCGTTTCGCCGGTCCAGCAATGGACGGC GCTCGAGACCGATCCGAAAACGCGCGGAGCGCATCCGTTTCGCCGTGCAGCAGTGGACGGC *** **** ******** ***** ***********	660 651 660 651
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	CGCCGCCGCGCCGAGCAACTTCCTCGCGCTCAACCCCGATGCGCAGAAGTCGATCCTTGA CGCCGCCGCGCCG	720 711 720 711
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	AACGCAGGGCGAAAGCCTGCGGCAGGGGATGATGAACCTGCTCGGCGACCTGCAGCGCGG GACGCAGGGCGAAAGCCTGCGGCAGGGGATGATGAACCTGCTCGGCGACCTGCAGCGCGG CACACAGGGCGAAAGTCTGCGTCAGGGGATGATGAATCTGCTCGGCGACATGCAGCGCGG AACGCAGGGCGAAAGCCTGCGGCAGGGGATGATGAACCTGCTGGGGCGATCTGCAGCGCGG ** *****	780 771 780 771
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	CAAGATTTCGCAGACCGATGAATCGCAATTCGTGGTCGGCAAGAACCTCGGGTGCACCGA CAAGATTTCGCAGACCGACGAATCGCAGTTCGTGGTCGGCAAGAACCTCGGATGTACCGA CAAGATCTCCCCAGACCGACGAATCGCAGTTCGTGGTCGGCAAGAATCTCGGCTGCACCGA CAAGATTTCGCAGACCGACGAATCGCAGTTCGTCGTCGTCGGCAAGAACCTCGGGTGCACCGA ****** ** ******** ******* ****** ******	840 831 840 831

Bcepacia	AGGCTCGGTCGTCTACGAGAACGACCTGATCCAGCTGATCCAGTACACGCCGAAGACGGA	900
Bcenocepacia	AGGCTCGGTCGTGTACGAGAACGACCTGATCCAGCTGATCCAGTACACGCCGAAGACGGA	891
Bvietnamesis	AGGCGCGGTGGTCTACGAGAACGACCTGATCCAGCTGATCCAGTACAACGCGAAGGCGGA	900
Bmultivorans	AGGCGCGGTCGTCTACGAGAACGACCTGATCCAGCTGATCCAGTACACGCCGAAGACCGC **** **** ** ** *******************	891
Bcepacia	CAAGGTGTTCGAGCGGCCGCTGCTGATCGTGCCGCCGTGCATCAACAAGTTCTACATCCT	960
Bcenocepacia	CAAGGTGTTCGAGCGGCCGTTGCTGATCGTCCCGCCGTGCATCAACAAGTTCTACATCCT	951
Bvietnamesis	CAAGGTATTCGAGCGGCCGTTGCTGATCGTGCCGCCGTGCATCAACAAGTTCTACATCCT	960
Bmultivorans	GAAGGTGTTCGAGCGGCCGCTGCTGATCGTGCCGCCGTGTATCAACAAGTTCTACATCCT ***** *********** ******** **********	951
Bcepacia	CGACCTGCAGCCCGAGAACTCGCTCGTCGCGCATGCGCTGTCGAACGGCCATCAGGTGTT	1020
Bcenocepacia	CGACCTGCAGCCGGAGAATTCGCTCGTCGCGCACGCGCTGTCGAACGGTCATCAGGTGTT	1011
Bvietnamesis	CGACCTGCAGCCCGAGAACTCGCTCGTCGCGCATGCGCTGTCGAGCGGCCACCAGGTGTT	1020
Bmultivorans	CGATCTGCAGCCCGAGAACTCGCTCGTCGCGCACGCGGTATCGAGCGGCCATCAGGTGTT	1011
	*** ******* ***** *********************	
Bcepacia	CCTCGTGTCGTGGCGCAACGCCGATGCGTCGGTCGCGCACAAGACGTGGGACGACTACAT	1080
Bcenocepacia	CCTCGTGTCGTGGCGCAACGCGGATGCATCGGTCGCGCACAAGACGTGGGACGACTACAT	1071
Bvietnamesis	CCTCGTGTCGTGGCGCAACGCCGATGCGTCGGTTGCGCACAAGACCTGGGACGACTACAT	1080
Bmultivorans	TCTCGTGTCGTGGCGCAATGCCGATGCGTCGGCGCACAAGACGTGGGACGACTACAT	1071
	*************** ** ***** ** ***** ******	
Bcepacia	GAACGAAGGGCTGCTCGCGGCGATCGACGCCGTGCAGCAGGTCAGCGGCCGCGAGCAGAT	1140
Bcenocepacia	GAACGAAGGGCTGCTCGCGGCGATCGACGCGGTGCAGCAGATCAGCGGCCGCGAGCAGAT	1131
Bvietnamesis	GAACGAAGGGCTGCTCGCGGCGATCGACGCCGTGCAGCAGGTGAGCGGCCGCGAGCAGAT	1140
Bmultivorans	GAACGAAGGGCTGCTCGCCGCGATCGACGCCGTGCAGCAGGTGAGCGGGCGCGAACAGAT	1131
	****************** ********************	
Bcepacia	CAATGCGCTCGGCTTCTGCGTCGGCGGCACGATGCTCGCGACTGCGCTGGCGGTGCTCGC	1200
Bcenocepacia	CAACACGCTCGGCTTCTGCGTCGGCGGCACGATGCTCGCGACCGCGCTCGCGGTGCTCGC	1191
Bvietnamesis	CAACACGCTCGGCTTCTGCGTCGGCGGCACGATGCTCGCGACGGCGCTGGCGGTGCTCGC	1200
Bmultivorans	CAATACGCTCGGCTTCTGCGTCGGCGGCACGATGCTCGCGACCGCGCTCGCGGTGCTCGC	1191
	*** ***********************************	
Bcepacia	CGCGCGCGGCGAACATCCGGTCGCGCGATGACGCTGCTGACCGCGATGCTCGATTTCAC	1260
Bcenocepacia	CGCGCGTGGCGAACATCCGGCCGCGTCGATGACGCTGCTCACCGCGATGCTCGACTTCAC	1251
Bvietnamesis	GGCGCGCGGCGAACATCCGGCCGCGTCGATGACGCTGCTGACCGCGATGCTCGACTTCAC	1260
Bmultivorans	CGCGCGCGGCGAACATCCGGCCGCGTCGATGACGCTGCTTACCGCGATGCTCGACTTCTC	1251
	***** *********** *********************	

Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	CGACACCGGCATCCTCGACGTGTTCGTCGACGAGGCGCACGTGCAGATGCGCGAGCAGAC CGATACGGGCATCCTCGACGTGTTCGTCGACGAGGCGCACGTGCAGATGCGCGAGCAGAC CGACACCGGCATCCTCGACGTGTTCGTCGACGAGGCGCACGTGCAGATGCGCGAGCAGAC CGATACGGGCGTGCTCGACGTGTTCGTCGACGAGGCGCACGTGCAGATGCGCGAGCAGAC	1320 1311 1320 1311
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	CATCGGCGGCAAGAACGGCACGCCGCCGGGGTTGATGCGCGGCGTCGAGTTCGCGAACAC CATCGGCGGCAAGAACGGTGCGCAGCCGGGGCTGATGCGCGGCGTCGAGTTCGCCAACAC CATCGGCGGCAAGAACGGCACGGC	1380 1371 1380 1371
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	GTTCTCGTTCCTGCGGCCGAACGACCTCGTGTGGAACTACGTCGTCGACAACTACCTGAA GTTCTCGTTCCTGCGGCCGAACGATCTCGTGTGGAACTACGTCGTCGACAACTACCTGAA GTTCTCGTTCCTGCGGCCGAACGATCTGGTGGGAACTACGTGGTCGACAACTACCTGAA GTTCTCGTTCCTGCGCCCCGAACGATCTCGTCTGGAACTACGTCGTCGACAACTACCTGAA ***********************************	1440 1431 1440 1431
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	GGGCCGTACGCCCGCGCGTTCGACCTGCTGTACTGGAACAGTGACTCGACGAGCCTGCC GGGCCGCACGCCCGCGCCGTTCGACCTGCTGTACTGGAACAGCGATTCGACGAGCCTGCC GGGCCGCACGCCGGCCGCGTTCGACCTGCTGTACTGGAACAGCGACTCGACGAGCCTGCC GGGCCGCACGCCCGCGCCGTTCGACCTGCTGTACTGGAACAGCGATTCGACGAGCCTGCC	1500 1491 1500 1491
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	GGGCCCGATGTACGCGTGGTACCTGCGCAATACCTATCTCGAGAACAAGCTCCGCGTGCC GGGCCCGATGTACGCGTGGTATCTGCGCCATACCTATCTGGAAAACAAGCTGCGCGAGCC CGGGCCGATGTACGCGTGGTATCTGCGCAATACCTACCTCGAGAACAAGCTCCGCGAGCC GGGGCCGATGTACGCGTGGTACCTGCGCAATACGTATCTCGAGAACAAGCTGCGCGAGCC ** *********************************	1560 1551 1560 1551
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	GGGCGCGCTGACCGTGTGCGGCGAATCCGTCGACCTGTCGCGCATCGACGTGCCGACCTT GGGTGCGCTGACCGTGTGCGGCGAATCGGTCGACCTGTCGCTGATCGACGTGCCGACCTT GAACGCACTGACGGTTTGCGGCGAGCCCGTCGACCTGTCGCGCATCGACGTGCCGACCTT GGGCGCGCTGACCGTCTGCGGCGAGCCGGTCGATCTGTCGCGCATCGACGTGCCGACCTT * ** ***** ** ******* * ******	1620 1611 1620 1611
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	CATCTACGGTTCGCGCGAGGATCACATCGTGCCGTGGCAGACGGCCTATGAGTCGACGTC CATCTACGGTTCGCGCGAGGATCACATCGTGCCGTGGCAGACGGCCTACGCATCGACGTC CATCTACGGCTCGCGCGAGGACCACATCGTGCCGTGGCAGACGGCCTACGCATCGACGTC CATCTACGGGTCGCGCGAGGATCACATCGTGCCGTGGCAGACGGCCTATGCGTCGACATC	1680 1671 1680 1671

Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	GATCCTGACGGGCCCGCTGAAGTTCGTGCTCGGCGCGCGTCGGGTCACATCGCGGGCGTGAT GATCCTGTCGGGCCCGCTGAAGTTCGTGCTCGGCGCGCGTCGGGACACATCGCGGGCGTGAT GATCCTGACGGGCCCGCTGAAGTTCGTGCTCGGCGCACACGGGCCACATTGCCGGCGCGTGAT GATCCTGACGGGCCCGCTGAAGTTCGTGCTCGGCGCCTCGGGCCACATCGCCGCGCGTGAT *******	1740 1731 1740 1731
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	CAATCCGCCGGCGAAGAAGAAGCGCAGCTACTGGATCAACGACGGCGACCTGCCCGAATC CAATCCGCCGGCGAAGAAGAAGCGCAGCTACTGGGTCAACGAGGGCGACCTGCCCGAATC CAATCCGCCGGCGAAGAAGAAGCGCAGCTACTGGGTCAACGACGACGGCGATCTGCCCGAAGC CAATCCACCCGCGAAGAAAAAGCGCAGCTACTGGGTCAACGACGACGACCTGCCGAGCGC ****** ** ******* ** ******** ** ******	1800 1791 1800 1791
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	CGCCGACGACTGGTTTGCCGGCGCGACCGAGCAGCCGGGCAGCTGGTGGACGACCTGGGT CGCCGACGACTGGTTTGCCGCGGCGACCGAGCAGCCGGGAAGCTGGTGGACGACGTGGGT CGCCGACGACTGGTTCGCCGGGCGCGACCGAGCAGCCGGGCAGCTGGTGGACGACCTGGAT CGCCGACGACTGGTTCGCCGGCGCGCGCGACCGAGCATCCGGGCAGCTGGTGGACGACCTGGAT *** ********** ** * ********* ***** ****	1860 1851 1860 1851
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	CGAATGGCTCGACCAGTACGGCGGCCGCAAGGTGGAACCGCCGGCCAAGCCCGGCTCCGC CGAGTGGCTCGACGCGTACGGCGGCGCCGCAAGGTCGCGCCGCCGCCGGCCCAGCCGGGGTTCCGC GGAATGGCTCGACCAGTACGGCGGCCGCAAGGTGGCGCCGCCGCGCGCG	1920 1911 1920 1911
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	GCAGTTCCCGGTGATCGAGCCGGCGCGGCGGCCGCTACGTGTTGCAGCGCGCTTGACGAAA GCAATTCCCGGTGATCGAGCCGGCGCCCGGGCGCTACGTGTTGCAGCGCGATTGACGAAA GCAGTTTCCGGTGATCGAGCCGGCCGCGCGCGCGCGCTACGTGTTGCAGCGCGATTGACGAAA GCAATTCCCGGTGATCGAACCGGCACCCGGCCCGTTACGTATTGCAGCGCGATTGACGAAA *** ** ****************************	1980 1971 1980 1971
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	ACCGGACAGCGGCGCACGCTGTCCGG-TGCACCGCAGTTTTTTTTAACAGGGCCGGTAGC ACCGGACAGCGGCGCACGCTGTCCGG-TGCACCGCAGTTTTTTT-AACAGGGCCGGTAAC GCCGGGCAGCGGCGCACGCTGTTCGG-CGCATAACAGTTTTTTT-AACAGGGTCGGTGGC GCCGGACAGCGGCGCACGCTGTCCGACTGCACCGCAGTTTTTTT-AACAGGGTCGGCAGC **** ***************** ** *** ***	2039 2029 2038 2030
Bcepacia Bcenocepacia Bvietnamesis Bmultivorans	GATGCGCCGTGTCGTGCGGGCCTGGAGGAAAGGGAA 2075 GACGCGCCGTGTCGTGCGGGCCTGGAGGAAAGGGAA 2065 GACGCGCCGTGTCGTGCGGGCCCGGAGGAAACGGAA 2074 GACGCGCCGTGTCGCGCGCGCCCGGAGGAA 2060	

APÊNDICE D- Resultado do sequenciamento, usando os oligonucleotídeos phaC F e phaC R

Resultado do sequenciamento do isolado SCU 63 e alinhamento

>Iniciador phaC F

AACGCACGGMGCKCCTTCCGCGGGCAGCACCGGATTCGATCCGGCCGCCCGGCCGATGCCGC CKACGTTCGAGTCGTGCTGGATCGCGTGGCGCGGTTTTGMWGATCCGGMSCGCGCCGCGACT GACGCGGCCACCGTGSATCCGTTCGCGACATTCCTGTTCCCGACTTCRTTTCCWTTCCWGGT ACCGTCGATGCCCGATCTCGGCGGCGCATGGYSTCSCCGTTCGCGGGGCTGAAACTGCCGGGTG CTGATGCAGCAGCGGCCGCCGCGAAGCTCGAGTCGCCCGAACTGAAGGACCGCCGCTTCAG CGGCGATGCGTGGAAGGCGTCGCCCGCGCATGCGTTCGCGGCCGCCTGGTATCTGCTCAACG CGCGCTATCTGCAGGAACTGGCCGACGCGCTTCAGACCGATCCGAAGACGCGCGAGCGCATC CGCTTCACGGTCCAGCAATGGACGGCCGCCGCAGCGCCGAGCAACTTCCTCGCTCTCAATCC CGACGCGCAGAAGTCGATTCTCGAGACGCAGGGCGAAAGCCTGCGGCAGGGGATGATGAACC TGCTCGGCGACCTGCAGCGCGGCAAGATTTCGCAGACCGACGAATCGCGGTTCGTGGTCGSA AAGAACCTCGGGTGTACTGAAGSGSGGTCGTCTACGAGAACGACCTGATCCAGCTGATCCAG TAMACGCCGAAGACGGACAAGKGTTCGAGCGGCCATTGCTGATCGTCCCGCCGTGCATCAAC AAGTTTTACATCCTCGATYTGCAGCCCGRRAATTCGCTCGTCSCGCATGCGCTKTCGAACGG CATCAGTGTCTCGTGTCTGGCGCATGCGATGCTCGTCGSCMAAGACGTGGACGACTAMTGAC GATGCTTGCYCGSGGCGATCGACG

>Iniciador phaC R

TACGGGMTGACGCGTGWSCTGTGCCGAGCGGGCTGGYGGGTGGCGCCCCTTGCGGCCGCCGC CTTGCCCAGCCACTCGACCGCGTCGGGACCAGCTTCCCGGCTGCTCGGTGGCACCGGACAAC CAKGCGTCCGCGGATGCCGGCWGATCGYTGTCGTTGACCCARCSYGTGCKCTTCTTCTSS CGGCGGATTGATCACGCCCGCGATGTGACCCGACGCCCKAGYACGAWYTTCWGCGGGCCCG ACAGGATCGACGTCGATGCGTAGGCCGTCTGCCACGGCACGATGTGATCCTCGCGCGAGCCG TAGACGAAGGTCGGCACGTCGATCAGCGACAGGTCGACGGATTCGCCGCACACGGTCAGCGC GCCCGGCTCGCGCAACCTGTTCWCGAGATAGGTATTGCGCAGGTACYACKCGTACATCGGGC CAGGCAGGCTCGTCGAGTCGCTGTTCCAGTACAGCAGGTCGAACGGCGCGCGGGCGTGCGGCCC TTCAGGTAGTTGTCGACGACGTAGTTCCACACGAGGTCGTTCGGCCGCAGGAACGAGAACGT GTTCGCGAACTCGACGCCGCGCATCAGCCCCGGTTGCGTGCCGTTCTTGCCGCCGATGGTTT GCTCGCGCATCTGCACGTGCGCTTCGTCGACGAACACGTCGAGAATGCCCGTGTCGGTGAAA CGCCAGTGCGGTCGCGAGCATCGTGCCGCCGACGCARAGCCGAGCGTATTGATCTGCTCGCG GCGCTGACCTGCTGCACGGCGTCGATCGCGCGAGCAGCCCTTCGTCATGTAGTCGTCCCACG TCTGTGSGCGACGAGCATCGCATGCGCCACGAMACGAGACACTGATGCGGTCGAMGSCATGC CGACGAGCGATTCYCGGGCTCGCARATCGRGGGAKGTAAAM

Resultado do sequenciamento do isolado SCU 66

>Iniciador phaC F

CAGGGCTAGGCGCTCCTTCCGCGGGCAGCACCGGATTCGATCCGGCCGCCCGGCCGATASCG CCRACGTTCGAGTCGTGCTGGATGACGTGGCGYGGTTTTGMWGATCCGGMCCGCGCGCGAC TGACGCGGGGACCGTGAATCCGTTCGCGACATTCCTGTTCCCGACTTCRTGTCCWTTCGWGGT ACCGTCGATGCCCGATCTCGGCGGCGCATGGYSTCSCCGTTCGCGGGGCTGAAACTGCCSGGTG CTGATGCAGCAGCGGCGGCGCGCGAAGCTCGAGTCGCCCGAACTGAAGGACCGCCGCTTCAG CGGCGATGCGTGGAAGGCGTCGCCCGCGCATGCGTTCGCGGCCGCCTGGTATCTGCTCAACG CGCGCTATCTGCAGGAACTGGCCGACGCGCTTCAGACCGATCCGAAGACGCGCGAGCGCATC CGCTTCACGGTCCAGCAATGGACGGCCGCCGCAGCGCCGAGCAACTTCCTCGCTCTCAATCC CGACGCGCAGAAGTCGATTCTCGAGACGCAGGGCGAAAGCCTGCGGCAGGGGATGATGAACC TGCTCGGCGACCTGCAGCGCGGCAAGATTTCGCAGACCGACGAATCGCGGTTCGTGGTCGGC AAGAACCTCGGGTGTACTGAAGGCGCGGTCGTCTACGAGAACGACCTGATCCAGCTGATCCA GTACACGCCGAAGACGGACAAGGTGTTCGAGCGGCCATTGCTGATCGTCCCGCCGTGCATCA ACAAGTTTTACATCCTCGATYTGCAGCCCGAGAATTCGCTCGTCGCGCATGCGCTGTCGAAC GGCCATCAGTGTTCCTCGTGTCGTGCSCATGCGATGCTCCGTCGCGCACAAGACGTGGGACG ACTACTGACGAGGCTGCTCGCGCGATCGACGCCGTGGCARCAGGTCMRSCGCCCGCGAGCCG ATYCAT

>Iniciador phaC R

TATCAGYTGGACGWGTGGCCTGTGCCGAGCGGGCTGGSCGGRTGGCGCCCCTTGCGGCCGCC GCCTTWTCCAGCCACTCGACCGCGTCGGGACGAGWTTCCCGGCTGCAGGGTGGCACCGGACG YCCAKGCGTCGSCGCATGCCGGCWGATCGYTGTCGTTGACCCAACCYGTGCKCTTCTTC SSCGGCGGATTGATCACGCCCGCGATGTGACCCGACGCGCCKAGYACGAWCTTCWGCGGGCC CGACAGGATCGACGTCGATGCGTAGGCCGTCTGCCACGGCACGATGTGATCCTCGCGCGAGC CGTAGACGAAGGTCGGCACGTCGATCAGCGACAGGTCGACGGATTCGCCGCACACGGTCAGC GCGCCCGGCTCGCGCAACCTGTTCWCGAGATAGGTATTGCGCAGGTACCACGCGTACATCGG GCCAGGCAGGCTCGTCGAGTCGCTGTTCCAGTACAGCAGGTCGAACGGCGCGGGCGTGCGGC CCTTCAGGTAGTTGTCGACGACGTAGTTCCACACGAGGTCGTTCGGCCGCAGGAACGAGAAC GTGTTCGCGAACTCGACGCCGCGCATCAGCCCCGGTTGCGTGCCGTTCTTGCCGCCGATGGT TTGCTCGCGCATCTGCACGTGCGCTTCGTCGACGACACGTCGAGAATGCCCGTGTCGGTGA ACCGCCAGTGCGTCGCGAGCATCGTGCCGCCGACGCARAGCCGAGCGTATGATCTGCTCGCG CGCTGACTGCTGCACGCGTCGATCGCGCGAGCAGCCTCGTTCATGTAGTCGTCACGTCTGTG SCGACGAGCATCGCATGCGCMGACCGAGACCTGATGCGTTCGACGGCATGCCGACRGCGAAT YCGGCTGCGATCGAGGATGTAACTGCCTA

APÊNDICE E - Resultado do sequenciamento, usando os oligonucleotídeos SCU 63 F/R e Primer interno SCU 66 F/R.

Isolado SCU 63

>Primer SCU 63 interno F

AATTCCGATTCGCAGACCGACGATCGCGGTTCGTGGTCGGCAAGAACCTCGGGTGTACTGAA GGCGCGGYCGTCTACGAGAACGACCTGATCCAGCTGATCCAGTACAACGCCGAAGACGGACAA GGTGTTCGAGCGGCCATTGCTGATCGTCCCGCCGTGCATCAACAAGTTTTACATCCTCGATC TGCAGCCCGAGAATTCGCTCGTCGCGCATGCGCTGTCGAACGGCCATCAGGTGTTCCTCGTG TCGTGGCGCAATGCGGATGCTTCGGTCGCGCACAAGACGTGGGACGACTACATGAACGAAGG GCTGCTCGCGGCGGCGCGCGCGTGCAGCAGGTCAGCGGCGGCGGGGCGGCGAATACGCTCG GCTTCTGCGTCGGCGGCACGATGCTCGCGACCGCACTGGCGGTGCTCGCCGCGCGGCGAA CATCCGGCCGCGTCGATGACGCTGCTCACCGCGATGCTCGAACCACGGGCCACAACGGCCGCACAACG GCACGCGCGCTGATGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGAACCATCT CGACGTGTTCGTCGACGAAGCGCACGTGCCGCGCGCGAACCATCGGCGGCGAACCA GCACGCAACCGGGGCTGATGCCGCGCGCGCGCGCGAACCGTTCTCCTGCGGCGGCGAACCG AACGACCTCGTGTGGAACTACGTCGTCGACACCCCGGGAARRGGSAAA

>Primer SCU 63 interno R

Isolado SCU 66

>Primer SCU 66 interno F

 ATCAATACGCTCGGCTTCTGCGTCGGCGGCACGATGCTCGCGACCGCACTGGCGGTGCTCGC CGCGCGCGGCGAACATCCGGCCGCGTCGATGACGCTGCTCACCGCGATGCTCGATTTCACCG ACMCGGGCATTCTCGACGTGTTCGTCGACGAAGCGCACGTGCAGATGCGCGAGCAAACCATC GGCGGCAAGAACGGCACGCAACCGGGGCTGATGCGCGGCGTCGAGTTCGCGAACACGTTCTC GTTCTGCGGCGAACGACTCGTGAYAYAYWMYYTYYKYSKYRSSAA

>Primer SCU 66 interno R

APÊNDICE F - Sequências consenso do gene phaC dos isolados SCU 63 e SCU 66

Sequência consenso final do gene phaC do isolado SCU 63

CCGCGGGCAGCACCGGATTCGATCCGGCCGCCCGGCCGATGCCGCCACGTTCGAGTCGTGCT GGATCGCGTGGCGCGGTTTTGGATCCGGCGCGCGCGACTGACGCGGCCACCGTGATCCGTT CGCGACATTCCTGTTCCCGACTTCTTTCCTTCCGGTACCGTCGATGCCCGATCTCGGCGGCA TGGTCCCGTTCGCGGGGCTGAAACTGCCGGGTGCCGCGATTCCGCCCGAGCGGCTCCAGACG CTGCAGGCCGACTACGCGCGCGATTGCATGACGCTGATGCAGCAGGCGGCCGCCGCGAAGCT CGAGTCGCCCGAACTGAAGGACCGCCGCTTCAGCGGCGATGCGTGGAAGGCGTCGCCCGCGC ATGCGTTCGCGGCCGCCTGGTATCTGCTCAACGCGCGCTATCTGCAGGAACTGGCCGACGCG CTTCAGACCGATCCGAAGACGCGCGAGCGCATCCGCTTCACGGTCCAGCAATGGACGGCCGC CGCAGCGCCGAGCAACTTCCTCGCTCTCAATCCCGACGCGCAGAAGTCGATTCTCGAGACGC AGGGCGAAAGCCTGCGGCAGGGGATGATGAACCTGCTCGGCGACCTGCAGCGCGGCAAGATT TCGCAGACCGACGAATCGCGGTTCGTGGTCGGCAAGAACCTCGGGTGTACTGAAGGCGCGGT CGTCTACGAGAACGACCTGATCCAGCTGATCCAGTACACGCCGAAGACGGACAAGGTGTTCG AGCGGCCATTGCTGATCGTCCCGCCGTGCATCAACAAGTTTTACATCCTCGATCTGCAGCCC GAGAATTCGCTCGTCGCGCATGCGCTGTCGAACGGCCATCAGGTGTTCCTCGTGTCGTGGCG CAATGCGGATGCTTCGGTCGCGCACAAGACGTGGGACGACTACATGAACGAAGGGCTGCTCG CGGCGATCGACGCCGTGCAGCAGGTCAGCGGCCGCGAGCAGATCAATACGCTCGGCTTCTGC CGCGTCGATGACGCTGCTCACCGCGATGCTCGATTTCACCGACACGGGCATTCTCGACGTGT TCGTCGACGAAGCGCACGTGCAGATGCGCGAGCAAACCATCGGCGGCAAGAACGGCACGCAA CCGGGGCTGATGCGCGGCGTCGAGTTCGCGAACACGTTCTCGTTCCTGCGGCCGAACGACCT CGTGTGGAACTACGTCGTCGACAACTACCTGAAGGGCCGCACGCCCGCGCCGTTCGACCTGC TGTACTGGAACAGCGACTCGACGAGCCTGCCTGGCCCGATGTACGGTGTACCTGCGCAATAC CTATCTCGGAACAGGTTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGTGTGCGGCGAATCCGTCGACCT GTCGCTGATCGACGTGCCGACCTTCGTCTACGGCTCGCGCGAGGATCACATCGTGCCGTGGC AGACGGCCTACGCATCGACGTCGATCCTGTCGGGCCCGCGAATCGTCTGGCGCGTCGGGTCA CATCGCGGGCGTGATCAATCCGCCGGAAGAAGAAGGCACGTGGGTCAACGACACGATCGCCG GCATCCGCGGACGCTGGTTGTCCGGTGCCACCGAGCAGCCGGGAAGCTGGTCCCGACGCGGT CGAGTGGCTGGGCAAGGCGGCGCCGCAAGGGGCGCCACCCCCAGCCCGCTCGGCACAGCAC GCGTCACCCGTA

Sequência consenso final do gene phaC do isolado SCU 66

 CAGACCGACGAATCGCGGTTCGTGGTCGGCAAGAACCTCGGGTGTACTGAAGGCGCGGTCGT CTACGAGAACGACCTGATCCAGCTGATCCAGTACACGCCGAAGACGGACAAGGTGTTCGAGC GGCCATTGCTGATCGTCCCGCCGTGCATCAACAAGTTTTACATCCTCGATCTGCAGCCCGAG AATTCGCTCGCGCGCATGCGCTGTCGAACGGCCATCAGGTGTTCCTCGTGTCGTGGCGCAA TGCGGATGCTTCGGTCGCGCACAAGACGTGGGACGACTACATGAACGAAGGGCTGCTCGCGG CGATCGACGCCGTGCAGCAGGTCAGCGGCCGCGAGCAGATCAATACGCTCGGCTTCTGCGTC GTCGATGACGCTGCTCACCGCGATGCTCGATTTCACCGACACGGGCATTCTCGACGTGTTCG TCGACGAAGCGCACGTGCAGATGCGCGAGCAAACCATCGGCGGCAAGAACGGCACGCAACCG GGGCTGATGCGCGGCGTCGAGTTCGCGAACACGTCTCGTTCCTGCGGCCGAACGACCTCGTG TGGAACTACGTCGTCGACAACTACCTGAAGGGCCGCACGCCCGCGCCGTTCGACCTGCTGTA CTGGAACAGCGACTCGACGAGCCTGCCTGGCCCGATGTACGCGTGGTACCTGCGCAATACCT ATCTCGGAACAGGTTGCGCGAGCCGGGCGCGCGCGCGCGGCGGCGGATCCGTCGACCTGT CGCTGATCGACGTGCCGACCTTCGTCTACGGCTCGCGCGAGGATCACATCGTGCCGTGGCAG ACGGCCTACGCATCGACGTCGATCCTGTCGGGCCCGCGAAGTCGTCTGGCGCGTCGGGTCAC ATCGCGGGCGTGATCAATCCGCCGGAAGAAGAAGGCACGGTTGGGTCAACGACACGATCGCC GGCATGCGCGACGCTGGCGTCCGGTGCCACCCTGCAGCCGGGAACTCGTCCCGACGCGGTCG AGTGGCTGGAAAGGCGGCGGCCGCAAGGGGCGCCACCGCCAGCCCGCTCGGCACAGGCCAC

APÊNDICE G - Análise BLASTx das sequências consenso pertencentes ao gene *phaC* dos isolados SCU 63 e SCU 66





ANEXOS

ANEXO A- Meios de cultura e reagentes utilizados

Meio Luria Bertani (LB)	
NaCl	5 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Triptona	10 g/L

Meio Mineral (Ramsay et al., 1990)

3,5 g/L
1,5 g/L
variável *.
200 mg/L
10 mg/L
60 mg/L
0,3 mg/L
0,2 mg/L
0,1 mg/L
0,03 mg/L
0,03 mg/L
0,02 mg/L
0,01 mg/L

*A concentração de $(NH_4)_2SO_4$ ajustada em cada experimento com o objetivo de proporcionar condições de acúmulo de P3HB ou crescimento celular. Em meio mineral sólido para promover o acúmulo de PHA foi utilizado 60 mg/L, juntamente com 5 g/L da fonte de carbono. Em meio de cultura sólido ou líquido para crescimento, se utilizou 1 g/L, com a mesma concentração da fonte de carbono. Em meio líquido para o acúmulo utilizou-se 1 g/L e 10 ou 15 g/L da fonte de carbono.

Solução estoque Sudan Black B

Sudan Black B	0,2 g
Etanol 96%	q.s.p 1L