

**THATIANE TEIXEIRA MENDONÇA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Burkholderia sacchari*  
PRODUZIR O COPOLÍMERO BIODEGRADÁVEL POLI(3-  
HIDROXIBUTIRATO-*co*-3-HIDROXIHEXANOATO)  
[P(3HB-*co*-3HHX)]**

**Dissertação apresentada ao Departamento de  
Microbiologia do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências.**

**São Paulo  
2009**

**THATIANE TEIXEIRA MENDONÇA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Burkholderia sacchari*  
PRODUZIR O COPOLÍMERO BIODEGRADÁVEL POLI(3-  
HIDROXIBUTIRATO-*co*-3-HIDROXIHEXANOATO)  
[P(3HB-*co*-3HHX)]**

**Dissertação apresentada ao Departamento de  
Microbiologia do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências.**

**Área de concentração: Microbiologia**

**Orientadora: Profa. Dra. Luiziana Ferreira  
da Silva**

**São Paulo  
2009**

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

© reprodução total

Mendonça, Thatiane Teixeira.

Avaliação do potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato) [P(3HB-co-3HHx)] / Thatiane Teixeira Mendonça. - São Paulo, 2009.

Orientador: Luiziana Ferreira da SILVA.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Produção de biopolímeros.

Versão do título para o inglês: Evaluating the potential of *Burkholderia sacchari* to produce the biodegradable copolymer poly (3-hydroxybutirate-co-3-hydroxyhexanoate).

Descritores: 1. *Burkholderia sacchari* 2. Polihidroxi alcenoatos 3. Ácidos orgânicos 4. P(3HB-co-3HHx) 5. Polímeros biodegradáveis  
I. SILVA, Luiziana Ferreira da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0210/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a):                    Thatiane Teixeira Mendonça.

Título da Dissertação:        Avaliação do potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável poli (3-hidroxi-butilirato-co-3-hidroxi-hexanoato) [P(3HB-co-3HHx)] .

Orientador(a):                Luiziana Ferreira da SILVA.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../.....,

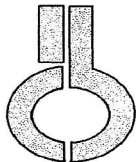
**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a):      Assinatura: .....  
                                  Nome: .....  
                                  Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
                                  Nome: .....  
                                  Instituição: .....

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) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 225/07, referente ao projeto intitulado: “*Avaliação do potencial de Burkholderia sacchari produzir o copolímero biodegradável poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) ( P3HB-co-3HHx)*” sob a responsabilidade de **Thatiane Teixeira Mendonça**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 29 de agosto de 2007.

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

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO  
Vice-Coodenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais pelo exemplo e por uma  
vida de dedicação a mim e aos meus irmãos

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa Dra. Luiziana Ferreira da Silva pela orientação e confiança em mim depositada, pelos conhecimentos transmitidos, apoio e experiência adquirida.

Ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez pelo direcionamento, pela paciência e pelas valiosas discussões ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, fonte de constante apoio e incentivo durante todos esses anos de estudo. Obrigada pai, mãe, Patrícia e Rafael pelo amor, paciência e compreensão.

À minha querida amiga Sayuri por estar sempre ao meu lado, desde o início, em todos os momentos, e por ter me ajudado muito na realização deste trabalho.

Às minhas amigas, Dani que me auxiliou sempre que precisei nas minhas dúvidas em química, e Lu, que esteve comigo e me ajudou no início de tudo.

Aos meus estagiários Ângela e Juan que me auxiliaram em diferentes fases e contribuíram muito com o andamento deste trabalho.

Ao Rogério e à Nuri pelos ensinamentos e por terem contribuído em etapas importantes ao longo deste estudo.

Aos meus companheiros de laboratórios Rafael, Rominne, Érica, Marco Antonio, Márcia, Mateus, Karina, Johana, Flávio, Liege, Lucas, Diana P., Diana M., Estela, Natália, Karen, Mariana e principalmente a Paola, sempre dispostos a me ajudar no que fosse preciso.

Ao Thomaz por ter me incentivado e me mostrado a direção do caminho.

Aos meus familiares e amigos que me deram força e contribuíram comigo de alguma forma durante esta etapa da minha vida.

À Fundação de Apoio Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro (Proc. FAPESP 07/52113-2 e 08/51324-2).

“A ciência está longe de conhecer o mundo de uma maneira perfeita e adequada; ela tem, no entanto, a pretensão legítima de descobrir para nós, em parte, a natureza e as suas leis.”

(Jovielt).



## RESUMO

MENDONÇA, T. T. **Avaliação. do potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato) [P(3HB-co-3HHx)]** 2009. 130 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Polihidroxicarboxilatos (PHA) são poliésteres produzidos por diversas bactérias a partir de fontes de carbono renováveis que despertam grande interesse por suas propriedades elastoméricas e/ou termoplásticas e por serem biodegradáveis. Trabalhos anteriores indicaram o potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero poli-3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato (P3HB-co-3HHx) pertencente à classe dos PHA, porém híbrido, por combinar monômeros de cadeia curta (4 carbonos) e média (6 carbonos), cujas propriedades intermediárias são promissoras para aplicações mais amplas. Neste trabalho, confirmou-se a capacidade de *B. sacchari* acumular tal copolímero a partir de ácido hexanóico e glicose, promovendo-se um aumento da fração 3HHx (até 2 mol%), indicando discreta flexibilidade da PHA sintase desta bactéria, embora as vias de catabolismo de ácido hexanóico sejam mais eficientes, já que os valores de conversão de ácido hexanóico a 3HHx correspondem a menos do que 10% do máximo teórico. Ácidos octanóico e butírico não influenciaram nas frações de 3HHx acumuladas pela bactéria. Mutantes de *B. sacchari* incapazes de crescer em ácido hexanóico (hx<sup>-</sup>) foram obtidos por UV e por transposon mini-*Tn5*, nos quais foi reduzida tanto a capacidade de formação de 3HB como a de 3HHx. Foram construídos recombinantes de *B. sacchari* portando genes *phaB* (codificador de 3-cetoacilCoA redutase NADPH dependente) de *R. eutropha*, *phaJ1* e *phaJ4* [ambos codificadores de enoil-CoA hidratases (*R*-específicas) de *P. aeruginosa*]. A expressão de *phaB*, bem como de *phaJ1*, aumentou o direcionamento de 3HB para a PHA sintase, sem contudo aumentar a fração molar de 3HHx a partir de ácido hexanóico. A partir de glicose com ácidos butírico ou octanóico foram detectadas pequenas frações de 3HHx e 3HO (3-hidroxi octanoato), respectivamente, no polímero, indicando que, nas condições testadas, os recombinantes foram capazes de condensar acetil-CoA e butiril-CoA, no primeiro caso, e que a PHA sintase pode incorporar monômeros de 3HO. A estabilidade térmica do polímero produzido pela linhagem selvagem indicou uma temperatura de degradação inferior ao do P3HB que pode ser atribuída à presença de pequenos teores de 3HHx.

Palavras chave: *Burkholderia sacchari*, polihidroxicarboxilatos, ácidos orgânicos, P(3HB-co-3HHx), polímeros biodegradáveis.

## ABSTRACT

MENDONÇA, T. T. **Evaluating the potential of *Burkholderia sacchari* to produce the biodegradable copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-co-3HHx)]**. 130 p. Master dissertation (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polyesters produced by various bacteria from renewable carbon sources, being industrially interesting due to their elastomeric and thermoplastic properties and also biodegradability. Previous works indicated the potential of *B. sacchari* in producing the copolymer poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate (P3HB-co-3HHx) a hybrid PHA since it combines short-chain-length (4 carbons) and medium-chain-length monomers, thus showing promising intermediate properties to wide application. This work confirmed the ability of *B. sacchari* in accumulating such a copolymer from hexanoic acid and glucose, with 3HHx fractions increasing up to 2 mol%, indicating a substrate specificity of the PHA synthase of this bacterium, although the catabolic pathways of hexanoic acid may be more efficient, since the values of 3HHx yield from hexanoic acid represent less than 10% of the maximum theoretical yield. Octanoic and butyric acids did not influence the 3HHx content on PHA accumulated. *B. sacchari* mutants unable to grow on hexanoic acid (hx<sup>-</sup>) were obtained by UV and mini-*Tn5* transposon. They showed a reduction on the ability to produce both 3HB and 3HHx. *B. sacchari* recombinants were constructed, harboring the *Ralstonia eutropha phaB* (encoding 3-ketoacyl-CoA reductase) or *Pseudomonas aeruginosa phaJ1* and *phaJ4* genes (encoding R-specific enoyl-CoA hydratases). The expression of *phaB* or *phaJ1* increased the channeling of 3HB to the PHA synthase, despite no increase on 3HHx fraction was observed. From glucose, combined to butyric or octanoic acids, small fractions of 3HHx and 3HO (3-hydroxyoctanoate), respectively, were detected in the polymer, indicating that, under the test conditions, the recombinants were able to promote acetyl-CoA and butyryl-CoA condensation, in the first case, and also that *B. sacchari* PHA synthase can incorporate 3HO monomers, in the latter. Thermal stability analysis of the PHA produced by wild type strain indicated a reduced degradation temperature when compared to P3HB, which could be attributed to a small 3HHx content in the copolymer.

Key words: *Burkholderia sacchari*, polyhydroxyalkanoate, organic acids, P(3HB-co-3HHx), biodegradable polymers.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1-</b>	Microscopia eletrônica de uma célula de <i>Wautersia eutropha</i> após acúmulo de polímero na forma de grânulos (Foto: RITA DE CÁSSIA PARO ALLI).....	<b>19</b>
<b>Figura 2.2-</b>	Esquema da síntese de PHA em bactérias (GOMEZ e BUENO-NETTO, 2001).....	<b>21</b>
<b>Figura 2.3-</b>	Biossíntese de PHA no contexto do metabolismo microbiano (Figura adaptada de ALDOR e KEASLING, 2003). Vias metabólicas para síntese de PHA <sub>SCL</sub> (polímeros com monômeros de 4 a 5 carbono) e PHA <sub>MCL</sub> (polímeros com monômeros de 6 a 14). Abreviações: PhaA – 3-cetotiolase; PhaB – ®-3-cetoacil-CoA redutase (para biossíntese de PB esta enzima é acetoacetyl-Coa redutase); PhaC – PHA sintase ou polimerase; PhaG – (R)-3- hidroxiacil-CoA:ACP transacilase; PhaJ – enoil-CoA hidratase (R) específica. As linhas tracejadas representam passos metabólicos não incluídos. PhaC é específica para monômeros na configuração (R).....	<b>22</b>
<b>Figura 2.4-</b>	Estrutura química dos copolímeros poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidrovalertato) (P3HB-co-3HV), composto por monômeros de cadeia curta (PHA <sub>SCL</sub> ) e poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato) (P3HB-co-3HHx), constituído de monômero de cadeia curta (PHA <sub>SCL</sub> ) e média (PHA <sub>MCL</sub> ).....	<b>30</b>
<b>Figura 4.1-</b>	Esquema de cultivo para mutação e seleção de clones mutantes hx <sup>-</sup> (sac <sup>+</sup> /gli <sup>+</sup> ) (SILVA, 1998 adaptado).....	<b>47</b>
<b>Figura 5.1-</b>	Gráficos do perfil de acúmulo de PHA total e monômeros 3HB e 3HHx por <i>Burkholderia sacchari</i> linhagem selvagem a partir de glicose e ácido hexanóico em meio mineral (MMG, o número após a sigla indica a concentração de glicose utilizada, H indica a concentração de ácido hexanóico fornecida).....	<b>56</b>
<b>Figura 5.1a-</b>	Sobrevivência de <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101 (UFC/mL) submetida a diferentes períodos de irradiação UV.....	<b>62</b>
<b>Figura 5.2-</b>	Crescimento de <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101 em meio mineral com glicose 2 g/L (MMG2), utilizada como controle, gráfico superior à esquerda. Medidas de densidade óptica a 610 nm (■) e biomassa celular (●). Crescimento de <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101 em meio mineral contendo ácido hexanóico 0,5 g/L (MMH0,5), 1,0 g/L (MMH1) e 2,0 g/L (MMH2) como única fonte de carbono, gráficos superior à direita e inferior à esquerda. Medidas de densidade óptica a 610 nm (◆), média de três repetições com intervalo de confiança, e pH (■).....	<b>64</b>
<b>Figura 5.3-</b>	Seleção de clones mutantes hx <sup>-</sup> ( sac <sup>+</sup> /gli <sup>+</sup> ). À esquerda, placa com meio mineral contendo 1 g/L de sacarose (MMS1); à direita, meio mineral contendo ácido hexanóico 1 g/L (MMH1). Tempo de incubação 48 h. O círculo identifica o clone mutante de <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101 selecionado (TA-01), deficiente, parcialmente, no consumo de ácido hexanóico (hx <sup>-</sup> ).....	<b>65</b>
<b>Figura 5.4-</b>	Seleção de clones mutantes hx <sup>-</sup> (sac <sup>+</sup> /gli <sup>+</sup> ). À esquerda, placa com meio mineral contendo contendo 1 g/L de sacarose (MMS1); à direita, meio	<b>67</b>

	mineral contendo ácido hexanóico 1 g/L (MMH1). Tempo de incubação 48 h. Os círculos identificam um dos 3 clones mutantes de <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101 selecionados.....	
<b>Figura 5.5-</b>	Coloração de mutantes por <i>Sudan Black B</i> em placa com meio mineral contendo 5 g/L de glicose (MMG5 g/L) itens A, C, E e G e com meio mineral com 5 g/L de glicose e ácido hexanóico 1 g/L (MMG5+H1 g/L) itens B, D, F e H. Tempo de incubação 120 h. Linhagens: IPT344 (mutante <i>Burkholderia sacchari</i> PHA <sup>-</sup> ), LFM101 ( <i>Burkholderia sacchari</i> ), IPT046 ( <i>Pseudomonas putida</i> acumuladora de PHA <sub>MCL</sub> ), LFM826 (mutante UV de <i>Burkholderia sacchari</i> ), LFM838 (mutante transposon mini- <i>Tn5</i> ), LFM839 (mutante transposon mini- <i>Tn5</i> ), LFM840 (mutante transposon mini- <i>Tn5</i> ).....	<b>68</b>
<b>Figura 5.6-</b>	Gráficos do perfil de acúmulo de PHA total e monômeros 3HB e 3HHx por <i>Burkholderia sacchari</i> linhagem selvagem e mutantes a partir de glicose e ácido hexanóico (o número após a sigla indica a concentração de glicose e/ou ácido hexanóico utilizada).....	<b>71</b>
<b>Figura 5.7-</b>	Proposta das possíveis regiões da $\beta$ -oxidação de ácidos graxos afetadas nos mutantes obtidos por transposon mini- <i>Tn5</i> . As linhas tracejadas indicam os passos metabólicos que drenam intermediários desta via para síntese de PHA.....	<b>73</b>
<b>Figura 5.8-</b>	Perfil de migração em gel de agarose 0,8% mostrando os plasmídios pBBR1MCS-2 portando o gene <i>phaB</i> de <i>R. eutropha</i> extraídos de recombinantes: 1- Marcador $\lambda$ - <i>HindIII</i> ; 2- pBBR1MCS-2:: <i>phaB<sub>Re</sub></i> de <i>E. coli</i> XL1Blue digerido com <i>HindIII</i> ; 3- (LFM841 - TTM01) pBBR1MCS-2:: <i>phaB<sub>Re</sub></i> de <i>B. sacchari</i> digerido com <i>HindIII</i> ; 4- (LFM842 - TTM02) pBBR1MCS-2:: <i>phaB<sub>Re</sub></i> de <i>B. sacchari</i> digerido com <i>HindIII</i> ; 5- (TTM06) pBBR1MCS-2:: <i>phaB<sub>Re</sub></i> de <i>B. sacchari</i> digerido com <i>HindIII</i> ; 6- (TTM14) pBBR1MCS-2:: <i>phaB<sub>Re</sub></i> de <i>B. sacchari</i> digerido com <i>HindIII</i> . O pBBR1MCS-2 digerido apresenta tamanho próximo de 5,0 kb e o gene <i>phaB<sub>Re</sub></i> possui aproximadamente 3,4 kb.....	<b>76</b>
<b>Figura 5.9-</b>	Perfil de migração em gel de agarose 0,8% mostrando os plasmídios pBBR1MCS-2 portando o gene <i>phaJ4</i> de <i>P. aeruginosa</i> extraídos de recombinantes: 1- Marcador GelPilot <sup>R</sup> 1 kb Ladder (QUIAGEN); 2- pGEM:: <i>phaJ1<sub>Pa</sub></i> de <i>E. coli</i> XL1Blue digerido com <i>EcoRI</i> ; 3-(T1) pBBR1MCS-2:: <i>phaJ1<sub>Pa</sub></i> de <i>E. coli</i> XL1Blue digerido com <i>EcoRI</i> ; 4--(T2) pBBR1MCS-2:: <i>phaJ1<sub>Pa</sub></i> de <i>E. coli</i> XL1Blue digerido com <i>EcoRI</i> ; 5- (T1) pBBR1MCS-2:: <i>phaJ1<sub>Pa</sub></i> de <i>E. coli</i> XL1Blue digerido com <i>Sall</i> ; 6-(T2) pBBR1MCS-2:: <i>phaJ1<sub>Pa</sub></i> de <i>E. coli</i> XL1Blue digerido com <i>Sall</i> . O pBBR1MCS-2 digerido apresenta tamanho próximo de 5,0 kb, o pGEM de 3,0 kb e o gene <i>phaJ1<sub>Pa</sub></i> possui aproximadamente 0,6 kb.....	<b>78</b>
<b>Figura 5.10-</b>	Perfil de migração em gel de agarose 0,8% mostrando os plasmídios pBBR1MCS-2 portando o gene <i>phaJ4</i> de <i>P. aeruginosa</i> extraídos de recombinantes: 1- Marcador GeneRuler <sup>TM</sup> 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas); 2- pGEM:: <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> de <i>E. coli</i> XL1Blue digerido com <i>EcoRI</i> ; 3-(A3) pBBR1MCS-2:: <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> de <i>E. coli</i> XL1Blue digerido com <i>EcoRI</i> ; 4-(A3) pBBR1MCS-2:: <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> de <i>E. coli</i> XL1Blue digerido com <i>Sall</i> ; 5-(B1) pBBR1MCS-2:: <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> de <i>E. coli</i> XL1Blue digerido com <i>EcoRI</i> ; 6-(B1) pBBR1MCS-2:: <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> de <i>E. coli</i> XL1Blue digerido com <i>Sall</i> ; 7-(B3) pBBR1MCS-2:: <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> de <i>E. coli</i> XL1Blue digerido com <i>EcoRI</i> ; 8-(B3) pBBR1MCS-2:: <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> de <i>E. coli</i> XL1Blue digerido com <i>Sall</i> ; 9-(B4) pBBR1MCS-2:: <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> de <i>E. coli</i> XL1Blue digerido com <i>EcoRI</i> ; 10-(B4) pBBR1MCS-2:: <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> de <i>E. coli</i> XL1Blue digerido com <i>Sall</i> . O pBBR1MCS-2 digerido apresenta tamanho	<b>79</b>

	próximo de 5,0 kb, o pGEM de 3,0 kb e o gene <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> possui aproximadamente 0,6 kb.....	
<b>Figura 5.11-</b>	Perfil de migração em gel de agarose 0,8% mostrando os plasmídios pBBR1MCS-2 portando o gene <i>phaJ4</i> de <i>P. aeruginosa</i> extraídos de recombinantes: 1- Marcador GelPilot <sup>R</sup> 1 kb Ladder (QUIAGEN); 2- pBBR1MCS-2; 3- LFM939 pBBR1MCS-2:: <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> de <i>B. sacchari</i> digerido com <i>EcoRI</i> ; 4-LFM 940 pBBR1MCS-2:: <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> de <i>B. sacchari</i> digerido com <i>EcoRI</i> ; 5- pBBR1MCS-2; 6-LFM 937 pBBR1MCS-2:: <i>phaJ1<sub>Pa</sub></i> de <i>B. sacchari</i> digerido com <i>EcoRI</i> ; 7-LFM 938 pBBR1MCS-2:: <i>phaJ1<sub>Pa</sub></i> de <i>B. sacchari</i> digerido com <i>EcoRI</i> . O pBBR1MCS-2 digerido apresenta tamanho próximo de 5,0 kb e os genes <i>phaJ1<sub>Pa</sub></i> e <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> possuem tamanho aproximado de 0,6 kb.....	<b>81</b>
<b>Figura 5.12-</b>	Gráficos do perfil de acúmulo de PHA total e monômeros 3HB e 3HHx por <i>Burkholderia sacchari</i> linhagem abrigando plasmídio vazio e recombinantes a partir de glicose e ácido hexanóico (o número após a sigla indica a concentração de glicose e/ou ácido hexanóico utilizada).....	<b>85</b>
<b>Figura 5.13-</b>	Gráficos do perfil de acúmulo de PHA total e monômeros 3HB e 3HHx por <i>Burkholderia sacchari</i> linhagem abrigando plasmídio vazio e recombinantes a partir de glicose e ácido octanóico.....	<b>89</b>
<b>Figura 5.14-</b>	Gráficos do perfil de acúmulo de PHA total e monômeros 3HB e 3HHx por <i>Burkholderia sacchari</i> linhagem abrigando plasmídio vazio e recombinantes a partir de glicose e ácido butírico.....	<b>94</b>
<b>Figura 5.15-</b>	Espectro de cromatografia gasosa indicando a presença dos picos (tempos de retenção em minutos) de 3HB e 3HHx.....	<b>97</b>
<b>Figura 5.16-</b>	Espectro de massas relativos a propil-ésteres de 3-hidroxiacanoatos. A. 3-hidroxi-butiril-propil-éster. B. 3-hidroxi-hexanoil-propil-éster.....	<b>98</b>
<b>Figura 5.17-</b>	Espectro de ressonância magnética de <sup>13</sup> C (A) e <sup>1</sup> H (B) de P(3HB-co-0,6mol%3HHx) produzido por <i>B. sacchari</i> .....	<b>99</b>
<b>Figura E.1 -</b>	Plasmídio pBBR1MCS-2 evidenciando os sítios de restrição da região MCS.110.....	<b>126</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1-</b>	Classes de PHA sintases.....	<b>25</b>
<b>Tabela 2.2-</b>	Comparação entre as propriedades físicas e térmicas de diferentes polímeros.....	<b>29</b>
<b>Tabela 4.1-</b>	Bactérias e plasmídios utilizados no trabalho.....	<b>39</b>
<b>Tabela 4.2-</b>	Combinações de glicose e ácido hexanóico no MM utilizado nos ensaios de acúmulo de PHA.....	<b>43</b>
<b>Tabela 5.1-</b>	Produção de PHA por <i>Burkholderia sacchari</i> linhagem selvagem (LFM 101) a partir de glicose e ácido hexanóico.....	<b>55</b>
<b>Tabela 5.2-</b>	Produção de PHA por <i>Burkholderia sacchari</i> linhagem selvagem (LFM 101) a partir de glicose e ácido octanóico.....	<b>59</b>
<b>Tabela 5.3-</b>	Produção de PHA por <i>Burkholderia sacchari</i> linhagem selvagem (LFM 101) a partir de glicose e ácido butírico.....	<b>61</b>
<b>Tabela 5.4-</b>	Produção de PHA por mutantes $hx^-$ de <i>Burkholderia sacchari</i> obtidos por UV e transposon mini- <i>Tn5</i> a partir de glicose e ácido hexanóico.....	<b>70</b>
<b>Tabela 5.5-</b>	Produção de PHA por recombinantes de <i>Burkholderia sacchari</i> abrigando o gene <i>phaB<sub>Re</sub></i> (LFM841 e LFM842) a partir de glicose e ácido hexanóico.....	<b>83</b>
<b>Tabela 5.6-</b>	Produção de PHA por recombinantes de <i>Burkholderia sacchari</i> abrigando os genes <i>phaJ1<sub>Pa</sub></i> ou <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> a partir de glicose e ácido hexanóico.....	<b>84</b>
<b>Tabela 5.7-</b>	Produção de PHA por recombinantes de <i>Burkholderia sacchari</i> abrigando o gene <i>phaB<sub>Re</sub></i> e a partir de glicose e ácido octanóico.....	<b>92</b>
<b>Tabela 5.8-</b>	Produção de PHA por recombinantes de <i>Burkholderia sacchari</i> abrigando os genes <i>phaJ1<sub>Pa</sub></i> ou <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> a partir de glicose e ácido octanóico.....	<b>93</b>
<b>Tabela 5.9-</b>	Produção de PHA por recombinantes de <i>Burkholderia sacchari</i> abrigando o gene <i>phaB<sub>Re</sub></i> (LFM841 e LFM842).a partir de glicose e ácido butírico.....	<b>94</b>

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Polihidroxicanoatos.....	19
2.2	Como os PHA são sintetizados pelas bactérias.....	20
2.2.1	Enzimas envolvidas na síntese de PHA.....	23
2.2.1.1	$\beta$ - Cetotiolase.....	23
2.2.1.2	Acetoacetyl-CoA redutase NADPH dependente .....	24
2.2.1.3	PHA sintase.....	25
2.2.2	Biossíntese de PHA de cadeia curta (PHA <sub>SCL</sub> ).....	26
2.2.3	Biossíntese de PHA de cadeia média (PHA <sub>MCL</sub> ).....	27
2.3	Composição monomérica associada às propriedades dos PHA.....	28
2.3.1	Aplicações P(3HB- <i>co</i> -3HHx).....	31
2.4	Bactérias produtoras de P(3HB- <i>co</i> -3HHx).....	32
2.5	A produção de PHA por <i>Burkholderia sacchari</i> seu potencial para a produção de P3HB- <i>co</i> -3HHx.....	33
2.6	Uso de bactérias recombinantes para a produção de P3HB- <i>co</i> -3HHx.....	35
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	Objetivo geral.....	38
3.2	Objetivos específicos.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	Microrganismos, plasmídios e genes.....	39
4.2	Condições e meios de cultivo.....	40
4.2.1	Composição dos meios de cultura.....	41
4.2.1.1	Caldo nutriente (CN) ou ágar nutriente (AN).....	41
4.2.1.2	Luria Bertani (LB) .....	41
4.2.1.3	Meio mineral (MM) .....	42
4.2.2	Preservação das linhagens bacterianas.....	42
4.3	Experimentos de acúmulo de PHA .....	43
4.3.1	Crescimento e acúmulo de polímero em maior escala.....	44
4.4	Obtenção de mutantes UV deficientes no consumo de ácido hexanóico (hx <sup>-</sup> ). .....	44
4.4.1	Curva de crescimento.....	45
4.4.2	Curva de sobrevivência à radiação.....	45
4.4.3	Determinação da concentração de ácido hexanóico inibitória ao crescimento.....	45
4.4.4	Mutação por radiação UV e seleção de clones de <i>B. sacchari</i> deficientes no consumo de ácido hexanóico (hx <sup>-</sup> ).....	46
4.5	Mutação por transposon e seleção de clones de <i>B. sacchari</i> deficientes no consumo de ácido hexanóico (hx <sup>-</sup> ).....	47
4.6	Manipulação de DNA.....	48
4.6.1	Extração plasmidial.....	48
4.6.2	Digestão com enzimas de restrição.....	48
4.6.3	Ligação de fragmentos de DNA.....	48
4.6.4	Transferência de plasmídios por transformação.....	48
4.6.5	Construção de linhagens recombinantes de <i>Burkholderia sacchari</i> .....	49
4.6.6	Análise de DNA em géis de agarose.....	50

4.7	Métodos analíticos.....	50
4.7.1	Determinação de pH.....	50
4.7.2	Determinação de biomassa.....	50
4.7.3	Determinação de PHA.....	51
4.7.3.1	Determinação qualitativa pelo emprego de corantes indicadores de acúmulo de PHA.....	51
4.7.3.2	Determinação quantitativa por cromatografia gasosa.....	51
4.7.4	Extração e purificação do polímero e caracterização.....	52
4.7.5	Análise de propriedades do polímero.....	53
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
5.1	Experimentos de acúmulo de PHA com <i>B. sacchari</i> selvagem.....	54
5.2	Obtenção de mutantes de <i>B. sacchari</i> afetados no crescimento em ácido hexanóico (hx <sup>-</sup> ).....	62
5.2.1	Obtenção de mutantes hx <sup>-</sup> por irradiação UV.....	62
5.2.1.1	Avaliação da sobrevivência de <i>B. sacchari</i> à radiação UV.....	62
5.2.1.2	Concentração de ácido hexanóico inibitória ao crescimento.....	63
5.2.1.3	Seleção de clones mutantes UV hx <sup>-</sup> (sac <sup>+</sup> /gli <sup>+</sup> ).....	65
5.2.2	Seleção de clones hx <sup>-</sup> (sac <sup>+</sup> /gli <sup>+</sup> ) mutados por transposon.....	66
5.2.3	Avaliação da produção de PHA pelos mutantes.....	67
5.3	Construção de linhagens recombinantes de <i>Burkholderia sacchari</i> portando genes de outros microrganismos.....	74
5.3.1	Construção de <i>Burkholderia sacchari</i> abrigando <i>phaB<sub>Re</sub></i> .....	75
5.3.2	Construção de <i>Burkholderia sacchari</i> abrigando <i>phaJ1<sub>Pa</sub></i> e <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> .....	76
5.3.2.1	Montagem e inserção de pBBR1MCS-2:: <i>phaJ1<sub>Pa</sub></i> ou pBBR1MCS-2:: <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> , em <i>E. coli</i> XL1 Blue.....	77
5.3.2.2	Inserção de pBBR1MCS-2:: <i>phaJ1<sub>Pa</sub></i> ou pBBR1MCS-2:: <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> , em <i>Burkholderia sacchari</i> .....	80
5.4	Avaliação da produção de PHA por linhagens recombinante.....	80
5.5	Caracterização e análise das propriedades térmicas do polímero produzido por <i>Burkholderia sacchari</i> .....	96
5.5.1	Caracterização por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (CG-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN).....	96
5.5.2	Análise das propriedades térmicas por Thermogravimetry analysis (TGA) Dynamical mechanical analysis (DMA) e Differential scanning calorimetry (DSC).....	100
6	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>103</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>106</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>122</b>



# 1 INTRODUÇÃO

Os polihidroxicanoatos (PHA) compõem um grupo bastante diversificado de polímeros acumulados por grande número de bactérias (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995). São termoplásticos, biodegradáveis e biocompatíveis, cuja produção e aplicabilidade vêm sendo estudadas em todo o mundo. Estas características permitem o uso destes materiais em diversas aplicações, como substitutos dos plásticos convencionais, de origem petroquímica, tornando-os uma alternativa ambientalmente correta, considerando-se os impactos sobre o meio-ambiente (BYROM, 1990; SUDESH *et al.*, 2000; NONATO *et al.*, 2001).

A síntese de PHA depende três fatores principais: das vias metabólicas presentes nas bactérias produtoras, do tipo de PHA sintase bacteriano – enzima-chave para a biossíntese de PHA - e da fonte de carbono fornecida no momento de acúmulo. De acordo com o substrato fornecido, as vias metabólicas darão origem a diversos hidroxiacil-CoA que poderão ou não ser incorporados ao polímero, de acordo com a especificidade da PHA sintase microbiana (REHM, 2003).

A partir disso, dois grupos distintos de PHA são descritos: PHA contendo monômeros de cadeia curta (PHA<sub>SCL</sub>), tendo como representante principal o poli-3-hidroxiбутirato (P3HB) e PHA contendo monômeros de cadeia média (PHA<sub>MCL</sub>). As propriedades mecânicas P3HB limitam suas aplicações, pois se trata de um material quebradiço, de baixo alongamento até a ruptura, apenas 5%. A incorporação de apenas 6 mol% de monômeros HA<sub>MCL</sub> a um PHA contendo 3HB como principal constituinte permite obter um material com alongamento até a ruptura superior a 600% (SUDESH *et al.*, 2000). Deste modo, uma estratégia interessante para obtenção de materiais com propriedades intermediárias entre o P3HB e PHA<sub>MCL</sub> seria a obtenção de copolímeros híbridos.

Um PHA que emerge como copolímero com propriedades físicas intermediárias resulta da combinação de P3HB com 3-hidroxi-hexanoato (P3HB-*co*-3HHx). Alguns copolímeros híbridos de P3HB e outros monômeros têm sido descritos na literatura e em patentes recentes, com maior ênfase para o (3HHx) (LIANGQ *et al.*, 2006). As propriedades lhe conferem maior biocompatibilidade, isto torna estas matérias promissoras para aplicações como suporte ou molde para na engenharia de tecidos e outras aplicações médicas (WU *et al.*, 2009). Seu uso foi reportado na confecção tecidos cartilagosos híbridos (YANG *et*

*al.*, 2002), em culturas de células ósseas (YANG *et al.*, 2004), válvulas aórticas híbridas (WU *et al.*, 2007), além disso, estes copolímeros de P(3HB-*co*-3HHx) têm sido alvo de diferentes patentes apresentadas pela empresa Procter e Gamble (NODA e BOND, 2002; NODA e SATKOWSKI, 2003; NODA *et al.*, 2005; HASSAN *et al.*, 2006), indicando interesse industrial pela sua produção. O gênero *Aeromonas* foi descrito como a primeira linhagem capaz de sintetizar o copolímero P(3HB-*co*-3HHx) a partir de ácido alcanóico e óleos vegetais (LU *et al.*, 2003). Estudos já revelaram que o copolímero P(3HB-*co*-3HHx) possui propriedades mecânicas similares ao polietileno de baixa densidade (LDPE), e se torna cada vez mais maleável com o aumento de unidades 3HHx (XIE e CHEN, 2007).

Com o intuito de se obter o maior número possível de aplicações para os PHA, estudos vêm sendo realizados buscando-se a combinação dos três pontos chave para a síntese destes poliésteres obter polímeros sob medida para as mais variadas aplicações (GOMEZ *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2007). As abordagens que podem ser empregadas envolvem estudos para alterar a especificidade das PHA sintases, a busca de novos microrganismos com novas PHA sintases, a obtenção de linhagens recombinantes, abrigando genes modificados que favoreçam o redirecionamento dos fluxos metabólicos ou o estudo destas enzimas de organismos conhecidos frente a diversos substratos ou condições que favoreçam a obtenção destes materiais (AMARA *et al.*, 2002; BUFFONI *et al.*, 2005; BUFFONI, 2006; SILVA *et al.*, 2007).

Assim, o estudo de microrganismos ou condições que levem à produção de copolímeros como P(3HB-*co*-3HHx) oferece um diversificado campo para a obtenção de polímeros com propriedades especiais, bem como para a avaliação ou modificação da real especificidade das enzimas descritas até o momento.

Estudos realizados recentemente indicaram que *Burkholderia sacchari*, uma bactéria isolada no país, pode ter a capacidade de acumular o copolímero P(3HB-*co*-3HHx). Cerca de trinta diferentes compostos foram oferecidos a esta bactéria, sob condições de acúmulo, em meio de cultura contendo também glicose como co-substrato. A avaliação da natureza do material produzido, indicou a presença de um polímero com unidades 3HB e 3HHx, quando se ofereceu ácido hexanóico (BUFFONI *et al.*, 2005; BUFFONI, 2006).

Tendo em vista o exposto acima, propôs-se o presente trabalho com o intuito de confirmar a produção de P(3HB-*co*-3HHx) por *B. sacchari*, bem como estudar condições apropriadas para o aumento ou modificação da fração 3HHx no copolímero. As estratégias abordadas envolveram (i) fornecimento de teores variáveis de ácido hexanóico à linhagem

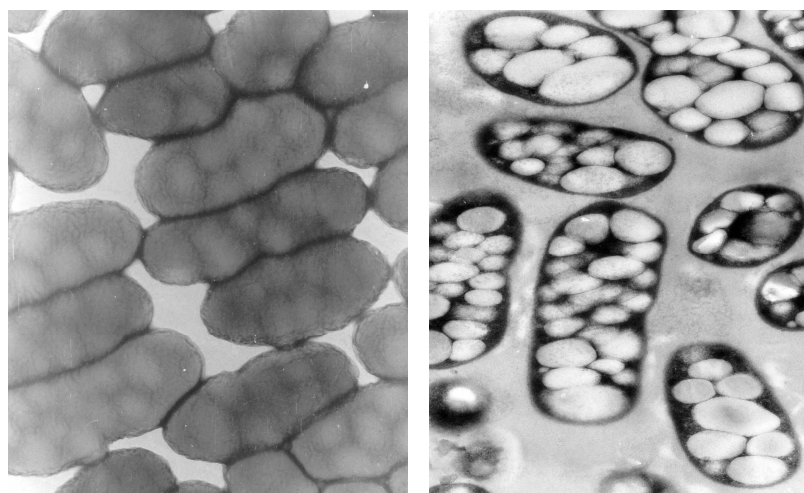
selvagem; (ii) obtenção de mutantes incapazes de crescer em ácido hexanóico, mas capazes de incorporá-lo ao PHA e (iii) introdução de genes portadores de enzimas que direcionem intermediários da via de catabolismo do ácido hexanóico para a formação de 3HHx.

Dois genes foram selecionados para esta última abordagem. Um deles é o gene codificador da enzima acetoacetyl-CoA redutase de *R. eutropha* (*phaB<sub>Re</sub>*) e o outro produz a enoil-CoA hidratase (*R*)-específica de *Pseudomonas aeruginosa*. Espera-se que o primeiro faça a redução de 3-cetoacil-CoA e, o segundo, promova a drenagem de *trans*-2-enoil-CoA, ambos intermediários da  $\beta$ -oxidação, ao (*R*)-3-hidroxiacil-CoA para a síntese de P(3HHx).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Polihidroxialcanoatos

Polihidroxialcanoatos (PHA) constituem uma família de poliésteres produzidos e armazenados por diversos microrganismos sob a forma de grânulos intracelulares (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995; GOMEZ e BUENO NETTO, 2001), como pode ser observado na figura 1.



**Figura 2.1-** Microscopia eletrônica de uma célula de *Wautersia eutropha* após acúmulo de polímero na forma de grânulos (Foto: RITA DE CÁSSIA PARO ALLI).

Os grânulos intracelulares de PHA são acumulados de forma mais expressiva sob condições desbalanceadas de crescimento, quando há excesso de fonte de carbono disponível e limitação de pelo menos um nutriente essencial para a multiplicação celular, como nitrogênio, fósforo ou magnésio (BRANDL *et al.*, 1990). Estes grânulos podem atingir até cerca de 80% da massa seca celular e, para o microrganismo acumulador, servirão como fontes de energia, carbono e equivalentes redutores quando os elementos essenciais estiverem novamente disponíveis, permitindo o crescimento celular (ANDERSON e DAWES, 1990).

A descoberta desse grupo de polímeros é atribuída ao microbiologista Maurice Lemoigne do Instituto Pasteur de Paris e data de 1923, quando a presença de polihidroxibutirato (P3HB) foi observada em uma bactéria do gênero *Bacillus* (LEMOIGNE, 1926). Apenas ao final da década de 1950, é que a função destes grânulos

como reserva de carbono e energia passa a ser aceita e, também neste período, descobre-se que a ocorrência destes biopolímeros é algo natural entre a maioria das linhagens bacterianas Gram-negativas (LENZ e MARCHESSAULT, 2005). Essa descoberta passou por muitas décadas como curiosidade acadêmica, mas em 1962 foram publicadas as primeiras patentes apresentando as propriedades termoplásticas destes materiais (BAPTIST 1962a; 1962b).

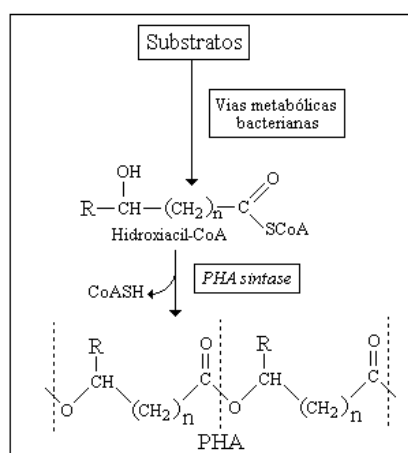
Durante muitos anos, P3HB permaneceu como único polímero conhecido. Em 1964, Davis identificou o ácido 3-hidroxi-2-butenóico como constituinte de PHA produzido por uma bactéria do gênero *Nocardia* (WALLEN e DAVIS, 1972). Por volta de 1974, Wallen e Rohwedder identificaram a presença de outros monômeros diferentes do 3HB em amostras de lodo ativado, dentre os quais 3-hidroxi valerato (3HV) e 3-hidroxi hexanoato (3HHx). Anos mais tarde, Findlay e White (1983) demonstravam a presença de unidades 3HB, 3-hidroxi heptanoato (3HHp) e 3-hidroxi octanoato (3HO) no polímero extraído de *Bacillus megaterium* (SUDESH *et al.*, 2000). Na década de 80, um número crescente de outros constituintes de PHA foi identificado (DE SMET *et al.*, 1983; BRANDL *et al.*, 1988; LAGEVEEN *et al.*, 1988; HUISMAN *et al.*, 1989; DOI, 1990; STEINBÜCHEL e SCHLEGEL, 1991).

No Brasil, o impulso para este estudo ocorreu no início da década de 90, quando teve início o projeto “Produção de plásticos biodegradáveis a partir de cana-de-açúcar, por via biotecnológica” que foi desenvolvido em cooperação pelo Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), o Centro de Tecnologia da Copersucar e o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (este, associado à Universidade Federal da Paraíba) (SILVA *et al.*, 2007).

## **2.2 Como os PHA são sintetizados pelas bactérias**

A biossíntese de PHA tem sido amplamente estudada em diversas bactérias e depende de três fatores principais: da fonte de carbono fornecida no momento de acúmulo, das vias metabólicas presentes nas bactérias produtoras e do tipo de PHA sintase bacteriano, conforme pode ser verificado na figura 2.2. De acordo com o substrato fornecido, as vias metabólicas darão origem a diversos hidroxilacil-CoA (SILVA *et al.*

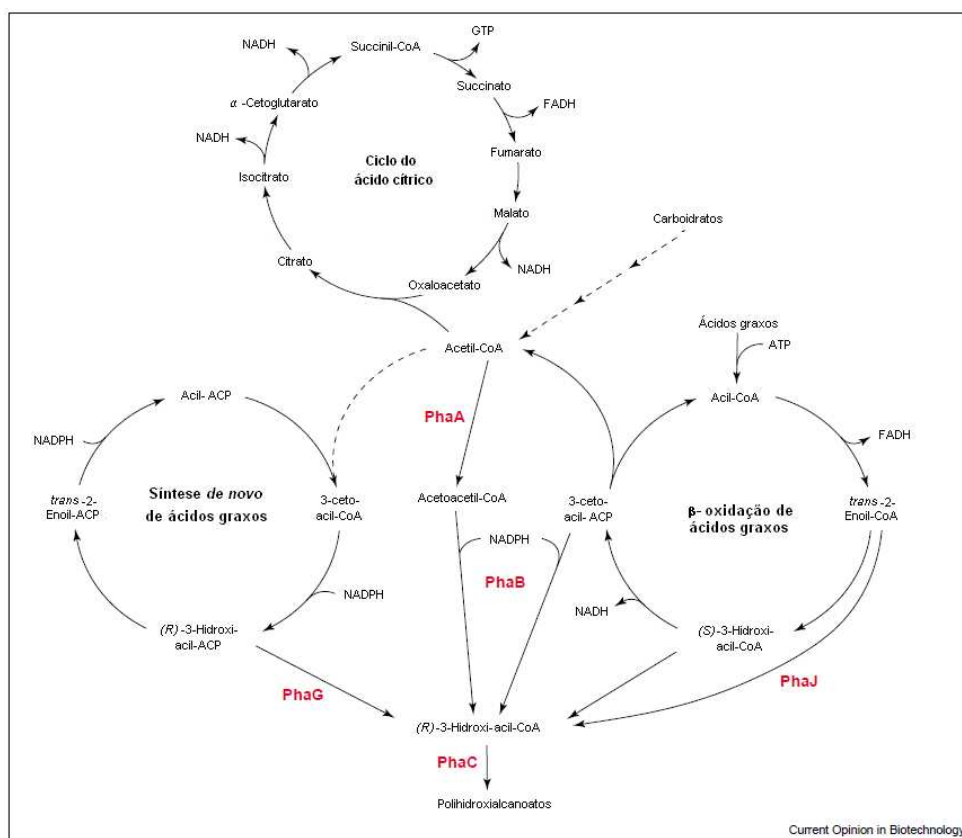
2007) que poderão ou não ser incorporados ao polímero, de acordo com a especificidade da PHA sintase microbiana (REHM, 2003). Esta enzima é responsável pela polimerização dos hidroxiaxil-CoA formando o poliéster que constituirá os grânulos acumulados pelas bactérias.



**Figura 2.2-** Esquema da síntese de PHA em bactérias (GOMEZ e BUENO-NETTO, 2001).

Uma grande variedade de substratos tem sido testada como matéria-prima para a produção de PHA, associada ao emprego de diversas espécies bacterianas (DOI *et al.*, 1987; KUNIOKA *et al.*; 1989; LENZ *et al.*, 1990; VALENTIN *et al.*, 1992; FÜCHTENBUSCH *et al.*, 1996; FÜCHTENBUSCH *et al.*; 1998, LÜTKE-EVERSLOH *et al.*, 2002; BUFFONI, 2006; SILVA *et al.*, 2007). Entre tais matérias-primas, podem ser citadas como exemplo, o uso de fontes de fácil renovação como carboidratos e óleos vegetais (BYROM, 1990; BRAUNEGG *et al.*, 1998; REN *et al.*, 1998; NONATO *et al.*, 2001).

Estes substratos podem ser submetidos a uma das três vias mencionadas a seguir até gerar moléculas de hidroxiaxil-CoA: quebra de carboidratos, quebra de ácidos graxos e biossíntese *de novo* de ácidos graxos (Figura 2.3). Os hidroxiaxil-CoA assim produzidos são incorporados ao polímero pela ação de uma PHA sintase específica, que catalisa a ligação dos monômeros por transesterificação (WITHOLT e KESSLER, 1999).



**Figura 2.3** Biossíntese de PHA no contexto do metabolismo microbiano (Figura adaptada de ALDOR e KEASLING, 2003). Vias metabólicas para síntese de PHA<sub>SCL</sub> (polímeros com monômeros de 4 a 5 carbono) e PHA<sub>MCL</sub> (polímeros com monômeros de 6 a 14). Abreviações: PhaA – 3-cetotilase; PhaB – 3-cetoacil-CoA redutase (para biossíntese de PB esta enzima é acetoacetyl-CoA redutase); PhaC – PHA sintase ou polimerase; PhaG – (R)-3-hidroxiacil-CoA:ACP transacilase; PhaJ – enoil-CoA hidratase (R) específica. As linhas tracejadas representam passos metabólicos não incluídos. PhaC é específica para monômeros na configuração (R).

A PHA sintase é considerada a enzima chave para a formação de PHA, pois catalisa a polimerização de unidades (R)-3-hidroxiacil-CoA (STEINBÜCHEL, 1996; SOLAIMAN e ASHBY, 2005). A partir disso, são definidos dois grandes grupos de PHA gerados por estas enzimas: PHA<sub>SCL</sub> (do inglês ‘short chain length’) que contém monômeros (HA<sub>SCL</sub>) com 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal e PHA<sub>MCL</sub> (‘medium chain length’) constituídos por monômeros (HA<sub>MCL</sub>) contendo de 6 a 16 átomos de carbono na cadeia principal (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995). PHA<sub>SCL</sub> são encontrados em bactérias pertencentes aos mais diversos grupos taxonômicos, enquanto PHA<sub>MCL</sub> são produzidos por diferentes espécies do gênero *Pseudomonas* (STEINBÜCHEL, 1991). A capacidade de acumular PHA contendo HA<sub>MCL</sub> e HA<sub>SCL</sub> em uma mesma cadeia polimérica também foi observada em alguns casos (LIEBERGESELL *et al.*, 1993; ABE *et al.*, 1994; KOBAYASHI *et al.*, 1994; VALENTIN *et al.*, 1994; VALENTIN *et al.*, 1996; ANTONIO *et al.*, 2000).

## 2.2.1 Enzimas envolvidas na síntese de PHA

As enzimas caracterizadas como responsáveis pela biossíntese dos monômeros 3HB a partir de acetil-CoA foram primeiramente descritas e amplamente estudadas em *R. eutropha*. São elas:  $\beta$ -cetotiolase, 3- cetoacil-CoA redutase NADPH dependente e a PHA sintase. Cada uma dessas enzimas tem um papel diferente na biossíntese, sendo que a  $\beta$ -cetotiolase é a enzima chave para regulação desta via metabólica. Estas enzimas serão comentadas a seguir. Outras enzimas, posteriormente identificadas serão comentadas nos itens posteriores.

### 2.2.1.1 $\beta$ - Cetotiolase

A  $\beta$ -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. Assim, a alta concentração celular de CoASH faz com que a reação ocorra no sentido contrário ao da biossíntese de PHA (OEDING E SCHLEGEL, 1973, LAFFERTY *et al.*, 1988).

Em condições balanceadas de crescimento, nas quais todos os nutrientes necessários à multiplicação celular estão disponíveis, espera-se que os níveis de CoASH sejam altos, devido à grande demanda por grupos acetil pelo ciclo de Krebs para formação de esqueletos carbônicos e energia. Segundo alguns autores, CoASH tem efeito inibitório sobre a enzima  $\beta$ -cetotiolase, impedindo deste modo a síntese de P3HB (OEDING e SCHLEGEL, 1973, SENIOR e DAWES, 1973). Quando algum nutriente se torna limitante à multiplicação de bactéria, a demanda por acetil-CoA diminui e com isso os níveis de CoASH se tornam reduzidos, diminuindo a inibição sobre a enzima  $\beta$ -cetotiolase e desencadeando a síntese de P3HB (ANDERSON e DAWES, 1990; STEINBÜCHEL, 1991).



Haywood e colaboradores (1988a, b) isolaram duas enzimas  $\beta$ -cetotiolases em *Ralstonia eutropha*, denominando-as A e B. A enzima B apresentou atividade com moléculas de 3-cetoacil-CoA de cadeia de 4 a 10 átomos de carbono, devendo estar envolvida na degradação de ácidos graxos. A enzima A apresentou atividade apenas com 3-cetoacil-CoA contendo 4 e 5 átomos de carbono e foi evidenciado seu envolvimento na síntese de P3HB. Mais tarde, Slater e colaboradores (1998) determinaram que *R. eutropha* possui no mínimo três enzimas  $\beta$ -cetotiolases diferentes, cujos genes codificadores são designados *phaA*, *bktB* e *bktC*. *PhaA* é cataliticamente mais ativa, porém forma essencialmente acetoacetyl-CoA (intermediário com 4 carbonos, produto da condensação de duas moléculas de acetyl-CoA). A enzima codificada pelo gene *bktB* tem papel importante na formação de 3-cetovaleril-CoA (intermediário com 5 carbonos, produto da condensação de acetyl-CoA e propionil-CoA). *BktC* parece contribuir menos para a formação de 3-cetovaleril-CoA e, juntamente com *BktB* pode funcionar durante a degradação de ácidos graxos.

### 2.2.1.2 Acetoacetyl-CoA redutase NADPH dependente

Foram detectadas duas enzimas acetoacetyl-CoA redutase em *R. eutropha*: uma NADPH dependente e outra NADH dependente. Ambas foram estudadas quanto a sua atividade na reação reversa (oxidação), demonstrando que a enzima NADPH dependente catalisa a oxidação de (*R*) 3-hidroxiacil-CoA de cadeia com 4 a 6 átomos de carbono, enquanto que a enzima NADH dependente é ativa com moléculas de (*R*) e (*S*) 3-hidroxiacil-CoA de cadeia curta e média (4 a 10 átomos de carbono). No entanto, na reação de redução, esta enzima forma apenas moléculas de (*S*)-3-hidroxiacil-CoA, portanto não deve participar da via de biossíntese de PHA, uma vez que não forma o substrato da enzima seguinte. Assim, na biossíntese de P3HB, a enzima acetoacetyl-CoA redutase e NADPH dependente são as responsáveis pela redução estereoespecífica da molécula de acetoacetyl-CoA a (*R*)-3-hidroxiacil-CoA. O gene codificador desta enzima é denominado *phbB*. Nenhuma das duas redutase detectadas parece ser regulada por nenhum outro metabólito (HAYWOOD *et al.*, 1988a; HAYWOOD *et al.*, 1988b).

### 2.2.1.3 PHA sintase

Foi observado que existe similaridade entre as estruturas primárias de PHA sintases de diferentes microrganismos. De acordo com a estrutura primária das seqüências dos genes codificadores e da especificidade pelo substrato, estas enzimas foram divididas em 4 classes (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995; REHM, 2003; REHM, 2006; REHM, 2007), como mostra a Tabela 1, que apresenta também as suas respectivas unidades características, espécies microbianas típicas e substrato preferencial.

**Tabela 2.1-** Classes de PHA sintases (REHM, 2003).

Classe	Subunidades	Espécies	Substrato
I	PhaC ~60-73 kDa	<i>Ralstonia eutropha</i>	3HA <sub>SCL</sub> -CoA (~ C <sub>3</sub> a C <sub>5</sub> )
			4HA <sub>SCL</sub> -CoA
			5HA <sub>SCL</sub> -CoA, 3MA <sub>SCL</sub> -CoA
II	PhaC ~60-65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3HA <sub>MCL</sub> -CoA (~ ≥C <sub>5</sub> )
III	PhaC - PhaE ~40 kDa ~40kDa	<i>Allochromatium vinosum</i>	3HA <sub>SCL</sub> -CoA
			3HA <sub>MCL</sub> -CoA (~C <sub>6</sub> -C <sub>8</sub> ) 4HA-CoA, 5HA-CoA
IV	PhaC - PhaR ~40kDa ~22kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	3HA <sub>SCL</sub> -CoA

PHA sintases da classe I apresentam especificidade por HA<sub>SCL</sub>, raramente incorporando HA<sub>MCL</sub>. Consistem de um único polipeptídeo e são encontradas em diversas bactérias, como *Ralstonia eutropha* (PEOPLES e SINSKEY, 1989), *Rhodococcus ruber* (PIEPER e STEINBÜCHEL, 1992), *Rhodobacter sphaeroides* e (HUESTEDE e STEINBÜCHEL; 1993) *Methylobacterium extorquens* (VALENTIN e STEINBÜCHEL, 1993).

PHA sintases da classe II constituem-se de um único polipeptídeo e apresentam especificidade por HA<sub>MCL</sub>, dificilmente incorporando HA<sub>SCL</sub>. São encontradas em espécies de *Pseudomonas*: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oleovorans* e *Pseudomonas putida* (HUISMAN *et al.*, 1989; HUISMAN *et al.*, 1991; TIMM e STEINBÜCHEL; 1992).

A classe III de PHA sintases compreende enzimas com especificidade para  $HA_{SCL}$ , constituídas de duas subunidades polipeptídicas (i) subunidade PhaC que contém uma seqüência de aminoácidos com similaridade de 21 a 28% das PHA sintases da classe I e II, (ii) subunidade PhaE que não tem nenhuma similaridade com as PHA sintases. É encontrada em *Allochromatium vinosum*.

A classe IV de PHA sintases é encontrada em bactérias do gênero *Bacillus sp* e também são constituídas de duas subunidades protéicas como as de classe III, mas a subunidade PhaE é substituída pela subunidade PhaR (MCCOOL e CANNON, 2001) As subunidades PhaE e PhaR apresentam somente 18% de identidade entre as seqüências de seus aminoácidos (SATOH *et al.*, 2002).

No que se refere à especificade pelo substrato, existem duas exceções a esta classificação. Uma é a PHA sintase de *Thiocapsa pfennigii*, que, embora seja semelhante a PHA sintases da classe III, é caracterizada pela capacidade de incorporar um amplo espectro de  $HA_{SCL}$  e  $HA_{MCL}$  (LIEBERGESELL *et al.*, 1993; VALENTIN *et al.*, 1994; VALENTIN *et al.*, 1996). A outra é a PHA sintase de *Aeromonas caviae* que tem um único tipo de subunidade similar à de PHA sintase do tipo I (45%). Esta última enzima catalisa a polimerização de um copoliéster de 3HB e 3HHx ( FUKUI e DOI, 1998)

## 2.2.2 Biossíntese de PHA de cadeia curta ( $PHA_{SCL}$ )

Em diversas bactérias, a biossíntese de polihidroxibutirato (P3HB), um dos homopolímeros do grupo  $PHA_{SCL}$ , a partir do catabolismo de carboidratos, por exemplo, ocorre em três passos. Inicialmente duas moléculas de acetil-CoA são condensadas para formar acetoacetil-CoA, pela ação de uma  $\beta$ -cetotiolase (PhaA, BktB) (Slater *et al.*, 1998); em seguida, acetoacetil-CoA é reduzida a (*R*)-3-hidroxitiril-CoA pela ação de uma 3-cetoacil-CoA redutase NADPH dependente (PhaB) e finalmente (*R*)-3-hidroxitiril-CoA é incorporada a uma cadeia polimérica pela ação de uma PHA sintase (PhaC), ocorrendo a liberação de Coenzima A (OEDING e SCHLEGEL, 1973; SENIOR e DAWES, 1973; ALDOR e KEASLING, 2003) (Figura 2.3). A incorporação de outros monômeros  $HA_{SCL}$  é obtida geralmente com o fornecimento de precursores estruturalmente relacionados a esses monômeros (STEINBÜCHEL, 1991).

### 2.2.3 Biossíntese de PHA de cadeia média (PHA<sub>MCL</sub>)

A síntese de PHA<sub>MCL</sub> tanto pode ocorrer a partir de fontes de carbono estruturalmente relacionadas aos monômeros (ácidos graxos, álcoois e alcanos) como a partir de outras fontes de carbono não relacionadas estruturalmente (carboidratos, por exemplo) (Figura 2.3). No primeiro caso, a fonte de carbono é metabolizada através da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos que supre os monômeros a serem incorporados pela PHA sintase (LAGEVEEN *et al.*, 1988; BRANDL *et al.*, 1988; HUIJBERTS *et al.*, 1994). A partir de fontes de carbono não relacionadas, inicialmente é formada acetil-CoA que é utilizada na biossíntese de ácidos graxos para gerar os monômeros que são incorporados ao PHA (HAYWOOD *et al.*, 1990; TIMM e STEINBUCHER, 1990; HUIJBERTS *et al.*, 1992; HUIJBERTS *et al.*, 1994). O direcionamento de intermediários da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos para PHA sintase pode ser realizado por uma enoil-CoA hidratase (TSUGE *et al.*, 2000), 3-cetoacil-CoA redutase (TAGUCHI *et al.*, 1999; REN *et al.*, 2000) ou mesmo uma epimerase (KRAAK *et al.*, 1997). Intermediários da biossíntese de ácidos graxos são direcionados a PHA sintase pela ação de uma 3-hidroxiacil-CoA:ACP transacilase (REHM *et al.*, 1998). A síntese de PHA<sub>MCL</sub> pode ocorrer utilizando intermediários da  $\beta$ -oxidação que ativa, quando são fornecidas fontes de carbono como ácidos graxos, álcoois e alcanos, cujos intermediários podem ser reconhecidos como monômeros a serem incorporados pela PHA sintase. A partir de outras fontes de carbono, carboidratos, por exemplo, é formado a acetil-CoA que é também utilizada na síntese *de novo* de ácidos graxos para gerar os monômeros que são incorporados ao PHA. O direcionamento de intermediários da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos para PHA sintase pode ser realizado por uma enoil-CoA hidratase (PhaJ, codificada por *phaJ*) ou por uma 3-cetoacil-CoA redutase (PhaB, codificada por *phaB*). Intermediários da biossíntese de ácidos graxos são direcionados a PHA sintase pela ação de uma 3-hidroxiacil-CoA:ACP transacilase (PhaG, codificada por *phaG*).

### 2.3 Composição monomérica associada às propriedades dos PHA

Uma grande diversidade de monômeros PHA<sub>SCL</sub> e PHA<sub>MCL</sub> pode constituir os polihidroxicanoatos, o que lhes confere características físicas e mecânicas diversas e, portanto aplicações variadas (DOI, 1990). Cerca de 150 monômeros distintos já foram identificados como constituintes de PHA bacterianos, sintetizados por microrganismos naturais ou recombinantes e produzidos a partir de diversas fontes de carbono (REHM e STEINBÜCHEL, 1999; REHM, 2003).

Homopolímeros se caracterizam pela presença de apenas uma unidade monomérica repetida, cujas propriedades podem ser modificadas à medida que são incorporados monômeros distintos, gerando copolímeros ou mesmo terpolímeros.

O poli-3-hidroxiбутирато (P3HB), o primeiro PHA descrito, conforme citado anteriormente, é um exemplo de homopolímero com monômeros de cadeia curta (PHA<sub>SCL</sub>). A molécula de P3HB é estereoespecífica e, por ser uma molécula quirálica, com todos os átomos de carbono assimétricos na configuração (*R*), é altamente cristalino (55-80%). Além disso, este polímero possui resistência aos raios UV superior à do polipropileno e excelente impermeabilidade ao oxigênio (HOLMES, 1988).

A inserção de monômeros de 3-hidroxiуалерато (3HV) ao P3HB foi obtida a partir do fornecimento de glicose e ácido propiônico à bactéria produtora (DOI, 1990; HOLMES, 1998; GOMEZ e BUENO NETTO, 2001). O copolímero P3HB-*co*-3HV, assim formado, cuja estrutura pode ser observada na figura 2.4, possui propriedades mecânicas melhores, já que apresenta um aumento da maleabilidade e resistência, atingindo valores de alongamento para ruptura de até cerca de 100%. Com isso é possível alcançar maior variedade de aplicações (HOLMES, 1985). A produção industrial de P3HB e P3HB-*co*-3HV já foi viabilizada no Brasil (NONATO *et al.*, 2001).

Outro copolímero composto por monômeros HA<sub>SCL</sub> é o poli (3-hidroxiбутирато-*co*-4-hidroxiбутирато) [P(3HB-*co*-4HB)]. O P(3HB-*co*-4HB) foi inicialmente obtido a partir de substratos com estrutura química diretamente relacionada a ele, tais como: ácido 4-hidroxiбутírico (KUNIOKA *et al.*, 1988),  $\gamma$ -butirolactona, 4-clorobutirato e 1,4-butanodiol (KUNIOKA *et al.*, 1989). Quando *R. eutropha* foi suprida com ácido 4-hidroxiбутírico, foi obtido um copolímero composto por 67 mol% de 3HB e 33 mol% de 4HB (KUNIOKA *et al.*, 1989). Quando ácido butírico foi adicionado como co-substrato, a fração 4HB diminuiu, indicando que sua presença no polímero varia de 0 a 33 mol% dependendo das demais

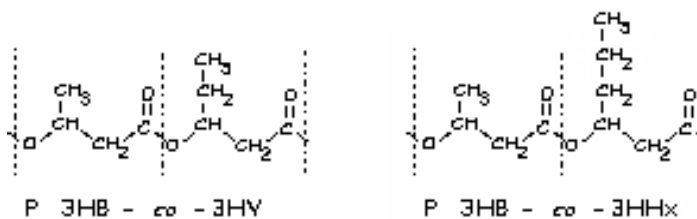
fontes de carbono supridas no meio. Observa-se que para co-polímeros compostos de 10% de 4HB a resistência à tensão cai para 24 MPa, enquanto o alongamento à ruptura aumenta para mais de 200 % (Tabela 2.2).

**Tabela 2.2-** Comparação entre as propriedades físicas e térmicas de diferentes polímeros.

Polímero	T <sub>M</sub> (°C)	T <sub>G</sub> (°C)	Resistência Tensão (MPa)	Alongamento para ruptura (%)
P(3HB)	177	4	43	5
P(3HB-co-10%HV)	150	-	25	20
P(3HB-co-20%HV)	135	-	20	100
P(3HB-co-3% 4HB)	166	-	28	45
P(3BH-co-10% 4HB)	159	-	24	242
P(3BH-co-64% 4HB)	50	-	17	591
P(3HB-co-5%HHx)	151	0	-	-
P(3HB-co-10%HHx)	127	-1	21	400
P(3HB-co-15%HHx)	115	0	23	760
P(3HB-co-17%HHx)	120	-2	20	850
P(3HB-co-19%HHx)	111	-4	-	-
P(3HB-co-25%HHx)	52	-4	-	-
PHO	61	-35	9	380
Polipropileno	170	-	34	400
Poliestireno	110	-	50	-
PET	262	-	56	7300
HDPE	135	-	29	-
HLPE	130	-30	10	620

3HB: 3-hidroxibutirato; 4HB: 4-hidroxibutirato; HV: 3-hidroxivalerato; HHx: 3-hidroxihexanoato, HO: 3-hidroxioctanoato, PET – polietileno tereftalato, HDPE – polietileno de alta densidade, HLPE – polietileno de baixa densidade, T<sub>M</sub> – temperatura de fusão; T<sub>G</sub> temperatura de transição vítrea. Fontes: HOLMES, 1988; KING, 1982; DOI *et al.*, 1995; SUDESH *et al.*, 2000; PRADELLA, 2006; CARMINATTI *et al.*, 2006

A combinação de P3HB e monômeros de HA<sub>MCL</sub>, gerando copolímeros híbridos, apresenta potencial para se obterem materiais com valores de alongamento para ruptura maiores que aqueles alcançados com a incorporação de unidades 3HV ou 4HB, chegando a valores superiores a 600% (DOI *et al.*, 1995, PRADELLA, 2006).



**Figura 2.4-** Estrutura química dos copolímeros poli (3-hidroxi butirato-*co*-3-hidrovalertato) (P3HB-*co*-3HV), composto por monômeros de cadeia curta (PHA<sub>SCL</sub>) e poli(3-hidroxi butirato-*co*-3-hidroxi hexanoato) (P3HB-*co*-3HHx), constituído de monômero de cadeia curta (PHA<sub>SCL</sub>) e média (PHA<sub>MCL</sub>).

Copolímeros híbridos de P3HB com monômeros de 3-hidroxi hexanoato (3HHx) ou ainda de 3-hidroxi octanoato (3HO) têm sido descritos na literatura e em patentes recentes, com ênfase para o 3HHx (MADISON e HIUSMAN, 1999; LIANGQ *et al.*, 2006).

Observa-se que há um decréscimo da resistência de 43 para 20MPa quando a fração de 3HHx é aumentada de 0 para 17 mol%. Em contraste, o alongamento para ruptura aumentou de 5 para 850%, tornando evidente que os copolímeros P(3HB-*co*-3HHx) (Figura 2.4) tornam-se flexíveis com o acréscimo de unidades 3HHx (Tabela 2.2). Doi e colaboradores (1995) demonstraram que copolímeros de P3HB e 3HHx produzidos por *Aeromonas caviae* atingiam valores de alongamento para ruptura de 400% com 10 mol% de 3HHx e de 850% com 17 mol% do co-monômero. PHA produzidos por *Pseudomonas* sp. 61-3 contendo P3HB e 3HA<sub>MCL</sub> com cadeias carbônicas variando de 6 a 12 átomos de carbono apresentaram alongamento para ruptura de 680% quando a fração 3HA<sub>MCL</sub> correspondia a 6% (SUDESH *et al.*, 2000).

Outro grupo resultante das associações de diferentes monômeros são os terpolímeros ou terpoliésteres, descobertos recentemente, como o P3HB-*co*-3HV-*co*-4HB parecem apresentar propriedades térmicas e mecânicas melhores do que o P3HB, P3HB-*co*-3HV e P3HB-*co*-3HHx, mas as propriedades termo-mecânicas destes polímeros ainda estão em estudo (XIE e CHENG, 2007). O terpolímero P3HB-*co*-3HV-*co*-3HHx possui uma alta temperatura de degradação térmica por volta de 248,5°C a 481,1°C se comparado com o homopolímero PHB (ZHAO e CHEN, 2007). De um modo geral, os terpolímeros têm sido aplicados em estudos de engenharia de tecidos. O P3HB-*co*-4HB-*co*-3HHx mostrou resultados satisfatórios quando utilizado associado a células mesenquimais (WEI *et al.*, 2008), o P3HB-*co*-3HV-*co*-3HHx utilizado como molde para formação de tecidos,

permite uma alta atividade de crescimento de células da pele humana (JI *et al.*, 2008). É necessário maior número de estudos para conhecer melhor as possíveis aplicações destes poliésteres.

### 2.3.1 Aplicações P(3HB-co-3HHx)

De um modo geral, dentre as aplicações potenciais dos PHA são muito variadas devido à diversidade de combinações monoméricas possíveis. Pode-se mencionar como possíveis aplicações a produção de embalagens para produtos de higiene, vasilhames para fertilizantes, vasos para mudas de plantas, produtos injetados, brinquedos, cosméticos, produtos farmacêuticos e médicos, como fios de sutura, próteses ósseas e cápsulas para liberação controlada de fármacos, entre outras (HOLMES, 1985; ELIGIO *et al.*, 1999; VASCONCELOS, 2002).

No caso de P3HB-co-3HHx suas propriedades também lhe conferem maior biocompatibilidade, tornando-o promissor para aplicações como suporte ou molde para uso em engenharia de tecidos. Seu uso tem sido reportado na confecção tecidos cartilagosos híbridos (YANG *et al.*, 2002), em culturas de células ósseas (YANG *et al.*, 2004), válvulas aórticas híbridas (WU *et al.*, 2007) ou como moldes para crescimento de células musculares em estruturas microtubulares uniaxiais (CHEN *et al.*, 2008). A utilização deste copolímero com associações visando aumentar a biocompatibilidade tem sido descrita. Exemplos recentes são a associação ao malato (Ma- P3HB-co-3HHx) (LI *et al.*, 2007) ou à hidroxiapatita, mostrando-se promissor para a reconstrução óssea (XI *et al.*, 2008). Copolímeros de P3HB-co-3HHx têm sido alvo de diferentes patentes apresentadas pela empresa Procter e Gamble (NODA e BOND, 2002; NODA e SATKOWSKI, 2003; NODA *et al.*, 2005; HASSAN *et al.*, 2006), indicando interesse industrial pela sua produção. Uma patente recente envolve o desenvolvimento de uma membrana porosa contendo uma resina de poliésteres alifáticos, entre os quais estão contemplados os polímeros de 3-hidroxi-hexanoato. Estas membranas porosas apresentam potencial aplicação no campo de artigos absorventes, como fraldas. Nestes artigos estas membranas porosas são empregadas como revestimento para prevenir o encharcamento durante o uso (MIMURA *et al.*, 2008). Mais recentemente foi avaliada sua aplicação como tubos condutores para regeneração de nervos periféricos (BIAN *et al.*, 2009).



## 2.4 Bactérias produtoras de P(3HB-co-3HHx)

Diversas iniciativas vêm sendo tomadas para incorporar diferentes monômeros ao 3HB no sentido de modificar propriedades dos PHA.

Em 1976, a empresa inglesa Imperial Chemical Industries (ICI) avaliou a produção do P3HB como uma alternativa aos plásticos gerados a partir de matérias-primas derivadas do petróleo, entretanto, observou-se que P3HB apresentava-se muito duro e quebradiço, com baixa força de impacto e decomposição térmica a temperaturas relativamente baixas, limitando suas aplicações (HOLMES, 1985). A partir da constatação de que a incorporação de unidades de 3HV ao P3HB possibilitava modular gradativamente as propriedades físicas e mecânicas do polímero produzido, ampliando suas aplicações, em 1981, foi depositada uma patente. Iniciou-se, assim, a produção de PHA, empregando *Ralstonia eutropha* como a bactéria produtora, com comercialização do homopolímero P3HB e do copolímero P3HB-co-3HV com nome comercial de Biopol<sup>®</sup> (BYROM, 1990; SILVA *et al.*, 2001).

A incorporação de 3HHx, um monômero de cadeia média, associado a 3HB foi demonstrada para algumas bactérias. Brandl e colaboradores (1989) detectaram o acúmulo de cerca de 10% da massa seca celular de PHA contendo 91,1 mol% de 3HB e 8,9 mol% de 3HHx a partir de ácido hexanóico por linhagem selvagem de *Rhodospirillum rubrum*. No mesmo ano, a produção de P3HB-co-3HHx contendo 2,2 mol% de 3HHx por *R. eutropha* foi demonstrada (GROSS *et al.*, 1989; ULMER *et al.*, 1989).

A avaliação de várias bactérias com relação à capacidade de produção de PHA a partir de óleos vegetais ou ácidos graxos revelou um isolado identificado como *Aeromonas caviae* capaz de produzir P3HB-co-3HHx contendo entre 5 e 25 mol% de 3HHx (SHIOTANI e KOBAYASHI, 1993; SHIMAMURA *et al.*, 1994; KOBAYASHI *et al.*, 1994; DOI *et al.*, 1995). *Aeromonas hydrophila* também se mostrou capaz de produzir um PHA de composição similar (LEE *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2001). A capacidade de acumular frações de 3HHx associado a 3HB foi conseguida também para *Rhodococcus ruber*, *Nocardia corallina* e *Bacillus megaterium* que acumulam P3HB-co-3HHx quando crescem em meio contendo ácido hexanóico (HAYWOOD *et al.*, 1991; DENNIS, 1994), bem como em *Comamonas testosteroni*, *Bacillus cereus* entre outras bactérias (CABALLERO *et al.*, 1995). Linhagens recombinantes de *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* e mutantes de *R. eutropha* e *Pseudomonas putida*, incapazes de acumular PHA, contendo gene da PHA sintase de *Ralstonia eutropha*, ou ainda, o mutante de *R. eutropha*

contendo gene da PHA sintase de *Aeromonas caviae* apresentaram-se eficientes no acúmulo desse copolímero a partir de ácidos graxos (DENNIS *et al.*, 1998; *et al.*, 2004).

As PHA sintases de *A. caviae*, embora capazes de incorporar monômeros 3HHx aparentemente preferem PHA<sub>SCL</sub> (FUKUI e DOI, 1997). Mesmo a primeira PHA sintase bem caracterizada, pertencente a *Ralstonia eutropha*, e originalmente, ativa para monômeros de cadeia curta (HA<sub>SCL</sub>), mais recentemente, mostrou-se capaz de incorporar pequenas quantidades de 3HHx e outras unidades ao PHA (DENNIS *et al.*, 1998; ANTONIO *et al.*, 2000). Estudos realizados recentemente indicaram que a bactéria *Burkholderia sacchari* isolada no país também pode ter a capacidade de acumular o copolímero P3HB-*co*-3HHx quando suprida com ácido hexanóico e glicose (BUFFONI, 2006).

## **2.5 A produção de PHA por *Burkholderia sacchari* seu potencial para a produção de P3HB-*co*-3HHx**

No Brasil, desde 1992, a produção de alguns tipos de PHA vem sendo estudada, destacando-se, por suas propriedades, P3HB e P3HB-*co*-3HV. Para a sua produção têm sido testadas matérias-primas renováveis pela agricultura, tais como sacarose, melado (caldo obtido da moagem da cana-de-açúcar rico em polissacarídeo), hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (rico em hemicelulose que é hidrolisada a uma mistura de açúcares como xilose, arabinose e galactose) (BUENO NETTO *et al.*, 1993; GOMEZ e BUENO NETTO, 1997; SILVA *et al.*, 2000; GOMEZ e BUENO NETTO, 2001; SILVA *et al.*, 2002a; MICHELIN RAMOS, 2003; SILVA *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2006).

Na busca por novas linhagens boas produtoras de PHA a partir de derivados da cana-de-açúcar, foi descrita uma nova espécie bacteriana *Burkholderia sacchari*, que, entre diversas linhagens testadas, se destacou por sua capacidade de rápido crescimento em sacarose, bem como acúmulo de altas porcentagens de PHA no seu interior (GOMEZ, 1994; GOMEZ *et al.*, 1996a; GOMEZ *et al.*, 1997). Estudos taxonômicos, envolvendo laboratórios do Brasil, Alemanha e Bélgica, indicaram que o isolado representa uma nova espécie no gênero *Burkholderia*, tendo sido então proposto o nome *Burkholderia sacchari* (BRÄMER *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2001 a, b).

Ao ser cultivada em sacarose, sob limitação de um nutriente essencial como nitrogênio, fósforo, oxigênio, etc., *B. sacchari* acumula o homopolímero poli-3-hidroxi-butirato (P3HB) e, ao se oferecer como co-substrato o propionato, a bactéria acumula um copolímero de poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato (P3HB-co-3HV) (SILVA, 1998). Recentemente, a bactéria foi melhorada para a incorporação de unidades 3HV a partir de propionato, bem como para sua capacidade de usar xilose e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (SILVA, 1998; SILVA e GOMEZ, 1998; SILVA *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2002; ROCHA, 2002; SILVA *et al.*, 2004; PEREIRA, 2007; ROCHA *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2009). A PHA sintase desta bactéria ainda não é plenamente conhecida, uma vez que o gene codificador da mesma ainda não foi descrito, embora suas características estejam em estudo (NOGUEIRA *et al.*, 2005; NOGUEIRA, 2006). Dado o conhecimento acumulado por estudos sobre esta linhagem, um trabalho foi recentemente desenvolvido pra avaliar o potencial de *Burkholderia sacchari* produzir PHA a partir de diferentes fontes de carbono. Cerca de trinta diferentes compostos foram oferecidos a esta bactéria, sob condições de acúmulo, em meio mineral livre de nitrogênio, contendo também glicose como co-substrato, avaliando-se a natureza do polímero produzido (BUFFONI *et al.*, 2005; BUFFONI, 2006).

Utilizando ácidos graxos com número par de carbonos foi observada a produção de PHA contendo 3HB como monômero. Apenas para o polímero obtido a partir de ácido hexanóico foi observado um pico na análise por cromatografia gasosa que pode corresponder ao monômero 3HHx. O polímero obtido a partir de ácido hexanóico foi também analisado por ressonância magnética nuclear do  $C^{13}$  e  $H^1$ , havendo evidências que convergem fortemente para a presença deste monômero (Dr. Rubén Sánchez, UENF RJ, comunicação pessoal). A confirmação da presença de monômeros 3HHx depende da produção de maiores quantidades deste material e análise por especialista ou da análise de comparativa utilizando P3HB-co-3HHx sintetizado por bactérias que reconhecidamente produzem esse copolímero. Uma vez feita esta confirmação, uma estratégia para aumentar a fração 3HHx no copolímero seria o fornecimento de precursores apropriados em diferentes proporções ou a inserção de genes que favoreçam o aumento do monômero 3HHx. Isto permitirá ampliar o avaliar o impacto de pequenas frações de 3HHx sobre as propriedades do copolímero.

## 2.6 Uso de bactérias recombinantes para a produção de P3HB-co-3HHx

A síntese dos hidroxiaçil-CoAs é realizada frequentemente utilizando vias metabólicas comuns em bactérias, entretanto, enzimas específicas para a síntese de PHA, diferentes da PHA sintase, também participam deste processo. A clonagem de genes associados à biossíntese de PHA, em particular de PHA sintases, tem aberto a possibilidade de construção de linhagens recombinantes capazes de sintetizar PHA ainda não detectados em linhagens selvagens (ALDOR e KEASLING, 2003). Para a geração de PHA híbridos, um passo natural seria a expressão de genes codificadores da PHA sintase do tipo I em organismos contendo PHA sintase do tipo II (Tabela 1) e vice-versa.

Em 1988, foram clonados os genes responsáveis pela síntese de P3HB em *Ralstonia eutropha* (SLATER *et al.*, 1988; SCHUBERT *et al.*, 1988). A expressão destes genes em *Escherichia coli* demonstrou pela primeira vez a possibilidade de produção destes polímeros em organismos recombinantes. A síntese de P3HB em organismos contendo os genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha* foi demonstrada em organismos de vários gêneros (LEAF *et al.*, 1996; WILLIAMS *et al.*, 1996; SHERMAN *et al.*, 1997).

Embora a síntese de P3HB ou mesmo outros copolímeros tenha sido facilmente alcançada em diversos organismos recombinantes pela expressão dos genes de *R. eutropha*, a síntese de PHA<sub>MCL</sub> em organismos recombinantes expressando os genes de biossíntese de PHA de *Pseudomonas* só foi obtida em 1997 (LANGENBACH *et al.*, 1997) a partir de ácidos graxos e utilizando linhagens de *E. coli* afetadas no metabolismo desses substratos.

Genes de espécies de *Aeromonas* têm sido utilizados na construção de recombinantes, em geral de *Cupriavidus necator* (anteriormente, *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* e *Wautersia eutropha*). Já em 1998, Fukui e Doi estudaram o uso de óleos vegetais por uma linhagem recombinante de *R. eutropha* abrigando o gene da PHA sintase de *Aeromonas caviae*, tendo obtido o copolímero P3HB-co-3HHx correspondendo a aproximadamente 80% da massa seca celular, contendo 4-5 mol% de 3HHx, independentemente da estrutura do triglicerídios fornecidos. Entretanto, os autores não informam os valores de massa celular alcançados. Em *Aeromonas caviae*, a clonagem e análise dos genes de biossíntese de P3HB-co-3HHx revelou a presença do gene *phaJ* codificando para uma enoil-CoA hidratase (*R*)-específica, além do gene para PHA sintase (*phaC*) (FUKUI e DOI, 1997; FUKUI *et al.*, 1998). A co-expressão de *phaC* e *phaJ* de *A.*

*caviae* em *E. coli* possibilitou a síntese de P3HB-co-3HHx a partir de diferentes ácidos graxos, com a fração molar de unidades 3HHx oscilando entre 7 e 17% (FUKUI *et al.*, 1999). Assim, na síntese de P3HB-co-3HHx em *A. caviae* a partir de ácidos graxos, supõe-se que, intermediários da  $\beta$ -oxidação destes compostos sejam dirigidos para a síntese de PHA através da ação do produto do gene *phaJ*. Óleo de dendê também foi testado para a produção de P3HB-co-3HHx por *W. eutropha* recombinante abrigoando o gene da PHA sintase de *A. caviae*, tendo-se chegado a 87% da massa celular na forma deste copolímero a partir de 5 g de óleo (LOO *et al.*, 2005).

Mais recentemente, a produção de PHA por *Ralstonia eutropha* H16 e uma linhagem recombinante *R. eutropha* PHB-4/pJRDEE23d13 (uma mutante PHA negativo abrigoando o gene da PHA sintase da *Aeromonas caviae*) a partir de óleo de soja foi investigada por Kahar e colaboradores (2004). A linhagem H16 atingiu uma massa seca celular de 118–126 g/L, contendo 72–76% de P3HB. O copolímero P(3HB-co-5% mol 3HHx) foi produzido pela linhagem recombinante PHB-4/pJRDEE23d13 atingindo massa seca celular de 128–138 g/L e contendo 71–74% de PHA.

Em 2005 foi reportado que a inserção, em *Aeromonas hydrophila*, de genes de *R. eutropha* envolvidos na síntese de PHA, bem como a superexpressão de genes de *A. hydrophila* permitiram a obtenção de P3HB-co-3HHx com teores de 3HHx variando entre 12 a 19 mol%, a partir de substratos não relacionados, como glicose e gliconato (QIU *et al.*, 2005). A massa celular alcançada foi de 2,6 g/L, contendo 15% de PHA, no qual 12 - 19% correspondiam a 3HHx.

A PHA sintase de *B. sacchari* ainda não é plenamente conhecida, no entanto há indicativos de que sua PHA sintase, embora mais específica para polimerizar monômeros HA<sub>SCL</sub>, possa incorporar monômeros de 3HHx, ainda que em frações molares muito pequenas, como citado anteriormente (BUFFONI *et al.*, 2005; BUFFONI, 2006). *B. sacchari* e *R. eutropha* apresentam potencial para acúmulo de PHA híbridos, com o uso de precursores e condições específicas. *R. eutropha* acumulou P3HB-co-3HHx a partir de octanoato, em presença de inibidores da  $\beta$ -oxidação. Os teores de 3HHx variaram de 0,08 a 5,7 mol% (GREEN *et al.*, 2002). Isto indica que a classificação das PHA sintases com base na sua atividade *in vitro* pode não mostrar a flexibilidade de substratos que a enzima aceita.

Dado o potencial descrito dos copolímeros híbridos, algumas iniciativas recentes têm sido adotadas no sentido de estudar a produção bacteriana destes materiais por diferentes

linhagens. No Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo se encontra em andamento o projeto “Biossíntese e controle da composição de polímeros bacterianos biodegradáveis híbridos, contendo monômeros de cadeias carbônicas curtas e médias” (Proc. FAPESP 2008/51324-2). Três grandes grupos de estratégias vêm sendo adotadas para atingir a produção do copolímero alvo: (i) a busca de novos microrganismos com possíveis novas PHA sintases, (ii) a obtenção de linhagens recombinantes, abrigando genes modificados, que favoreçam o redirecionamento dos fluxos metabólicos, ou ainda que codifiquem novas PHA sintases com especificidades diferentes, (iii) o estudo da especificidade natural da PHA sintase de organismos conhecidos frente a diversos substratos ou condições que favoreçam a obtenção destes materiais. Com referência à estratégia (i), a principal atividade consiste do isolamento de bactérias preferencialmente do gênero *Aeromonas* capazes de produzir 3HB-co-3HA<sub>MCL</sub>. A segunda estratégia inclui a construção de recombinantes para a produção do material alvo. Estes recombinantes serão construídos por meio da inserção de genes relevantes em linhagens diversas: linhagens isoladas no item (i), bem como linhagens de *Pseudomonas* (originalmente produtoras de PHA<sub>MCL</sub>) e ainda *B. sacchari* (tipicamente produtora de PHA<sub>SCL</sub>). O item (iii) envolve o teste de diversos precursores, sobretudo óleos vegetais e ácidos graxos componentes dos mesmos, para a síntese de 3HB-co-3HA<sub>MCL</sub>, pelas linhagens na fase de isolamento, ou ainda, após a seleção e geração de recombinantes. Estas atividades englobaram um doutorado (R.S. GOMES) e um mestrado (T.S. MATSUDA) sob orientação do Prof. Dr. J.G.C. Gomez e o presente trabalho de mestrado.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo explorar o potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato).

### 3.2 Objetivos específicos

Estudar condições apropriadas para o aumento ou modificação da fração 3HHx no copolímero, empregando-se as seguintes estratégias:

- a) modificação das condições de cultivo e acúmulo;
- b) obtenção e estudo de mutantes afetados na utilização de ácido hexanóico para o crescimento e avaliação da sua capacidade de acúmulo da fração 3HHx no copolímero;
- c) construção de linhagens recombinantes portadoras de genes que participem na drenagem de intermediários de vias metabólicas presentes na bactéria em estudo, para a incorporação de maiores teores de 3HHx.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismos, plasmídios e genes

As linhagens e plasmídios empregados neste trabalho estão descritos na tabela 4.1.

**Tabela 4.1-** Bactérias e plasmídios utilizados no trabalho.

Bactéria/Plasmídio	Características	Origem/Referência
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101	Linhagem selvagem: Sac <sup>+</sup> , PHA <sup>+</sup> , Hx <sup>+</sup> , Kan <sup>s</sup> , Amp <sup>s</sup> , Tc <sup>s</sup>	BRÄMER <i>et al.</i> 2001
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue	Tc <sup>r</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> ΔM15, Tn10	BULLOCK <i>et al.</i> , 1987
<i>Escherichia coli</i> S17-1	Tc <sup>s</sup> , <i>recA</i> , genes <i>tra</i> do plasmídio RP4 integrados ao DNA genômico.	SIMON <i>et al.</i> , 1983
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM826	<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101 mutante (TA-01) obtido por radiação UV; Sac <sup>+</sup> , PHA <sup>+</sup> , Hx <sup>-</sup> , Kan <sup>s</sup>	Este trabalho
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM838	<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101 mutante (TN1-17) obtido com plasmídio pUT-Km2 integrado ao DNA genômico; Sac <sup>+</sup> , PHA <sup>+</sup> , Hx <sup>-</sup> , Kan <sup>r</sup>	Este trabalho
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM839	<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101 mutante (TN1-18) obtido com plasmídio pUT-Km2 integrado ao DNA genômico; Sac <sup>+</sup> , PHA <sup>+</sup> , Hx <sup>-</sup> , Kan <sup>r</sup>	Este trabalho
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM840	<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101 mutante (TN20-60) obtido com plasmídio pUT-Km2 integrado ao DNA genômico; Sac <sup>+</sup> , PHA <sup>+</sup> , Hx <sup>-</sup> , Kan <sup>r</sup>	Este trabalho
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM936	<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101 abrigando plasmídio pBBR1MCS-2 vazio; Sac <sup>+</sup> , PHA <sup>+</sup> , Hx <sup>-</sup> , Kan <sup>r</sup>	Este trabalho
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM841	<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101 recombinante (TTM01) abrigando plasmídio pBBR1MCS-2:: <i>phaB</i> <sub>Re</sub> ; Sac <sup>+</sup> , PHA <sup>+</sup> , Hx <sup>+</sup> , Kan <sup>r</sup>	Este trabalho
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM842	<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101 recombinante (TTM02) abrigando plasmídio pBBR1MCS-2:: <i>phaB</i> <sub>Re</sub> ; Sac <sup>+</sup> , PHA <sup>+</sup> , Hx <sup>+</sup> , Kan <sup>r</sup>	Este trabalho
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM937	<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101 recombinante (T1) abrigando plasmídio pBBR1MCS-2:: <i>phaJ</i> <sub>Pa</sub> ; Sac <sup>+</sup> , PHA <sup>+</sup> , Hx <sup>+</sup> , Kan <sup>r</sup>	Este trabalho

continua

LFM- Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do ICB-USP; Sac<sup>+</sup>- crescimento em sacarose; PHA<sup>+</sup>- acúmulo de PHA; Hx<sup>-</sup> - ausência de crescimento em ácido hexanóico; Kan<sup>s</sup> - sensibilidade à canamicina; Amp<sup>s</sup> - sensibilidade à ampicilina; Tc<sup>s</sup> - sensibilidade à tetraciclina; Kan<sup>r</sup> - sensibilidade à canamicina.

\*Linhagem cedida pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Marilis do Valle Marques.



**Tabela 4.1-** Bactérias e plasmídios utilizados no trabalho.

<i>Burkholderia sacchari</i> LFM938	<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101 recombinante (T2) abrigando plasmídio pBBR1MCS-2:: <i>phaJ1<sub>Pa</sub></i> ; Sac <sup>+</sup> , PHA <sup>+</sup> , Hx <sup>+</sup> , Kan <sup>r</sup>	Este trabalho
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM939	<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101 recombinante (A3) abrigando plasmídio pBBR1MCS-2:: <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> ; Sac <sup>+</sup> , PHA <sup>+</sup> , Hx <sup>+</sup> , Kan <sup>r</sup>	Este trabalho
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM940	<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101 recombinante (B3) abrigando plasmídio pBBR1MCS-2:: <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> ; Sac <sup>+</sup> , PHA <sup>+</sup> , Hx <sup>+</sup> , Kan <sup>r</sup>	Este trabalho
pUT-Km2	Plasmídio suicida carregando transposon mini-Tn5 contendo gene repórter <i>lacZ</i> sem promotor	DE LORENZO <i>et al.</i> , 1990*
pBBR1MCS-2	Plasmídio mobilizável com amplo espectro de hospedeiros (4,7 Kb), Km <sup>r</sup>	KOVACH <i>et al.</i> , 1994
pBBR1MCS-2:: <i>phaB<sub>Re</sub></i>	Derivado pBBR1MCS-2 contendo gene <i>phaB</i> de <i>R. eutropha</i> . Este gene que codifica para a enzima 3-cetoacil redutase NADPH-dependente, responsável pela redução de acetoacetyl-CoA e 3-cetohexoil-CoA ao 3-hidroxiacetyl-CoA correspondente (Haywood <i>et al.</i> , 1988).	GOMES <i>et al.</i> , 2006
pGEM:: <i>phaJ1<sub>Pa</sub></i>	Derivado pGEM <sup>®</sup> -T Easy ( <i>lacPOZ</i> , mcs, <i>Amp<sup>r</sup></i> , pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site) contendo gene <i>phaJ1</i> de <i>P. aeruginosa</i> . Este gene codifica uma enoil-CoA hidratase (R)-específica que drena intermediários da β-oxidação para a síntese de PHA (Tsuge <i>et al.</i> , 1999; Tsuge <i>et al.</i> , 2003).	GOMES <i>et al.</i> , 2006
pGEM:: <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i>	Derivado pGEM <sup>®</sup> -T Easy ( <i>lacPOZ</i> , mcs, <i>Amp<sup>r</sup></i> , pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site) contendo gene <i>phaJ4</i> de <i>P. aeruginosa</i> . Este gene codifica uma enoil-CoA hidratase (R)-específica que drena intermediários da β-oxidação para a síntese de PHA (Tsuge <i>et al.</i> , 2003).	GOMES <i>et al.</i> , 2006

conclusão

LFM- Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do ICB-USP; Sac<sup>+</sup>- crescimento em sacarose; PHA<sup>+</sup>- acúmulo de PHA; Hx<sup>-</sup> - ausência de crescimento em ácido hexanóico; Kan<sup>s</sup> - sensibilidade à canamicina; Amp<sup>s</sup> - sensibilidade à ampicilina; Tc<sup>s</sup> - sensibilidade à tetraciclina; Kan<sup>r</sup> - sensibilidade à canamicina.

\*Linhagem cedida pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Marilis do Valle Marques.

## 4.2 Condições e meios de cultivo

*Burkholderia sacchari* foi cultivada em estufa a 30° C e *Escherichia coli* também em estufa a 37° C. Quando requerido, as culturas se deram sob agitação de 150 rpm.

Os cultivos de *B. sacchari* foram realizados em meios líquidos e/ou sólidos: caldo nutriente (CN) e meio mineral (MM). Ao MM adicionaram-se fontes de carbono (glicose ou sacarose e/ou ácido hexanóico, ácido butírico ou ácido octanóico) em concentrações

ajustadas em cada experimento de modo a se obter multiplicação celular e acúmulo do polímero, conforme descrito ao longo do texto.

Os cultivos de *E. coli* foram realizados em meio líquidos e/ou sólido: Luria Bertani (LB) puro ou adicionado do antibiótico canamicina 50 µg/mL (LBK) ou ampicilina 100 µg/mL (LBA), conforme a necessidade e a linhagem a ser cultivada.

Ampicilina (15 µg/mL) foi utilizada para a seleção de clones mutantes  $hx^-$  de *B. sacchari* (SILVA, 1998) e adicionada (100 µg/mL) a LB (LBA). Canamicina (50 µg/mL) foi adicionada a LB (LBK) ou MM com glicose 1 g/L (MMGK) para cultivos de linhagens abrigando plasmídios.

#### 4.2.1 Composição dos meios de cultura

##### 4.2.1.1 Caldo nutriente (CN) ou ágar nutriente (AN)

Denominado caldo nutriente quando líquido e ágar nutriente quando sólido:

Extrato de carne	3 g/L
Peptona	5 g/L

##### 4.2.1.2 Luria Bertani (LB) (SAMBROOK e RUSSELL, 2001)

Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	5 g/L

#### 4.2.1.3 Meio mineral (MM) (ROCHA *et al.*, 2008)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O Sol. 20%	1,0 mL/L
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O Sol. 1%	1,0 mL/L
Citrato Férrico Amoniacal Sol. 6%	1,0 mL/L
Solução de elementos traços	1,0 mL/L

#### *Solução de elementos traços:*

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,30 g/L
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,20 g/L
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,10 g/L
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0,03 g/L
NaMoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,03 g/L
NiCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,02 g/L
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,01 g/L

Os meios de cultura sólidos são obtidos pela adição 15-20 g/L de ágar à composição dos meios líquidos acima citados. Os meios de cultura sólidos foram obtidos pela adição 15-20 g/L de ágar à composição dos meios líquidos.

Soluções e meios de cultura foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C, exceto soluções de antibióticos, esterilizadas por filtração.

#### 4.2.2 Preservação das linhagens bacterianas

Todas as culturas de células bacterianas de interesse foram armazenadas por criopreservação, estoque para uso de rotina, ou liofilização, conforme descrito a seguir.

Para a criopreservação, cerca de 20 colônias foram inoculadas em 100 mL de CN, LB, LBA ou LBK sendo incubadas por tempo definido de acordo com linhagem bacteriana. Após este período, foram adicionados 100 mL de uma solução de glicerol a 20% (v/v) a essa cultura e a mistura foi distribuída em tubos de polipropileno esterilizados num volume de 1 mL, armazenado-se em congelador doméstico por 40 minutos. Após este período, as culturas foram conservadas em freezer -80 °C.

Culturas de linhagens mutantes ou recombinantes obtidas neste trabalho foram cultivadas em CN ou LB (24 h), contendo o antibiótico adequado quando necessário, centrifugadas (6000 rpm, por 10 minutos a 4 °C) e ressuspensas em agente protetor (leite desnatado a 10% e glutamato de sódio a 5%). A suspensão de células foi distribuída em ampolas esterilizadas, em seguida, congeladas e liofilizadas. As células liofilizadas foram mantidas em refrigerador (4 a 8 °C) nas ampolas seladas a vácuo (SILVA *et al.*,1992).

### 4.3 Experimentos de acúmulo de PHA

Fizeram-se experimentos em pequeno volume (50 mL) com duração de 72 horas, os quais combinavam várias concentrações de glicose e de um dos ácidos hexanóico, butírico ou octanóico. As concentrações de glicose utilizadas foram 3,0, 4,0, 4,5, 5,0, 10 e 15 g/L e de ácido hexanóico, butírico ou octanóico foram 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 g/L, conforme descrito na tabela 4.2.

**Tabela 4.2-** Combinações de glicose e ácido hexanóico no MM utilizado nos ensaios de acúmulo de PHA.\*

GLICOSE (g/L)	ÁCIDO HEXANOICO (g/L)					GLICOSE (g/L)	ÁCIDO BUTÍRICO / ÁCIDO OCTANÓICO (g/L)				
	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0		0,25	0,5	1,0	1,5	2,0
3,0	MMG3	MMG3	MMG3	MMG3	MMG3	5,0	MMG5	MMG5	MMG5	MMG5	MMG5
	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
	H0,25	H0,5	H1,0	H1,5	H2,0		B0,25	B0,5	B1,0	B1,5	B2,0
4,0	MMG4	MMG4	MMG4	MMG4	MMG4	10,0	MMG10	MMG10	MMG10	-	-
	+	+	+	+	+		+	+	+	-	-
	H0,25	H0,5	H1,0	H1,5	H2,0		B0,25	B0,5	B1,0	-	-
4,5	MMG4,5+	MMG4,5+	MMG4,5+	MMG4,5	MMG4,5+	15,0	MMG15	MMG15	MMG15	-	-
	+	+	+	+	+		+	+	+	-	-
	H0,25	H0,5	H1,0	H1,5	H2,0		B0,25	B0,5	B1,0	-	-
5,0	MMG5	MMG5	MMG5	MMG5	MMG5	5,0	MMG5	MMG5	MMG5	MMG5	MMG5
	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
	H0,25	H0,5	H1,0	H1,5	H2,0		OC0,25	OC0,5	OC1	OC1,5	OC2,0
10,0	MMG10	MMG10	MMG10	MMG10	MMG10	10,0	MMG10	MMG10	MMG10	-	-
	+	+	+	+	+		+	+	+	-	-
	H0,25	H0,5	H1,0	H1,5	H2,0		OC0,25	OC0,5	OC1,0	-	-
15,0	MMG15	MMG15	MMG15	MMG15	MMG15	15,0	MMG15	MMG15	MMG15	-	-
	+	+	+	+	+		+	+	+	-	-
	H0,25	H0,5	H1,0	H1,5	H2,0		OC0,25	OC0,5	OC1,0	-	-

\*Combinações de concentração de glicose e ácido hexanóico, butírico ou octanóico empregadas, bem como a sigla dada a cada meio. Os meios minerais em que se acrescentou somente glicose como fonte de carbono recebeu a sigla MMG seguida do número indicativo da concentração deste composto em g/L.

Inicialmente foram preparadas culturas de *B. sacchari* em CN (50 mL) incubadas por 24 horas. A um volume de MM acrescido de determinada concentração de glicose (MMG), foi inoculada uma quantidade correspondente a 6% do volume final de cultura proveniente de CN. Após 24 horas de incubação, adicionou-se à cultura ácido hexanóico (MMG+H) em uma das concentrações previamente definidas. Foram retiradas amostras nas 24 e 72 horas de cultivos em MM para análises posteriores.

A partir desses cultivos, foram feitas análises de determinação do pH, biomassa e de PHA no início e no final do cultivo. Para todos os ensaios, foram utilizados cultivos controle em MM somente com glicose (MMG) em cada concentração determinada, descritos no texto.

#### **4.3.1 Crescimento e acúmulo de polímero em maior escala**

O ensaio da linhagem selvagem, *B. sacchari* LFM 101, cuja concentração de glicose e ácido hexanóico mostrou-se mais apropriada para o acúmulo de unidades 3HHx foi reproduzido em maior escala. O cultivo foi realizado em erlenmeyer contendo meio de cultura (20% do volume total do frasco) com as concentrações apropriadas de substrato, em um total de 8000 mL.

Um volume do cultivo da linhagem selvagem em CN (24 h) foi inoculado, à razão de 6%, do volume final em MMG5, com a concentração de 5g/L de glicose. Após incubação por 24 h, adicionou-se uma quantidade de ácido hexanóico para a concentração de 1 g/L (MMG5+H1). Foram retiradas amostras de 24 e 72 horas dos cultivos em MM para análises de determinação do pH, biomassa, concentração de fontes de carbono e de PHA no início e no final do cultivo. Foi feita, ainda, extração e purificação do polímero obtido e análise de sua composição monomérica conforme descrito ao longo do texto.

#### **4.4 Obtenção de mutantes UV deficientes no consumo de ácido hexanóico (hx<sup>-</sup>)**

#### 4.4.1 Curva de crescimento

Previamente, preparou-se um inóculo em CN, inoculando-se algumas colônias de *B. sacchari* provenientes de uma placa com AN, incubando-se por 24 horas. Após este período, inoculou-se um volume de 10% de cultura inóculo em MM com glicose na concentração de 2 g/L (MMG2) e incubou-se. Retiraram-se amostras a cada duas horas durante 12 horas e uma amostra final no tempo de 24 horas. Para cada tempo, foram medidas biomassa seca e a densidade óptica ( $DO_{610nm}$ ). Ao final do cultivo, verificou-se a pureza da cultura por plaqueamento em AN.

#### 4.4.2 Curva de sobrevivência à radiação

A radiação ultravioleta (UV) (comprimento de onda 254 nm e potência da lâmpada 15 Watt) foi empregada para determinação da sobrevivência de *B. sacchari* em função do tempo de exposição, para definir condições necessárias à obtenção de uma faixa de sobreviventes entre 1 e 10% da população original (SILVA, 1998).

Uma cultura bacteriana em CN (24 h) foi submetida a diluições decimais seriadas. Volumes de 100  $\mu$ l de diluições apropriadas foram semeados em MMS1 sólido (sacarose 1g/L), utilizando-se alça de Drigalski. Os meios com as culturas bacterianas foram rapidamente irradiadas por diferentes períodos de tempo, protegidas da luz branca e incubadas em ambiente escuro durante 48 horas. Após a incubação, fez-se a contagem de unidades formadoras de colônia por unidade de volume (UFC/mL), definindo-se a condição para se obter a sobrevivência desejada.

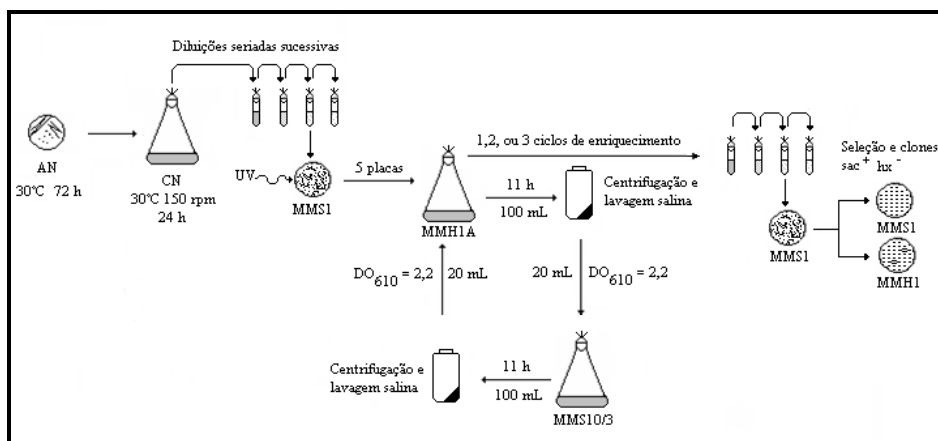
#### 4.4.3 Determinação da concentração de ácido hexanóico inibitória ao crescimento

Curvas de crescimento da linhagem *B. sacchari* LFM 101 foram feitas segundo Silva (1998) em MM com ácido hexanóico nas concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0 g/L, respectivamente MMH1, MMH1,5 e MMH2, tendo MMG2 (glicose 2 g/L) como controle.

Para isto, 20 mL de cultura de CN (24 h), após lavagem em solução salina 0,85% (m/v), foram inoculados em 200mL de cada um dos MMH acima citados. O crescimento foi acompanhado por amostragens a cada 2 h, determinando-se densidade óptica a 610nm ( $DO_{610}$ ), pH e concentração de ácido hexanóico, deste último somente inicial e final.

#### **4.4.4 Mutação por radiação UV e seleção de clones de *B. sacchari* deficientes no consumo de ácido hexanóico ( $hx^-$ )**

A mutação e a seleção de clones  $hx^-$  foi realizada segundo Silva (1998) com algumas modificações. Diluições apropriadas de uma cultura de *B. sacchari* em CN foram inoculadas em MM sólido com sacarose 1 g/L (MMS1), sendo imediatamente irradiadas por 5,6,7 ou 8 s com luz UV, 254 nm, e incubadas no escuro por 48 horas. Clones obtidos após irradiação foram recolhidos, suspensos, centrifugados, lavados e ressuspensos em solução salina 0,85% (m/v) de modo a se atingir uma  $DO_{610}=2,2$ . Para reduzir o número de células capazes de utilizar ácido hexanóico, mantendo na cultura aquelas incapazes de consumir esta fonte, 20 mL desta suspensão foram adicionados a 200 mL de MM com hexanóico 1 g/L e ampicilina (15  $\mu$ g/ml) (MMH1A), incubando-se por 11 horas. A seguir, o cultivo foi centrifugado e lavado, acertando novamente a  $DO_{610}$  em 2,2. 20 mL da cultura foram reinoculados em MM (nitrogênio 3g/L) com sacarose 10 g/L (MMS10/3), reincubando-se por 11 h. O ciclo de cultivos em MMH1A e MMS10/3 foi repetido mais duas vezes. Após cada cultivo, clones mutantes foram isolados em placas de MMS1, os quais foram testados com relação à capacidade de crescer em ácido hexanóico (MMH1) com única fonte de carbono. Este procedimento está esquematizado na figura 4.1.



**Figura 4.1-** Esquema de cultivo para mutação e seleção de clones mutantes  $hx^-$  ( $sac^+/gli^+$ ) (SILVA, 1998 adaptado).

#### 4.5 Mutação por transposon e seleção de clones de *B. sacchari* deficientes no consumo de ácido hexanóico ( $hx^-$ )

O transposon mini-Tn5 *lacZ* (contendo o gene codificador de resistência à canamicina) foi inserido em *B. sacchari* após conjugação com *E. coli* S17-1 $\lambda$ -pir portando o plasmídeo pUT-Km2 (de LORENZO *et al.*, 1990) (*E. coli* IPT 624). O volume de 5 mL de uma cultura de *B. sacchari* LFM 101 em LB (24 h) foi filtrado em membrana estéril de porosidade 0,45  $\mu$ m. Em seguida, sobre a mesma membrana com o filtrado inicial, filtraram-se 5 mL de uma cultura de *E. coli* IPT 624 em LBK (16 h) e, novamente, filtraram-se 5 mL da cultura de *B. sacchari* em LB (24 h). A membrana com o filtrado das culturas citadas foi incubada em LB sólido a 30 °C durante 24 horas. Após incubação, a membrana foi lavada em 5 mL de solução salina 0,85% (m/v), para recuperar as células. Diluições apropriadas desta suspensão foram inoculadas em placas de MM com glicose 1g/L e canamicina 50  $\mu$ g/mL (MMG1K) e incubadas por 48 horas a 30 °C. Os clones mutantes assim obtidos foram isolados de MMG1K sólido e testados com relação à capacidade de crescer em sacarose (MMS1) e incapacidade de crescer em ácido hexanóico (MMH1) como única fonte de carbono. Figura x



## 4.6 Manipulação de DNA

### 4.6.1 Extração plasmidial

As extrações plasmidiais foram feitas em sua totalidade com *kits*. A extração de plasmídios de *E. coli* XL1 e *E. coli* S17-1 foi realizada a partir de um cultivo em LBK ou LBA (4 h). Já a recuperação de plasmídios de *B. sacchari* recombinantes foi procedida a partir de um cultivo em LBK (12 h). Alíquotas de 2 mL da cultura foram centrifugadas (10000 rpm e 10 min), descartando-se o sobrenadante. Procedeu-se a extração utilizando-se o kit *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen®), seguindo-se as instruções do fabricante. A análise da pureza e concentração das amostras de DNA foi realizada por leitura de densidade ótica a 260 e 280 nm medida em espectrofotômetro (*NANODROP-Spectrophotometer*- modelo ND 1000 versão 3)

### 4.6.2 Digestão com enzimas de restrição

Para a digestão de DNA foram utilizadas endonucleases de restrição segundo instruções do fabricante (Invitrogen®). A quantidade de enzima adicionada representou no máximo 10% do volume de reação. A digestão foi realizada a 37 °C por 16 horas.

### 4.6.3 Ligação de fragmentos de DNA

A ligação de fragmentos de DNA foi obtida utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen® ou New England Biolabs®) com incubação a 14 °C por 16 horas.

### 4.6.4 Transferência de plasmídios por transformação

As linhagens *E. coli* XLI Blue ou *E. coli* S17-1 foram inoculadas em 25mL de meio LB contendo MgCl<sub>2</sub> 10mM e MgSO<sub>4</sub> 10mM e incubadas em agitador rotativo a 37 °C até

um  $DO_{650} = 0,3-0,5$ . Em tubos estéreis, foram centrifugadas 8 mL da cultura por 15 min, 4000 rpm, 4 °C e o *pellet* foi ressuspensão com 4 mL de tampão de transformação, as células foram mantidas por 15 minutos em gelo e novamente centrifugadas. Para obtenção das células competentes, a massa de células foi ressuspensa em 0,8 mL do tampão de transformação, dividida em alíquotas de 200  $\mu$ L e mantidos em banho de gelo. As células foram utilizadas imediatamente.

Para cada 200  $\mu$ L de células competentes, adicionaram-se 10  $\mu$ L de DNA, (~250 ng) incubou-se em banho de gelo por 30 min e a mistura foi submetida a um choque térmico a 42 °C por 90 s e imediatamente resfriada em gelo. Adicionou-se 600  $\mu$ L de meio LB, e incubou-se por 1 hora a 37 °C.

Clones transformantes foram selecionados em LBK e, no caso de transformações com *E. coli* XL1Blue, IPTG (isopropil-tio- $\beta$ -D-galactosídeo) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosídeo) também foram adicionados para diferenciar os possíveis recombinantes contendo o inserto de DNA. Foram feitas placas controle para verificar a viabilidade das células transformadas.

Soluções utilizadas:

MgCl<sub>2</sub>: solução na concentração de 10 mM

MgSO<sub>4</sub>: solução na concentração de 10 mM

Tampão de transformação (1 L): Tris-HCl (tris (hidroximetil) aminometano) 10 mM pH 8,0, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM.

#### 4.6.5 Construção de linhagens recombinantes de *Burkholderia sacchari*

Os plasmídios pBBR1MCS-2::*phaB<sub>Re</sub>*, pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* e pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>* foram inserido em *E. coli* S17-1 por transformação e desta para *B. sacchari* por conjugação segundo descrito por Sambrook e colaboradores (1989).

A conjugação entre *E. coli* S17-1 abrigando os plasmídios -2::*phaB<sub>Re</sub>*, pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* ou pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>* e *B. sacchari* selvagem foi realizada em meio sólido (SAMBROOK *et al.*, 1989). Para isto, uma cultura de *B. sacchari* em MM com 1 g/L de glicose (MMG1), incubada por 24 h, foi semeada em placa com MMG1 acrescido de canamicina 50  $\mu$ g/mL (MMG1K). Colônias de *E. coli* S17-1 contendo os plasmídios foram plaqueadas puntualmente, com auxílio de palitos estéreis, na placa de

MMG1K com *B. sacchari*, incubando-se por 72 h. As colônias recombinantes assim obtidas, foram estriadas em MMG1K para confirmar o isolamento.

#### **4.6.6 Análise de DNA em géis de agarose**

Para visualização e análise do DNA foram utilizadas corridas eletroforéticas em gel de agarose nas concentrações indicadas na literatura (SAMBROOK *et al.*, 1989), na concentração de 0,8 de agarose.

### **4.7 Métodos analíticos**

#### **4.7.1 Determinação de pH**

O pH foi determinado no sobrenadante, após centrifugação da cultura, em potenciômetro (Mettler - modelo Delta 350) utilizando padrões de pH 4,0: 7,0: 9,0 a 25 °C (Ingold) para calibração.

#### **4.7.2 Determinação de biomassa**

A biomassa foi determinada ao final dos experimentos de acúmulo. Cerca de 10 mL da suspensão celular foram centrifugados (8000 rpm, 10 min e 4°C), o sobrenadante foi descartado as células foram ressuspensas em água destilada e filtradas através de membranas 0,45 µm de porosidade, devidamente pesadas e com sua umidade pré-determinada. As membranas junto com as células foram secas até massa constante, por aproximadamente 4h a 105 °C. Após ser retirado da estufa, este conjunto permaneceu 20 minutos no dessecador e, após este período, foi determinada a massa seca celular (MSC) através da seguinte equação:

$$MSC = (MMC-MM+UM) \times 1000/VOL$$

Em que:

MMC = massa da membrana e células após a secagem (g)

MM = massa da membrana (g)

UM = umidade média do lote de membrana (g)

VOL = volume de suspensão centrifugada (mL)

### **4.7.3 Determinação de PHA**

#### **4.7.3.1 Determinação qualitativa pelo emprego de corantes indicadores de acúmulo de PHA**

Foram utilizados dois testes qualitativos de coloração para a detecção de acúmulo de PHA para a linhagem selvagem e o mutante obtido.

A coloração de colônias por *Sudan Black B* foi realizada segundo Schlegel e colaboradores (1970). Linhagens e clones mutantes cultivados em meio sólido, sob condições apropriadas à produção de PHA, foram corados cobrindo-os completamente com solução 0,02% (m/v) de *Sudan Black B* em etanol 96%. O tempo de espera para a ação do corante foi de 10 min, seguido de lavagem com etanol 96%. Observou-se o resultado. As colônias que contêm PHA se coram de azul, enquanto aquelas que não os contêm, ou não se coram, ou ficam levemente azuladas.

#### **4.7.3.2 Determinação quantitativa por cromatografia gasosa**

A quantidade e composição de PHA foram determinadas através de 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 ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2-dicloreto e 100 µL de uma solução de ácido benzóico (40 g/L) em propanol. Os tubos foram fechados firmemente e homogeneizados vigorosamente antes de colocar a mistura em um banho

(100 °C por 3 horas). Depois de decorridos os primeiros 30 minutos os tubos foram retirados e agitados, voltando ao banho e deixando, até o tempo final. Ao final do tempo de incubação, os tubos foram resfriados e, adicionou-se 4 mL de água destilada, agitando-se e deixando em repouso até haver uma separação das fases aquosa e orgânica, que contém os propil-ésteres. A fase aquosa foi retirada com ajuda de uma pipeta e vácuo e, na mistura restante, foi adicionado sulfato de sódio anidro para absorção de água remanescente na fase contendo os propil-ésteres. Feito isso, o restante foi transferido para frascos apropriados e analisado no cromatógrafo. Um volume de 1 µL da fase orgânica foi analisado após fracionamento da amostra (*split* 1:20) em cromatógrafo gasoso HP6890 Series GC System equipado com uma coluna HP-5 (5% fenil-metil-siloxane, comprimento 30m, diâmetro 0,25 mm, espessura do filme 0,25µm). A análise foi conduzida nas 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 temperaturas do forno: 100 °C por 1 minuto, elevação da temperatura até 185 °C a 8 °C/min e 185 °C por 15 minutos.

Ácido benzóico foi utilizado 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 Chem. CO) 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).

#### **4.7.4 Extração e purificação do polímero e caracterização**

Em alguns dos experimentos foram realizadas extração e purificação do polímero para confirmar a composição monomérica. A purificação do polímero foi feita por extração com solvente, utilizando-se de um extrator Soxhlet, clorofórmio e uma coluna de refluxo.

A cultura foi centrifugada a 6000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. O *pellet* foi liofilizado e submetido à extração. Foi pesada uma massa de células liofilizadas e transferidas para cartucho de papel, que foi colocado dentro do extrator com 150 mL de clorofórmio que ficou sob aquecimento, mantendo fluxo por 24h. Decorrido este tempo, a mistura passou por uma evaporação em rotavapor para concentrar a solução, depois foi adicionado à mistura 10 partes de etanol anidro para precipitação do polímero. A mistura ficou em descanso até a decantação de todo o polímero, com ajuda de uma micropipeta foi retirado o excesso de etanol e o restante da mistura ficou em descanso até a evaporação completa dos solventes. O filme de polímero seco foi recolhido com uma espátula e acondicionado em frascos de vidro para análise da composição (SÁNCHEZ *et al.*, 2003).

Uma alíquota do polímero extraído foi submetida à propanólise e análise dos propil-ésteres dos monômeros constituintes do PHA, para verificação preliminar da composição do polímero extraído.

A identificação de monômeros foi confirmada por CG-MS (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa) em um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC17A. Os espectros de massa dos fragmentos de propil-ésteres foram obtidos por impacto de elétrons (EI) a 70 eV em um espectrômetro de massa Shimadzu QP5050A. A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) também foi utilizada nesta identificação, segundo Sánchez e colaboradores (2003). Amostras de PHA foram dissolvidas em clorofórmio deuterado e submetidas a um espectrofotômetro JEOL Eclipse + 400, operado a 400 Hz para  $^1\text{H}$  e 100 Hz para  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.7.5 Análise de propriedades do polímero

Para realizar análises de propriedade, inicialmente, foi procedida a purificação do polímero por sucessivas diluições em clorofórmio, seguidas de precipitações em éter de petróleo.

As análises de propriedade térmica foram realizadas segundo Sánchez e colaboradores (2003), sendo realizadas pelas técnicas de *Thermogravimetry analysis* (TGA) *Dynamical mechanical analysis* (DMA) e *Differential scanning calorimetry* (DSC)

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Experimentos de acúmulo de PHA com *Burkholderia sacchari* selvagem

Para avaliar o potencial da bactéria *Burkholderia sacchari* produzir um copolímero híbrido, a primeira estratégia foi avaliar o efeito da modificação das condições de cultivo e acúmulo. Considerando que informações preliminares (BUFFONI, 2006) eram fortemente indicativas de que o fornecimento de glicose e ácido hexanóico ao cultivo, sob condições de acúmulo, permitiriam a introdução de unidades de 3HHx à cadeia polimérica de 3HB (Anexo A), foram realizados experimentos nos quais diferentes proporções de glicose e ácido hexanóico foram combinadas, avaliando-se a quantidade e o teor de HA no polímero produzido. As combinações empregadas foram descritas em Materiais e Métodos (Tabela 4.2). Os resultados destes experimentos estão apresentados na Tabela 5.1 e Figura 5.1.

As culturas de *B. sacchari* foram conduzidas frente a diferentes concentrações iniciais de glicose (variando de 3 a 15 g/L), sempre frente a 1g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Nas primeiras 24 h de cultivo, a bactéria utiliza as fontes de carbono e de nitrogênio para o crescimento. Após 24 h, quando o nitrogênio foi totalmente consumido, o excesso de carbono presente é utilizado para o acúmulo de PHA (dados não apresentados). Neste ponto do cultivo, para cada uma das concentrações de glicose testadas, foram adicionadas as diferentes concentrações de ácido hexanóico, avaliando-se sua influência sobre o teor de PHA e a fração de 3HHx nele incorporada.

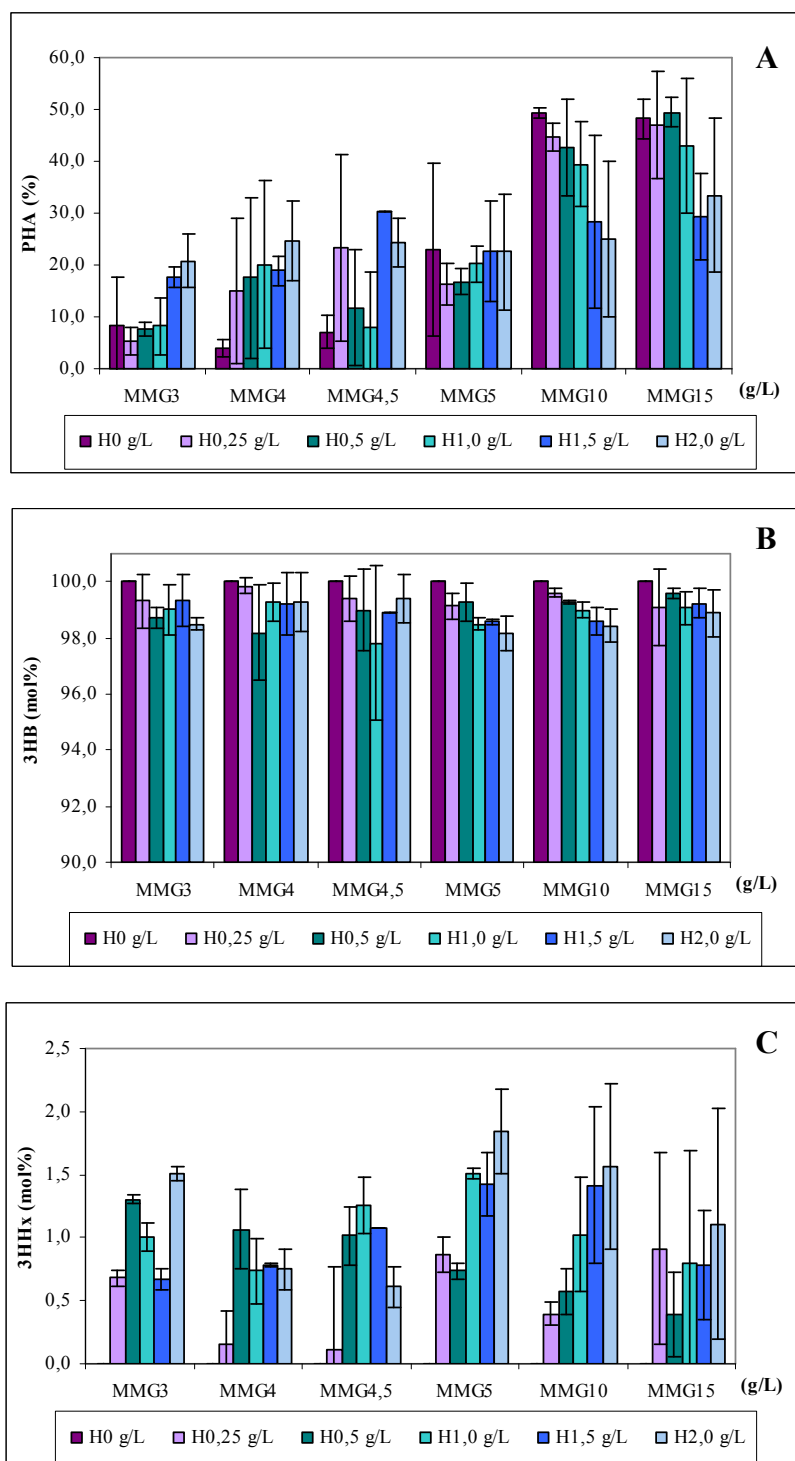
A partir da Tabela 5.1, foi construída a Figura 5.1. Observa-se que quando concentrações muito baixas de açúcares foram utilizadas (até 4,5 g/L), o teor de PHA acumulado foi dependente da concentração de ácido hexanóico suprida durante a fase de acúmulo. Por outro lado, quando concentrações maiores de açúcares foram fornecidas (10 e 15 g/L), embora maiores teores de polímero tenham sido acumulados, observa-se um efeito inibitório crescente do ácido hexanóico sobre o acúmulo de polímero (Fig. 5.1.A). Quando 5 g/L de glicose foi fornecida no início do cultivo, observou-se o acúmulo de PHA correspondente a 20% da massa seca celular. Este teor de acúmulo não foi dependente da concentração de ácido hexanóico fornecido, tampouco se observaram efeitos inibitórios sobre o acúmulo mesmo sob 2 g/L desse ácido.

**Tabela 5.1-** Produção de PHA por *Burkholderia sacchari* linhagem selvagem (LFM 101) a partir de glicose e ácido hexanóico.

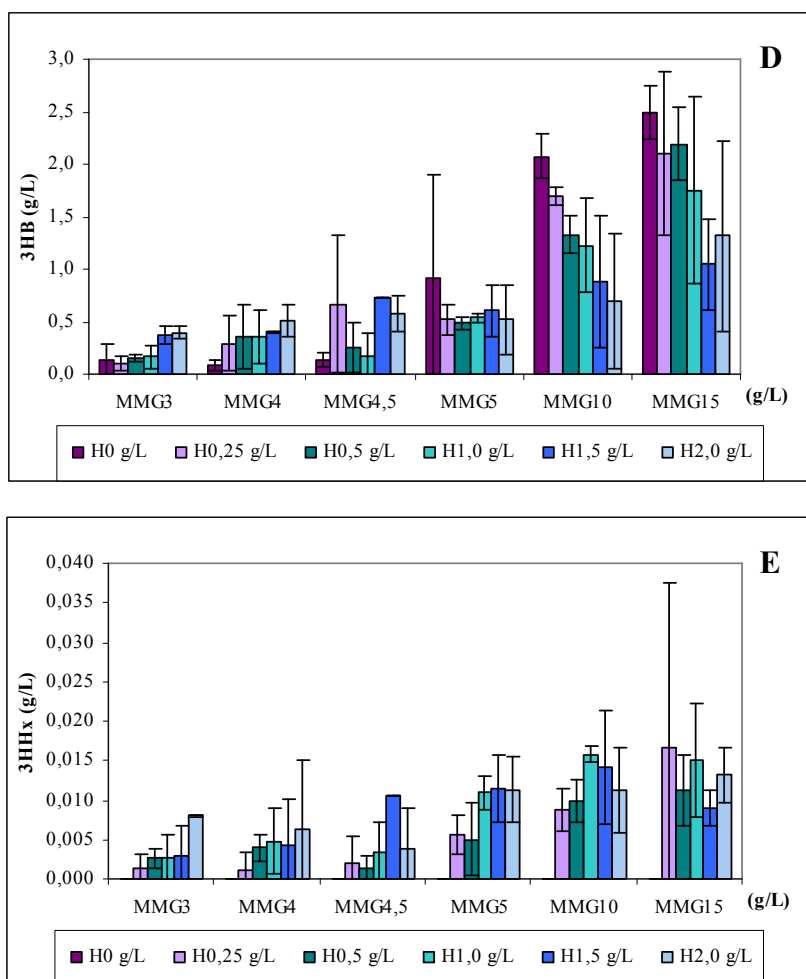
Linhagem/ Condição de cultivo	Tempo (h)	MSC g/L	pH	PHA (mol%)		PHA (%MSC)	3HB (g/L)	3HHx (g/L)	PHA (g/L)	X(R) (g/L)
				3HB	3HHx					
LFM101 MMG3	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	9,57 ±4,6	ND	ND	ND	ND
	72	1,52 ±0,3	6,78 ±0,2	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	8,21 ±0,5	0,1290	0,0000	0,1290	1,39
LFM101 MMG3+H0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	6,84 ±2,5	ND	ND	ND	ND
	72	1,92 ±0,2	6,71 ±0,2	99,32 ±1,0	0,68 ±1,0	5,23 ±2,6	0,1020	0,0013	0,1033	1,82
LFM101 MMG3+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	10,64 ±3,8	ND	ND	ND	ND
	72	1,98 ±0,1	6,82 ±0,2	98,70 ±0,4	1,30 ±0,4	7,63 ±1,4	0,1488	0,0027	0,1515	1,83
LFM101 MMG3+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	6,92 ±5,4	ND	ND	ND	ND
	72	2,04 ±0,02	7,07 ±0,3	99,00 ±0,9	1,00 ±0,9	8,28 ±5,5	0,1661	0,0028	0,1689	1,87
LFM101 MMG3+H1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	7,23 ±0,6	ND	ND	ND	ND
	72	2,16 ±0,2	7,12 ±0,1	99,33 ±0,9	0,67 ±0,9	17,5 ±2,0	0,3772	0,0028	0,3800	1,78
LFM101 MMG3+H2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	9,49 ±4,9	ND	ND	ND	ND
	72	1,98 ±0,2	7,28 ±0,2	98,49 ±0,2	1,51 ±0,2	20,8 ±5,1	0,3961	0,0080	0,4041	1,58
LFM101 MMG4	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	8,74 ±1,0	ND	ND	ND	ND
	72	1,91 ±0,4	6,52 ±0,07	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	3,99 ±1,8	0,0800	0,0000	0,0800	1,83
LFM101 MMG4+H0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	16,27 ±10,9	ND	ND	ND	ND
	72	2,05 ±0,3	6,59 ±0,2	99,85 ±0,3	0,15 ±0,3	15,1 ±14,1	0,2939	0,0012	0,2951	1,75
LFM101 MMG4+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	6,66 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,10 ±0,3	6,83 ±0,1	98,18 ±1,7	1,06 ±0,4	17,5 ±15,5	0,3542	0,0040	0,3582	1,74
LFM101 MMG4+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	8,91 ±1,9	ND	ND	ND	ND
	72	1,66 ±0,4	7,15 ±0,1	99,27 ±0,7	0,73 ±0,7	20,1 ±15,1	0,3528	0,0048	0,3576	1,30
LFM101 MMG4+H1,5	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,16 ±0,3	7,15 ±0,1	99,22 ±1,1	0,78 ±1,1	18,85 ±2,7	0,3985	0,0042	0,4027	1,76
LFM101 MMG4+H2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	15,18 ±3,4	ND	ND	ND	ND
	72	2,11 ±0,01	7,41 ±0,1	99,25 ±1,0	0,75 ±1,1	24,54 ±7,6	0,5112	0,0062	0,5174	1,59
LFM101 MMG4,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	13,83 ±3,4	ND	ND	ND	ND
	72	1,93 ±0,01	6,54 ±0,1	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	7,15 ±3,2	0,1384	0,0000	0,1384	1,79
LFM101 MMG4,5+H0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	20,26 ±9,2	ND	ND	ND	ND
	72	2,63 ±0,6	6,65 ±0,04	99,39 ±0,8	0,11 ±0,2	23,27 ±17,9	0,6673	0,0020	0,6693	1,96
LFM101 MMG4,5+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	20,94 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,24 ±0,2	6,81 ±0,01	98,98 ±1,4	1,02 ±1,4	11,78 ±11,1	0,2541	0,0012	0,2553	1,98
LFM101 MMG4,5+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	10,86 ±0,5	ND	ND	ND	ND
	72	2,32 ±0,2	7,10 ±0,2	97,81 ±2,7	1,26 ±1,2	8,03 ±10,7	0,1720	0,0033	0,1753	2,14
LFM101 MMG4,5+H1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	19,19 ±4,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,44 ±0,0	7,08 ±0,02	98,93 ±0,0	1,07 ±0,0	30,31 ±0,0	0,7291	0,0105	0,7396	1,70
LFM101 MMG4,5+H2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	22,16 ±1,9	ND	ND	ND	ND
	72	2,38 ±0,2	7,37 ±0,1	99,39 ±0,9	0,61 ±0,9	24,34 ±4,8	0,5793	0,0038	0,5831	1,80
LFM101 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	16,86 ±1,8	ND	ND	ND	ND
	72	3,34 ±1,9	6,34 ±0,4	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	22,97 ±16,6	0,9212	0,0000	0,9212	2,42
LFM101 MMG5+H0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	14,93 ±3,8	ND	ND	ND	ND
	72	3,30 ±1,0	6,67 ±0,1	99,14 ±0,5	0,86 ±1,5	16,37 ±4,1	0,5175	0,0056	0,5231	2,78
LFM101 MMG5+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	15,32 ±2,7	ND	ND	ND	ND
	72	2,97 ±0,7	6,80 ±0,1	99,26 ±0,7	0,74 ±0,7	16,79 ±2,4	0,4839	0,0050	0,4889	2,48
LFM101 MMG5+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	15,17 ±1,8	ND	ND	ND	ND
	72	2,71 ±0,3	7,04 ±0,1	98,49 ±0,2	1,51 ±0,2	20,30 ±3,5	0,5344	0,0109	0,5453	2,16
LFM101 MMG5+H1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	18,69 ±6,2	ND	ND	ND	ND
	72	2,73 ±0,04	7,17 ±0,1	98,57 ±0,1	1,43 ±0,1	22,69 ±9,7	0,6050	0,0115	0,6165	2,11
LFM101 MMG5+H2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	21,06 ±8,5	ND	ND	ND	ND
	72	2,24 ±0,4	7,50 ±0,2	98,15 ±0,6	1,85 ±0,6	22,64 ±11,1	0,5171	0,0113	0,5284	1,71
LFM101 MMG10	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	31,93 ±16,2	ND	ND	ND	ND
	72	4,21 ±0,3	6,50 ±0,05	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	49,25 ±1,0	2,0742	0,0000	2,0742	2,14
LFM101 MMG10+H0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	32,24 ±15,4	ND	ND	ND	ND
	72	3,81 ±0,2	6,63 ±0,05	99,60 ±0,1	0,40 ±0,1	44,71 ±2,6	1,6944	0,0088	1,7032	2,11
LFM101 MMG10+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	35,97 ±17,9	ND	ND	ND	ND
	72	3,18 ±0,3	6,75 ±0,04	99,27 ±0,1	0,57 ±0,2	42,65 ±9,2	1,3299	0,0098	1,3397	1,84
LFM101 MMG10+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	28,74 ±18,5	ND	ND	ND	ND
	72	3,09 ±0,5	7,00 ±0,04	98,98 ±0,3	1,02 ±0,3	39,47 ±8,2	1,2275	0,0158	1,2433	1,85
LFM101 MMG10+H1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	26,34 ±10,5	ND	ND	ND	ND
	72	3,01 ±0,5	7,08 ±0,1	98,58 ±0,5	1,42 ±0,5	28,40 ±16,7	0,8818	0,0182	0,9000	2,11
LFM101 MMG10+H2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	22,34 ±10,6	ND	ND	ND	ND
	72	2,49 ±0,8	6,88 ±0,2	98,44 ±0,6	1,56 ±0,6	24,94 ±15,0	0,6950	0,0112	0,7062	1,78
LFM101 MMG15	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	35,53 ±12,92	ND	ND	ND	ND
	72	5,17 ±0,2	6,48 ±0,05	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	48,23 ±3,8	2,4952	0,0000	2,4952	2,67
LFM101 MMG15+H0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	26,14 ±17,4	ND	ND	ND	ND
	72	4,41 ±0,9	6,70 ±0,2	99,09 ±1,3	0,91 ±0,7	46,96 ±10,3	2,0987	0,0165	2,1152	2,29
LFM101 MMG15+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	43,57 ±5,8	ND	ND	ND	ND
	72	4,45 ±0,6	6,52 ±0,3	99,58 ±0,2	0,39 ±0,1	49,74 ±2,8	2,1946	0,0112	2,2058	2,24
LFM101 MMG15+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	45,27 ±8,5	ND	ND	ND	ND
	72	3,91 ±1,1	6,67 ±0,3	99,05 ±0,6	0,80 ±0,5	43,02 ±13,1	1,7510	0,0150	1,7660	2,14
LFM101 MMG15+H1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	31,28 ±7,5	ND	ND	ND	ND
	72	3,54 ±1,1	6,41 ±0,2	99,22 ±0,5	0,78 ±0,5	29,38 ±8,2	1,0436	0,0091	1,0527	2,49
LFM101 MMG15+H2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	31,97 ±13,1	ND	ND	ND	ND
	72	3,58 ±1,3	6,84 ±0,3	98,89 ±0,8	1,11 ±0,8	33,41 ±14,8	1,3152	0,0132	1,3284	2,25

MMGH: cultivo em meio mineral com glicose e/ou ácido hexanóico (o número após a sigla indica a concentração de glicose e/ou ácido hexanóico utilizada); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxi butirato (4 C); HHx: 3-hidroxi hexanoato (6 C); ND: não determinado.





**Figura 5.1-** Gráficos do perfil de acúmulo de PHA total e monômeros 3HB e 3HHx por *Burkholderia sacchari* linhagem selvagem a partir de glicose e ácido hexanóico em meio mineral (MMG, o número após a sigla indica a concentração de glicose utilizada, H indica a concentração de ácido hexanóico fornecida) (continua).



**Figura 5.1-** Gráficos do perfil de acúmulo de PHA total e monômeros 3HB e 3HHx por *Burkholderia sacchari* linhagem selvagem a partir de glicose e ácido hexanóico em meio mineral (MMG, o número após a sigla indica a concentração de glicose utilizada, H indica a concentração de ácido hexanóico fornecida) (conclusão).

Ainda frente a 5 g/L de glicose foi possível perceber o efeito do ácido hexanóico em promover o acúmulo de frações de 3HHx. Na ausência de ácido hexanóico, não se observou a incorporação de unidades 3HHx. Em presença de 0,25-0,5 g/L cerca de 1 mol% de 3HHx foi observado no PHA e, em presença de 1,0-2,0 g/L, a fração de 3HHx representou 1,5 a 2 mol% do polímero (Fig. 5.1.C). Também foi possível observar um aparente aumento do fluxo de formação de 3HHx (Fig 5.1.E), embora os valores observados para diversas concentrações de ácido hexanóico não tenham se mostrado significativamente diferentes. Deve-se destacar, finalmente, que a fração de 3HHx medida foi sempre em valores de até 2 mol% (menor que 0,02 g/L). Estes valores são compatíveis com aqueles observados para outras linhagens, como *R. eutropha*, cultivada sob condições similares. Para esta linhagem selvagem, cuja PHA sintase é similar à de *B. sacchari*, foi

produzido o copolímero de P(3HB-*co*-3HHx) com teor de 2,2 mol% de monômeros 3HHx (GROSS *et al.*, 1989; ULMER *et al.*, 1989).

Pode-se concluir que foi possível confirmar a observação de trabalhos anteriores que indicavam a presença de traços de uma possível fração de 3HHx a partir de ácido hexanóico em *B. sacchari* (BUFFONI *et al.*, 2005; BUFFONI, 2006). Embora tenha sido alcançado um discreto aumento desta fração com estes experimentos, suficiente para comprovar o seu acúmulo, valores ainda superiores a 2 mol% não foram observados. Isto pode indicar que a PHA sintase de *B. sacchari* permite a formação de PHA com teores combinados de 3HB e de 3HHx, entretanto, as vias de catabolismo de ácido hexanóico devem ser mais eficientes. O fator de conversão máximo teórico de ácido hexanóico a unidades 3HHx seria de 0,98g/g. Assim, os valores aqui obtidos correspondem a menos do que 10% deste máximo teórico. Dois fatores podem contribuir para isto: a eficiência maior da  $\beta$ -oxidação na degradação do ácido hexanóico, que diminuiria o seu direcionamento para a formação de 3HHx e a baixa especificidade da PHA sintase por esses monômeros.

Ainda com o objetivo de avaliar o potencial da PHA sintase de *B. sacchari* incorporar 3HHx ao polímero, foi fornecido o ácido octanóico como precursor da síntese deste monômero. Ensaio similares foram realizados, fornecendo-se ácido octanóico (0,25 a 1 g/L) após a exaustão da fonte de nitrogênio. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.2. Quando se utilizou glicose nas concentrações 5,0, 10 e 15 g/L, e ácido octanóico a 0,25, 0,5 e 1,0 g/L as culturas apresentaram acúmulo total de polímero variando entre 1,09 e 39,27% da massa celular. Quando se ofereceram os dois substratos combinados, o maior acúmulo de PHA foi de 27,61%, nas concentrações de glicose 15 g/L e de ácido octanóico 0,25 g/L. A realização destes experimentos baseou-se no fato de que o ácido octanóico deve ser metabolizado pela via  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, na qual ao final de um ciclo perdem-se dois carbonos, e, portanto, ficaria um intermediário com seis carbonos que poderia ser incorporado como monômeros 3HHx no polímero, se as demais vias metabólicas de produção de PHA da célula fossem capazes de fazê-lo. A partir dos resultados obtidos, parece que a célula utiliza o ácido octanóico para crescimento e/ou acúmulo de 3HB. Resultados semelhantes foram obtidos por Buffoni e colaboradores (2005) e Buffoni (2006), com *B. sacchari*, quando se ofereceu glicose na concentração de 5 g/L e ácido octanóico a 1 g/L, houve somente produção de unidades 3HB no polímero.

**Tabela 5.2-** Produção de PHA por *Burkholderia sacchari* linhagem selvagem (LFM 101) a partir de glicose e ácido octanóico.

Linhagem/ Condição de cultivo	Tempo (h)	MSC g/L	pH	PHA (mol%)		PHA (%MSC)	PHA (g)	X(R) (g/L)
				3HB	3HHx			
LFM101 MMG5	24	ND	ND	100,00	0,00	21,97	ND	ND
	72	1,73	6,46	100,00	0,00	4,02	0,0695	1,66
LFM101 MMG5+O0,25	24	ND	ND	100,00	0,00	20,98	ND	ND
	72	2,31	6,30	100,00	0,00	16,38	0,3784	1,93
LFM101 MMG5+O0,5	24	ND	ND	100,00	0,00	22,07	ND	ND
	72	2,14	6,47	100,00	0,00	4,10	0,0877	2,05
LFM101 MMG5+O1,0	24	ND	ND	100,00	0,00	32,62	ND	ND
	72	1,92	6,67	100,00	0,00	13,20	0,2534	1,67
LFM101 MMG10	24	ND	ND	100,00	0,00	30,12	ND	ND
	72	4,10	4,10	100,00	0,00	3,52	0,1443	3,96
LFM101 MMG10+O0,25	24	ND	ND	100,00	0,00	19,57	ND	ND
	72	3,42	5,52	100,00	0,00	3,72	0,1273	3,29
LFM101 MMG10+O0,5	24	ND	ND	100,00	0,00	31,17	ND	ND
	72	2,60	6,30	100,00	0,00	3,05	0,0793	2,52
LFM101 MMG10+O1,0	24	ND	ND	100,00	0,00	22,18	ND	ND
	72	2,31	6,49	100,00	0,00	1,09	0,0252	2,28
LFM101 MMG15	24	ND	ND	100,00	0,00	37,07	ND	ND
	72	5,63	5,21	100,00	0,00	39,27	2,2109	3,42
LFM101 MMG15+O0,25	24	ND	ND	100,00	0,00	21,14	ND	ND
	72	4,42	5,08	100,00	0,00	27,61	1,2204	3,20
LFM101 MMG15+O0,5	24	ND	ND	100,00	0,00	31,34	ND	ND
	72	3,50	5,59	100,00	0,00	10,29	0,3602	3,14
LFM101 MMG15+O1,0	24	ND	ND	100,00	0,00	19,41	ND	ND
	72	2,39	6,12	100,00	0,00	4,41	0,1054	2,28

MMGO: cultivo em meio mineral com glicose e/ou ácido octanóico(o número após a sigla indica a concentração de glicose e/ou ácido octanóico utilizada); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxitirato (4 C); HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); ND: não determinado.

O emprego de ácido octanóico também teve o propósito de indicar se o uso de ácidos orgânicos de cadeia maior seria uma opção para a produção de PHA híbridos, de modo que ácidos graxos derivados de óleos vegetais pudessem ser uma matéria-prima promissora, entretanto, nas condições testadas isto não se observou na linhagem selvagem (Anexo B). Testes realizados posteriormente, modificando as condições de fornecimentos de substratos para o acúmulo demonstraram que isto pode ser realizado Lício e colaboradores (2009) forneceram exclusivamente ácido octanóico (1,44 g/L) como fonte de carbono e limitação maior de nitrogênio[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 g/L], tendo observado acúmulo de 0,36 mol% de unidades 3HHx por *B. sacchari*. Outros autores forneceram ácido

octanóico 0,1% (m/v) a linhagens de *R. eutropha* que incorporaram entre 0,1 e 0,3 mol% de unidades 3HHx associadas a unidades 3HB (LIEBERGESELL *et al.*, 1991). Caballero e colaboradores (1995) reportaram acúmulo de 2,1 mol% de 3HHx pela linhagem KCP1 a partir de ácido octanóico na concentração 14 mM. Green e colaboradores (2002) cultivaram linhagem selvagem de *R. eutropha* H16 com ácido octanóico (2 g/L) como fonte de carbono e ácido acrílico, um inibidor da  $\beta$ -oxidação, em concentrações de até 29,3 mM. O polímero produzido era composto principalmente de 3HB e de monômeros de 3HHx e 3HO. O estudo concluiu que com o aumento da concentração de ácido acrílico o acúmulo de PHA diminui, mas a fração molar dos monômeros 3HHx aumenta e, nestes experimentos, variou de 0,08 a 5,7 mol%.

Recentemente, linhagens selvagens de *R. eutropha* (*Wautersia eutropha*) H16 e B5786 cultivadas em CO<sub>2</sub> e ácidos alcanóicos como co-substratos produziram polímeros com monômeros 3HHx. Quando CO<sub>2</sub> foi usado com única fonte de carbono, em autotrofia, as linhagens acumularam cerca de 6 g/L de biomassa em 48 h, sendo cerca de 60% desta massa na forma de PHA. O polímero era predominantemente composto de 3HB (96-99 mol%), contendo 3HV (0,6-2,8 mol%) e 3HHx (0,2-0,7 mol%). As mesmas cepas, cultivadas em condições heterotróficas, em meio com frutose e ácido hexanóico ou octanóico produziram, respectivamente, 1,3 mol% e 0,2 mol% de 3HHx em 48 h de cultivo (VOLOVA *et al.*, 2008).

Ainda dentro da estratégia de modificação das condições de cultivo para promover a incorporação de unidades 3HHx ao PHA, foram realizados experimentos com glicose (5, 10 e 15 g/L) combinada a ácido butírico (0,25-1,0 g/L). Estes experimentos foram programados com base em dados da literatura em que Fukui e colaboradores (2002) demonstraram que o produto do gene *bktB* presente em *R. eutropha* participa de uma via metabólica em que catalisa a condensação de um intermediário com 4 carbonos (butiril-CoA) e um acetil-CoA (com 2 carbonos), formando um intermediário de 6 carbonos (3-cetohexanoil-CoA), que pode ser incorporado ao PHA como monômero 3HHx, após a ação de uma 3-cetoacil-CoA redutase. Slater e colaboradores (1998) já haviam avaliado a afinidade do produto de *bktB* de *R. eutropha* na atividade de tiolase frente a diferentes substratos. Embora tenha preferência por 3-cetovaleril-CoA, também catalisa de modo eficiente a tiólise de 3-cetohexanoil-CoA. Assim, do mesmo modo que foi observado por Fukui e colaboradores (2002) em *R. eutropha*, esperava-se que *B. sacchari*, que possui metabolismo similar, pudesse efetuar a condensação do butiril-CoA, obtido a partir do ácido butírico, com acetil-CoA, formando 3HHx (Anexo C).

Foi observada uma quantidade de PHA produzida variando de 3,05 a 37,05% da massa celular seca (Tabela 5.3). O maior acúmulo de polímero quando se ofereceram os dois substratos combinados foi de 25,18%, para glicose a 15 g/L e ácido butírico 0,25 g/L. Entretanto, apenas monômeros de 3HB foram detectados no PHA, sugerindo que *B. sacchari* não foi capaz de condensar os intermediários do metabolismo de modo a produzir monômeros de 3HHx ao se utilizar glicose e ácido butírico como substratos.

**Tabela 5.3-** Produção de PHA por *Burkholderia sacchari* linhagem selvagem (LFM 101) a partir de glicose e ácido butírico.

Linhagem/ Condição de cultivo	Tempo (h)	MSC g/L	pH	PHA (mol%)		PHA (%MSC)	PHA (g)	X(R) (g/L)
				3HB	3HHx			
LFM101 MMG5	24	ND	ND	100,00	0,00	19,73	ND	ND
	72	2,5	5,83	100,00	0,00	3,54	0,0885	2,41
LFM101 MMG5+B0,25	24	ND	ND	100,00	0,00	11,04	ND	ND
	72	1,96	6,27	100,00	0,00	3,05	0,0598	1,90
LFM101 MMG5+B0,5	24	ND	ND	100,00	0,00	17,51	ND	ND
	72	2,07	6,48	100,00	0,00	5,10	0,1056	1,96
LFM101 MMG5+B1,0	24	ND	ND	100,00	0,00	8,58	ND	ND
	72	2,37	6,7	100,00	0,00	4,18	0,0991	2,27
LFM101 MMG10	24	ND	ND	100,00	0,00	23,81	ND	ND
	72	4,24	4,78	100,00	0,00	24,27	1,0290	3,21
LFM101 MMG10+B0,25	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	72	4,22	4,11	100,00	0,00	12,54	0,5292	3,69
LFM101 MMG10+B0,5	24	ND	ND	100,00	0,00	25,86	ND	ND
	72	3,68	5,41	100,00	0,00	7,51	0,2764	3,40
LFM101 MMG10+B1,0	24	ND	ND	100,00	0,00	25,86	ND	ND
	72	3,37	6,14	100,00	0,00	9,60	0,3235	3,05
LFM101 MMG15	24	ND	ND	100,00	0,00	22,33	ND	ND
	72	4,76	3,8	100,00	0,00	37,05	1,7636	3,00
LFM101 MMG15+B0,25	24	ND	ND	100,00	0,00	21,26	ND	ND
	72	4,52	4,74	100,00	0,00	25,18	1,1381	3,38
LFM101 MMG15+B0,5	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	72	4,32	4,8	100,00	0,00	19,86	0,8580	3,46
LFM101 MMG15+B1,0	24	ND	ND	100,00	0,00	21,35	ND	ND
	72	4,22	4,95	100,00	0,00	19,12	0,8069	3,41

MMGB: cultivo em meio mineral com glicose e/ou ácido butírico (o número após a sigla indica a concentração de glicose e/ou ácido butírico utilizada); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); ND: não determinado.

## 5.2 Obtenção de mutantes de *B. sacchari* afetados no crescimento em ácido hexanóico ( $hx^-$ )

A segunda estratégia abordada neste trabalho foi a obtenção e estudo de mutantes afetados na utilização de ácido hexanóico para o crescimento e avaliação da sua capacidade de acúmulo da fração 3HHx no copolímero. Trabalhos anteriores foram bem sucedidos ao selecionar mutantes de *B. sacchari* incapazes de crescer em propionato mas ainda capazes de transportá-lo para o interior da célula e utilizá-lo para aumentar fração de 3-hidroxivalerato (3HV) ao copolímero com 3HB (SILVA *et al.*, 2000). Esta mesma abordagem foi adotada aqui. Duas técnicas foram utilizadas para a obtenção de mutantes  $hx^-$ : irradiação UV e uso de transposon mini-*Tn5*.

### 5.2.1 Obtenção de mutantes $hx^-$ por irradiação UV

#### 5.2.1.1 Avaliação da sobrevivência de *Burkholderia sacchari* à radiação UV

A Figura 5.1a apresenta a curva de sobrevivência obtida após os diferentes tempos de exposição à radiação UV.

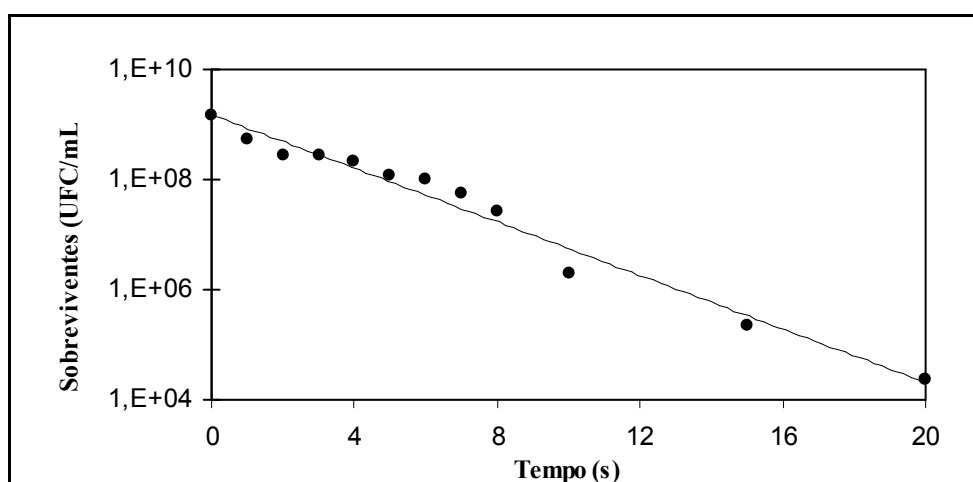


Figura 5.1a- Sobrevivência de *Burkholderia sacchari* LFM 101 (UFC/mL) submetida a diferentes períodos de irradiação UV.

O decaimento da viabilidade apresentou uma cinética de primeira ordem, ou seja, linear em um gráfico semilogarítmico, o que está de acordo com o que também foi descrito por Silva (1998). Os períodos de exposição de 5, 6, 7 e 8 s foram escolhidos, pois permitiram uma sobrevivência entre 1,89 e 8,68%, dentro do intervalo previamente determinado, entre 1 e 10%. Segundo a literatura, as doses de radiação UV que promovam esta faixa de sobrevivência são geralmente empregadas. Uma porcentagem menor ou maior de sobrevivência poderá provocar, respectivamente, indução de danos em excesso, com grande probabilidade de gerar mutantes alterados em mais de uma região do genoma, ou serem insuficientes para gerar mutantes desejados com boa probabilidade.

### 5.2.1.2 Concentração de ácido hexanóico inibitória ao crescimento

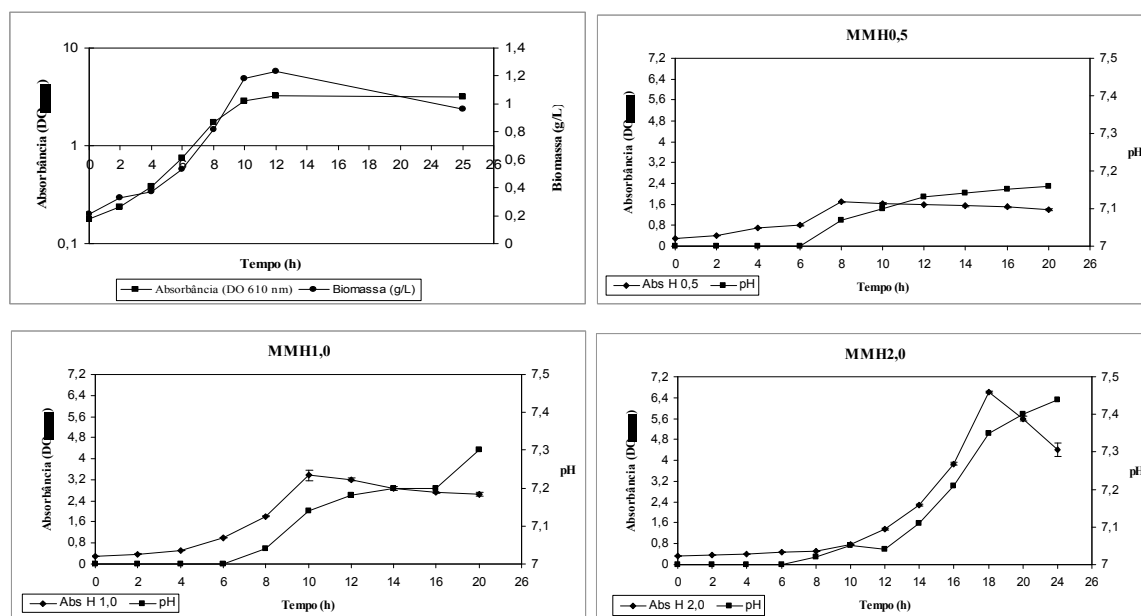
Estes experimentos foram realizados para definir a concentração de ácido hexanóico a ser empregada nos testes de enriquecimento de mutantes incapazes de crescer neste substrato, evitando, assim, que a própria concentração de ácido hexanóico provocasse inibição. Os perfis de crescimento de *B. sacchari* frente às concentrações de ácido hexanóico utilizadas para verificar a ocorrência de inibição estão apresentados na Figura 5.2.

O perfil de crescimento de *B. sacchari* em cultivo de 12 h está apresentado na figura 5.2. A velocidade específica de crescimento máxima ( $\mu_{\max}$ ) foi calculada, sendo igual a  $0,32 \text{ h}^{-1}$ . A fase de crescimento exponencial se deu entre 2 e 10 horas de cultivo. As curvas de absorbância ( $\text{DO}_{610}$ ) e biomassa, em função do tempo, apresentaram perfis similares.

Observou-se um crescimento maior quando se aumentava a concentração de ácido hexanóico no meio de cultivo. Na concentração de 0,5 g/L de ácido hexanóico no MM, a partir de 2 h de cultivo já havia mudança de  $\text{DO}_{610}$ , no entanto, o tempo máximo de cultivo foi de 8 h ( $\text{DO}_{610}$  aproximada de 2,0). Na curva apresentada para a condição de 1,0 g/L do ácido, em 10 h de cultivo mediu-se uma absorbância máxima de 3,2, número superior ao máximo alcançado para a condição descrita anteriormente. Já para a concentração de 2,0 g/L, ocorreu crescimento lento nos tempos iniciais, indicado pela longa fase de adaptação, até 8 h de cultivo. Neste caso, apesar de se ter observado uma maior  $\text{DO}_{610}$  (superior a 6,4), quando comparada a dos outros cultivos, houve uma demora



de cerca de em 18 h para alcançá-la. Além disso, para se chegar à absorbância de 3,2, máxima obtida para o cultivo em MMH1, foram necessárias aproximadamente 15 h de cultivo em MMH2.

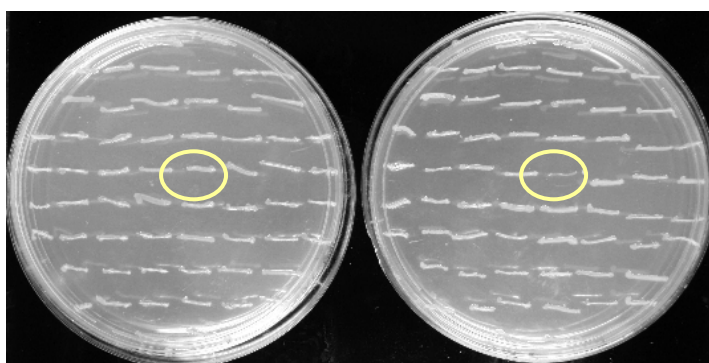


**Figura 5.2-** Crescimento de *Burkholderia sacchari* LFM 101 em meio mineral com glicose 2 g/L (MMG2), utilizada como controle, gráfico superior à esquerda. Medidas de densidade óptica a 610 nm (■) e biomassa celular (●). Crescimento de *Burkholderia sacchari* LFM 101 em meio mineral contendo ácido hexanóico 0,5 g/L (MMH0,5), 1,0 g/L (MMH1) e 2,0 g/L (MMH2) como única fonte de carbono, gráficos superior à direita e inferior à esquerda. Medidas de densidade óptica a 610 nm (◆), média de três repetições com intervalo de confiança, e pH (■).

A concentração de 1 g/L de ácido hexanóico foi aquela que se mostrou mais apropriada, pois permitiu que a cultura chegasse a  $DO_{610}$  máxima em menos tempo de cultivo, cerca de 10 h. As outras duas concentrações, 0,5 g/L e 2,0 g/L, mostraram-se não apropriadas, pois com elas as culturas não apresentaram boa densidade celular ou necessitaram de um período de tempo prolongado para atingir massa celular equivalente à mesma obtida em período menor de tempo na concentração 1 g/L, respectivamente. O tempo de cultivo de 11 h foi utilizado, conforme Silva (1998), já que a concentração escolhida apresentava um tempo de cultivo para atingir a  $DO$  máxima similar a este (10 h).

### 5.2.1.3 Seleção de clones mutantes UV $hx^-$ ( $sac^+/gli^+$ )

Os clones mutantes obtidos por radiação UV foram selecionados por enriquecimento em meio mineral contendo ácido hexanóico e ampicilina e testados quanto à capacidade de crescer em sacarose e a incapacidade de crescer em ácido hexanóico ( $sac^+/hx^-$ ). Foram obtidos cerca de 19.000 mutantes. Todos estes foram submetidos aos testes de crescimento e apenas 1 se enquadrou nas características de seleção (Figura 5.3). Testes confirmatórios revelaram que se trata de um mutante afetado parcialmente no consumo do ácido hexanóico, pois apresenta um crescimento lento em meio mineral com esta fonte de carbono. O clone selecionado foi denominado TA-01 (LFM 826).



**Figura 5.3-** Seleção de clones mutantes  $hx^-$  ( $sac^+/gli^+$ ). À esquerda, placa com meio mineral contendo 1 g/L de sacarose (MMS1); à direita, meio mineral contendo ácido hexanóico 1 g/L (MMH1). Tempo de incubação 48 h. O círculo identifica o clone mutante de *Burkholderia sacchari* LFM 101 selecionado (TA-01), deficiente, parcialmente, no consumo de ácido hexanóico ( $hx^-$ ).

Silva (1998), utilizando o mesmo procedimento de mutação e seleção de clones de *B. sacchari* obteve 268 mutantes de interesse, afetados no consumo de ácido propiônico. Filipov (2000), utilizando-se também da luz ultravioleta, obteve 3 clones mutantes a partir de *B. sacchari* incapazes de acumular PHA ( $PHA^-$ ). Para se obter uma explicação acerca dos diferentes resultados alcançados no presente trabalho, os clones obtidos foram testados em meio mineral sólido com ácido hexanóico a 1 g/L e 15  $\mu$ g/mL de ampicilina. Aproximadamente 83% dos clones apresentavam resistência ao antibiótico, portanto, o enriquecimento selecionou clones resistentes a ampicilina, em detrimento dos clones afetados no consumo do ácido hexanóico.

### 5.2.2 Seleção de clones $hx^-$ ( $sac^+/gli^+$ ) mutados por transposon

Dada a dificuldade de se conseguir o mutante desejado empregando-se radiação UV, outra estratégia abordada foi a obtenção de mutantes utilizando-se o transposon mini-Tn5 *lacZ* (DE LORENZO *et al.*, 1990; BRAZ e MARQUES, 2005) que também gera uma mutação aleatória, como aquela por radiação UV, apresenta como vantagem a maior facilidade de posterior identificação do gene afetado.

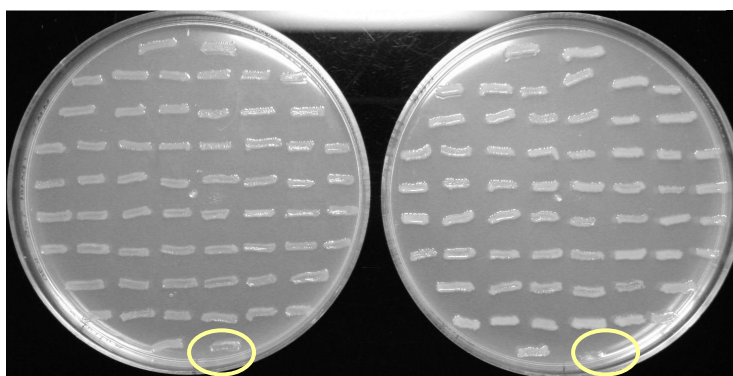
O transposon Tn5 estabelece um mecanismo de transposição conservativo, ou seja, o elemento transponível é excisado de um local do DNA, no caso o plasmídeo, e se insere em um segundo local. A mutação se estabelece quando a inserção do transposon acontece no interior de um gene, gerando a perda da continuidade linear do mesmo (MADIGAN *et al.*, 2004). O transposon mini-Tn5 é derivado do Tn5 e tem como vantagem simplificar substancialmente a geração de mutantes de inserção, a fusão *in vivo* com genes repórteres ou a introdução de fragmentos de DNA exógeno ao DNA de uma variedade de bactérias gram-negativas (DE LORENZO *et al.*, 1990).

O plasmídeo pUT-Km2 portador do mini-Tn5 confere resistência à canamicina ao organismo que o contém, pois possui os genes de resistência ao antibiótico. *B. sacchari* LFM 101 não apresenta resistência a este antibiótico, mas ao receber este plasmídeo por conjugação gera clones mutados por transposon, que adquirem resistência a canamicina e assim podem ser recuperados e selecionados em MMG1K sólido.

Foram obtidos 1620 clones mutados por transposon de *B. sacchari* resistentes à canamicina, os quais foram testados quanto à capacidade de crescer em sacarose e a incapacidade de crescer em ácido hexanóico ( $sac^+/hx^-$ ). Um total de 20 clones foram submetidos a testes de confirmação, destes apenas 3 se enquadraram nas características de seleção (Figura 5.4). Os mutantes obtidos foram denominados TN1-17 (LFM 838), TN1-18 (LFM 839) e TN20-60 (LFM 840) e submetidos a testes de acúmulo de PHA.

No estudo dos genes envolvidos na resistência ao cádmio, Braz e Marques (2005), utilizando o plasmídeo pUT-Km2, construíram uma biblioteca de 5700 mutantes de *Caulobacter crescentus* linhagem NA1000. Foram selecionados 30 mutantes, por apresentarem deficiência no crescimento quando na presença de cloreto de cádmio 20  $\mu$ M, e seus respectivos genes interrompidos foram identificados pela técnica de sequenciamento de DNA. A mutação por transposon também foi realizada com sucesso por Silva-Queiróz (2008). Neste trabalho, utilizando-se o mesmo plasmídeo, foi construído um banco

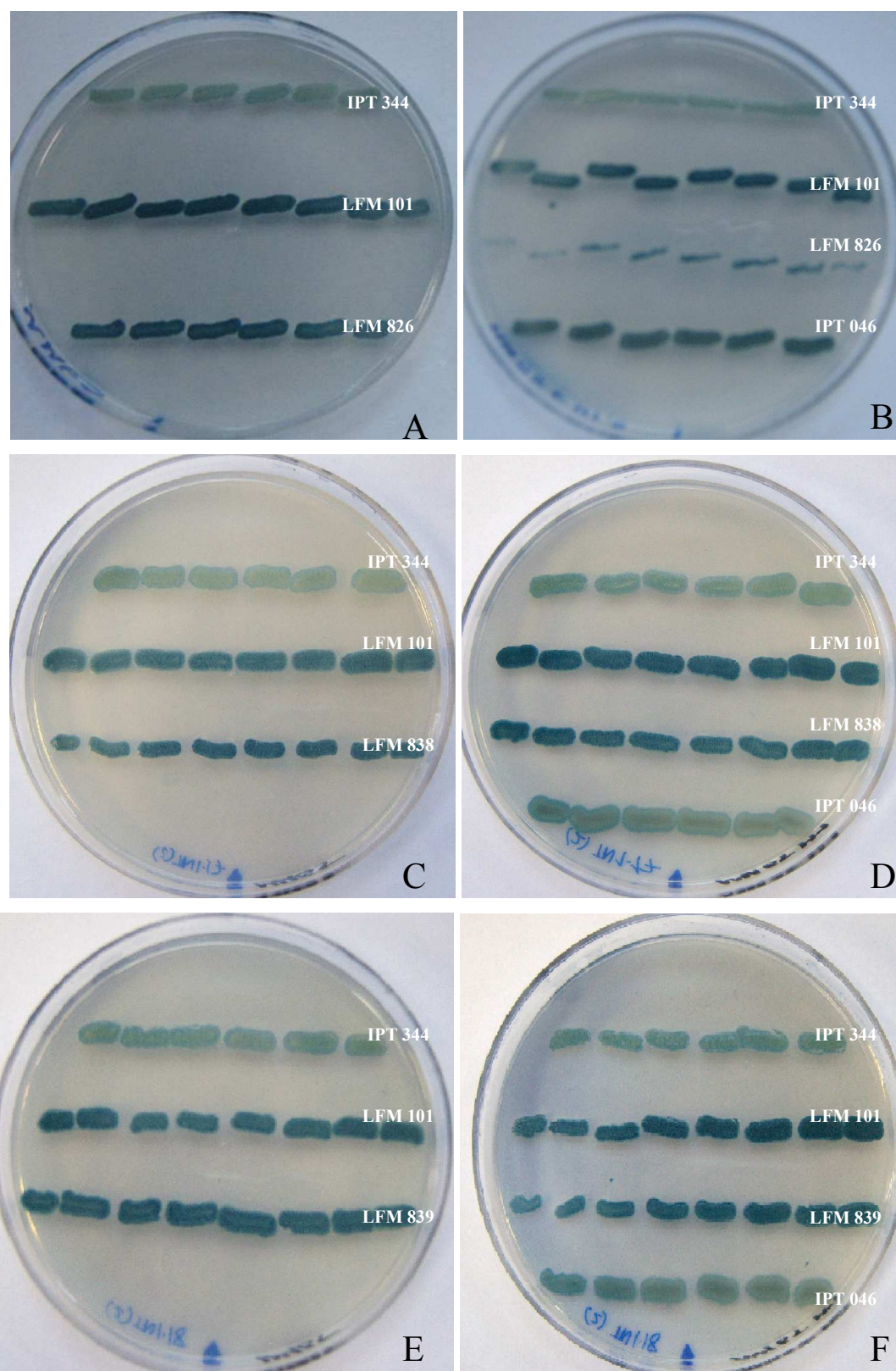
constituído de 30000 clones mutantes de *Pseudomonas putida* (IPT 046), os quais foram avaliados quanto à capacidade de crescer em ácidos graxos, selecionando-se um total de 17 mutantes afetados no metabolismo dessa fonte de carbono. Nogueira (2006) utilizando o transposon mini-*Tn5Km1* gerou 20 clones mutantes PHB<sup>-</sup> e, em análises posteriores por hibridação, revelou que três clones apresentavam duas bandas indicadoras de eventos de inserção do transposon no DNA, sugerindo que este mecanismo de pode gerar mutantes em mais de uma região do genoma.



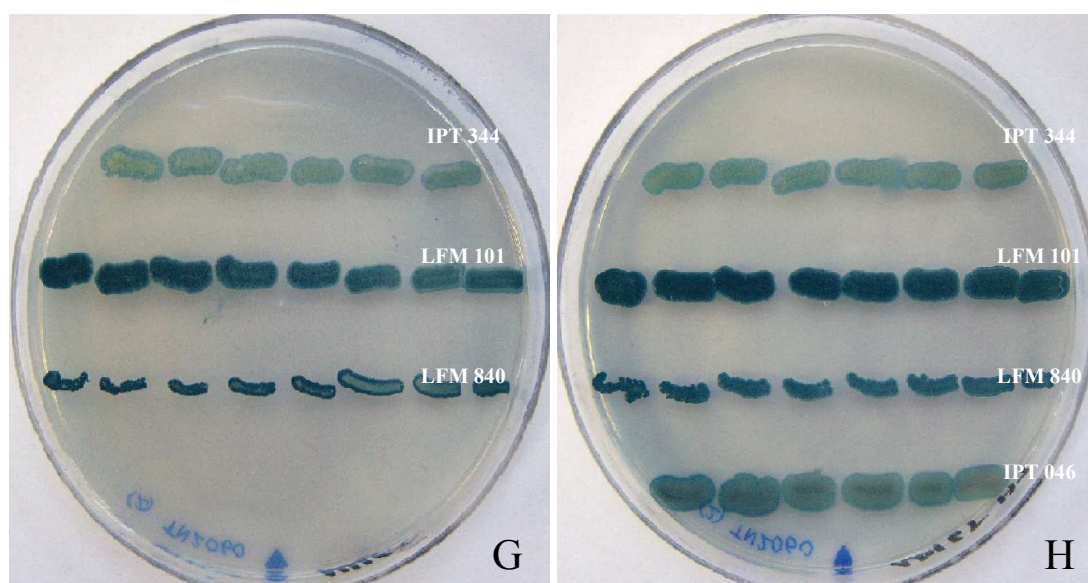
**Figura 5.4-** Seleção de clones mutantes hx<sup>-</sup> (sac<sup>+</sup>/gli<sup>+</sup>). À esquerda, placa com meio mineral contendo 1 g/L de sacarose (MMS1); à direita, meio mineral contendo ácido hexanóico 1 g/L (MMH1). Tempo de incubação 48 h. Os círculos identificam um dos 3 clones mutantes de *Burkholderia sacchari* LFM 101 selecionados.

### 5.2.3 Avaliação da produção de PHA pelos mutantes

Os mutantes TA-01 (LFM 826), TN1-17 (LFM 838), TN1-18 (LFM 839) e TN20-60 (LFM 840) foram testados quanto à capacidade de acumular PHA. Para tanto, dois conjuntos de experimentos foram realizados. Inicialmente, foram realizados testes de coloração com *Sudan Black B* (SCHLEGEL *et al.*, 1970) que indica apenas qualitativamente a capacidade de acumular polímero. Os testes se deram em presença apenas de glicose (5 g/L) ou em glicose (5 g/L) e ácido hexanóico (1 g/L). Foi evidenciado que os mutantes mantiveram sua capacidade de acúmulo quando na presença glicose e ácido hexanóico como fontes de carbono (Figura 5.5).



**Figura 5.5-** Coloração de mutantes por *Sudan Black B* em placa com meio mineral contendo 5 g/L de glicose (MMG5 g/L) itens A, C, E e G e com meio mineral com 5 g/L de glicose e ácido hexanóico 1 g/L (MMG5+H1 g/L) itens B, D, F e H. Tempo de incubação 120 h. Linhagens: IPT344 (mutante *Burkholderia sacchari* PHA<sup>-</sup>), LFM101 (*Burkholderia sacchari*), IPT046 (*Pseudomonas putida* acumuladora de PHA<sub>MCL</sub>), LFM826 (mutante UV de *Burkholderia sacchari*), LFM838 (mutante transposon mini-*Tn5*), LFM839 (mutante transposon mini-*Tn5*), LFM840 (mutante transposon mini-*Tn5*) (continua).



**Figura 5.5-** Coloração de mutantes por *Sudan Black B* em placa com meio mineral contendo 5 g/L de glicose (MMG5 g/L) itens A, C, E e G e com meio mineral contendo 5 g/L de glicose e ácido hexanóico 1 g/L (MMG5+H1 g/L) itens B, D, F e H. Tempo de incubação 120 h. Linhagens: IPT344 (mutante *Burkholderia sacchari* PHA<sup>-</sup>), LFM101 (*Burkholderia sacchari*), IPT046 (*Pseudomonas putida* acumuladora de PHA<sub>MCL</sub>), LFM826 (mutante UV de *Burkholderia sacchari*), LFM838 (mutante transposon mini-*Tn5*), LFM839 (mutante transposon mini-*Tn5*), LFM840 (mutante transposon mini-*Tn5*) (conclusão).

Após a constatação da capacidade dos mutantes acumularem PHA, procederam-se ensaios em frascos agitados, na condição de melhor acúmulo previamente selecionada glicose (5 g/L) e ácido hexanóico (0,25 a 2,0 g/L). Os resultados obtidos estão na tabela 5.4 e na figura 5.6.

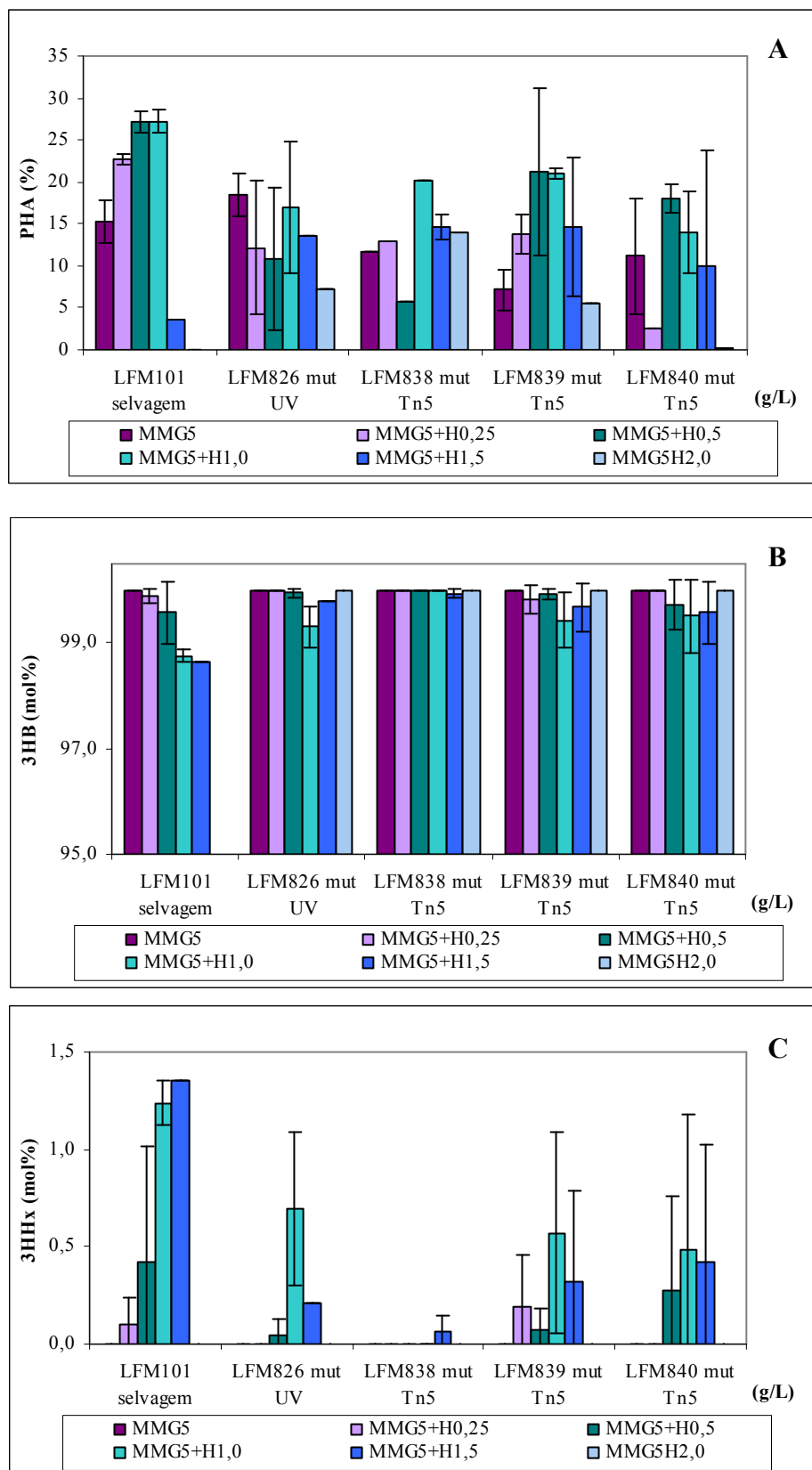
Os resultados observados indicam que, embora todos os mutantes tenham se mantido capazes de acumular PHA, nenhum deles se tornou capaz de acumular teores de PHA maiores do que a linhagem selvagem LFM 101 (Fig. 5.6 A). Assim, enquanto a linhagem selvagem alcançou o máximo teor 27% da massa celular na forma de PHA em glicose (5 g/L) e ácido hexanóico (1 g/L), na mesma condição o melhor mutante acumulou 20,9% da biomassa na forma de PHA (Figura 5.6 A).

Considerando as frações molares de 3HHx, observa-se que os mutantes não foram capazes de aumentar o teor deste monômero, ao contrário, quando comparados com a linhagem selvagem, as frações caíram de 1,24 mol% na selvagem para cerca 0,5 mol% de 3HHx no mutante LFM 839 e LFM 840 e 0,7 mol% no mutante LFM 826, em presença de glicose (5g/L) e ácido hexanóico (1 g/L) (Tab. 5.4 e Fig. 5.6 B).

**Tabela 5.4-** Produção de PHA por mutantes hx<sup>-</sup> de *Burkholderia sacchari* obtidos por UV e transposon mini-*Tn5* a partir de glicose e ácido hexanóico.

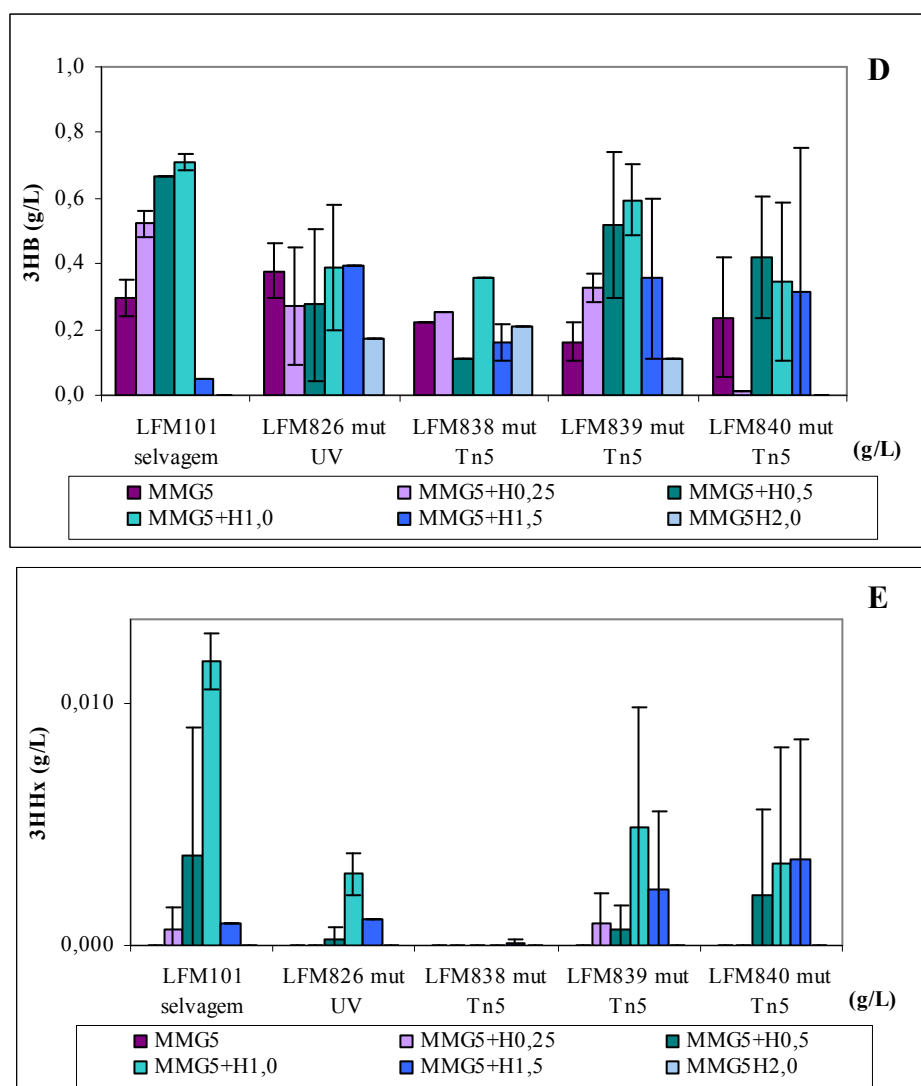
Linhagem/ Condição de cultivo	Tempo (h)	MSC g/L	pH	PHA (mol%)		PHA (%MSC)	3HB (g/L)	3HHx (g/L)	PHA (g/L)	X(R) (g/L)
				3HB	3HHx					
LFM101 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	18,87 ±1,0	ND	ND	ND	ND
	72	1,95 ±0,3	6,50 ±0,05	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	15,30 ±2,6	0,2971	0,0000	0,2971	1,65
LFM101 MMG5+H0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	14,78 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,31 ±0,2	6,69 ±0,01	99,90 ±0,1	0,10 ±0,1	22,66 ±0,6	0,5223	0,0006	0,5229	1,79
LFM101 MMG5+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	32,71 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,47 ±0,1	6,79 ±0,01	99,58 ±0,6	0,42 ±0,6	27,15 ±1,3	0,6661	0,0037	0,6698	1,80
LFM101 MMG5+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	21,58 ±1,1	ND	ND	ND	ND
	72	2,65 ±0,05	7,06 ±0,2	98,76 ±0,1	1,24 ±0,1	27,22 ±1,3	0,7083	0,0118	0,7201	1,93
LFM101 MMG5+H1,5	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	72	1,41 ±0,0	7,32 ±0,0	98,65 ±0,0	1,35 ±0,0	3,63 ±0,0	0,0503	0,0009	0,0512	1,36
LFM101 MMG5+H2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	24,20 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	0,00 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LFM826 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	24,49 ±5,1	ND	ND	ND	ND
	72	2,04 ±0,2	6,52 ±0,04	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	18,4 ±2,6	0,3793	0,0000	0,3793	1,66
LFM826 MMG5+H0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	17,09 ±5,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,22 ±0,01	6,56 ±0,2	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	12,2 ±8,0	0,2702	0,0000	0,2702	1,95
LFM826 MMG5+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	16,66 ±3,7	ND	ND	ND	ND
	72	2,39 ±0,5	6,62 ±0,1	99,95 ±0,1	0,05 ±0,8	10,8 ±7,8	0,2754	0,0003	0,2757	2,11
LFM826 MMG5+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	21,65 ±4,1	ND	ND	ND	ND
	72	2,30 ±0,2	7,01 ±0,2	99,30 ±0,4	0,70 ±0,4	17 ±0,0	0,3900	0,0030	0,3930	1,91
LFM826 MMG5+H1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	14,89 ±7,6	ND	ND	ND	ND
	72	2,91 ±0,0	7,00 ±0,1	99,79 ±0,0	0,21 ±0,0	13,64 ±0,0	0,3959	0,0011	0,3970	2,51
LFM826 MMG5+H2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	18,27 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,39 ±0,0	6,99 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	7,29 ±0,0	0,1744	0,0000	0,1744	2,22
LFM838 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	33,65 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	1,93 ±0,0	6,58 ±0,1	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	11,64 ±0,0	0,2247	0,0000	0,2247	1,71
LFM838 MMG5+H0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	31,10 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	1,96 ±0,0	6,56 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	12,99 ±0,0	0,2548	0,0000	0,2548	1,71
LFM838 MMG5+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	32,48 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	1,97 ±0,0	6,67 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	5,68 ±0,0	0,1120	0,0000	0,1120	1,86
LFM838 MMG5+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	31,86 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	1,77 ±0,0	6,38 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	20,24 ±0,0	0,3584	0,0000	0,3584	1,41
LFM838 MMG5+H1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	33,46 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	1,11 ±0,5	6,17 ±1,3	99,94 ±0,1	0,06 ±0,1	14,71 ±1,7	0,1596	0,0001	0,1597	0,95
LFM838 MMG5+H2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	31,96 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	1,52 ±0,0	7,24 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	13,91 ±0,0	0,2115	0,0000	0,2115	1,31
LFM839 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	13,43 ±2,4	ND	ND	ND	ND
	72	2,28 ±0,1	6,44 ±0,2	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	7,13 ±2,4	0,1631	0,0000	0,1631	2,12
LFM839 MMG5+H0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	18,85 ±5,8	ND	ND	ND	ND
	72	2,38 ±0,1	6,60 ±0,1	99,81 ±0,3	0,19 ±0,3	13,76 ±2,3	0,3259	0,0009	0,3268	2,05
LFM839 MMG5+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	9,68 ±12,2	ND	ND	ND	ND
	72	2,48 ±0,1	6,82 ±0,05	99,92 ±0,1	0,08 ±0,1	21,23 ±9,9	0,5196	0,0007	0,5203	1,96
LFM839 MMG5+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	18,59 ±1,5	ND	ND	ND	ND
	72	2,86 ±0,5	6,95 ±0,1	99,43 ±0,5	0,57 ±0,5	20,97 ±0,6	0,5954	0,0049	0,6003	2,26
LFM839 MMG5+H1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	14,66 ±0,1	ND	ND	ND	ND
	72	2,38 ±0,3	6,97 ±0,2	99,68 ±0,5	0,32 ±0,5	14,54 ±8,3	0,3574	0,0023	0,3597	2,02
LFM839 MMG5+H2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	13,05 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,03 ±0,0	7,24 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	5,56 ±0,0	0,1129	0,0000	0,1129	1,92
LFM840 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	19,47 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,10 ±0,8	6,48 ±0,1	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	11,16 ±6,9	0,2366	0,0000	0,2366	1,86
LFM840 MMG5+H0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	33,03 ±9,8	ND	ND	ND	ND
	72	2,47 ±0,0	6,50 ±0,2	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	2,63 ±0,0	0,0124	0,0000	0,0124	2,46
LFM840 MMG5+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	27,53 ±13,6	ND	ND	ND	ND
	72	2,28 ±0,9	6,72 ±0,1	99,72 ±0,5	0,28 ±0,5	18,05 ±1,7	0,4185	0,0020	0,4205	1,86
LFM840 MMG5+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	24,76 ±11,5	ND	ND	ND	ND
	72	2,34 ±0,9	6,92 ±0,1	99,51 ±0,7	0,49 ±0,7	14,00 ±4,9	0,3468	0,0034	0,3502	1,99
LFM840 MMG5+H1,5	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,21 ±1,4	7,07 ±0,02	99,58 ±0,6	0,42 ±0,6	10,02 ±13,9	0,3129	0,0034	0,3163	1,89
LFM840 MMG5+H2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	47,56 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	0,71 ±0,0	7,03 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,16 ±0,0	0,0012	0,0000	0,0012	0,71

MMGH: cultivo em meio mineral com glicose e/ou ácido hexanóico (o número após a sigla indica a concentração de glicose e/ou ácido hexanóico utilizada); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxi butirato (4 C); HHx: 3-hidroxi hexanoato (6 C); ND: não determinado. LFM826: mutante de *B. sacchari* obtido por radiação UV; LFM838, LFM839, LFM840: mutantes de *B. sacchari* obtidos por mutação com transposon mini-*Tn5*.



**Figura 5.6-** Gráficos do perfil de acúmulo de PHA total e monômeros 3HB e 3HHx por *Burkholderia sacchari* linhagem selvagem e mutantes a partir de glicose e ácido hexanóico (o número após a sigla indica a concentração de glicose e/ou ácido hexanóico utilizada) (continua).

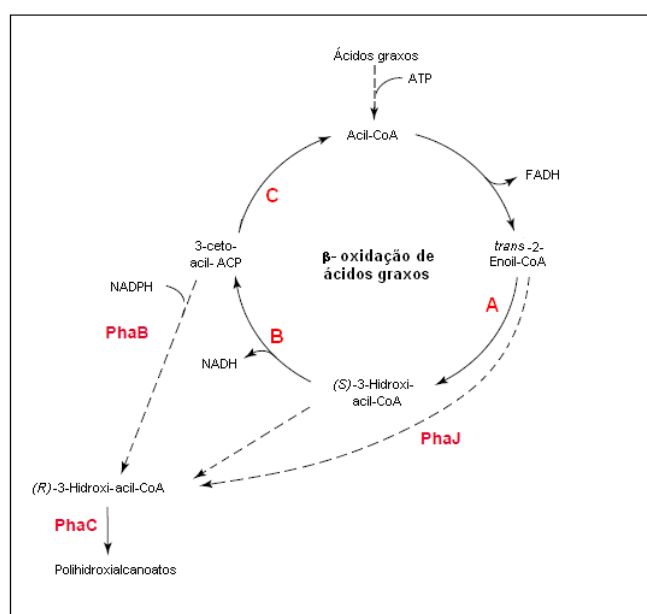




**Figura 5.6-** Gráficos do perfil de acúmulo de PHA total e monômeros 3HB e 3HHx por *Burkholderia sacchari* linhagem selvagem e mutantes a partir de glicose e ácido hexanóico (o número após a sigla indica a concentração de glicose e/ou ácido hexanóico utilizada) (conclusão).

Os resultados mostrados na Fig 5.6 C indicam que parece não ter havido um aumento do fluxo de ácido hexanóico para a formação de unidades 3HHx. Mesmo para 3HB, observou-se uma redução no direcionamento da fonte de carbono para a sua formação. Assim, embora afetados no crescimento em ácido hexanóico, estes mutantes não se tornaram capazes de melhor aproveitar a fonte de carbono para produzir PHA. Estudos anteriores com propionato mostraram que linhagens, incapazes de crescer neste substrato, ainda eram capazes de transportá-lo para o interior da célula e transformá-lo em unidades 3HV, copolimerizadas a 3HB em presença de glicose. Os valores do fator de conversão de propionato a 3HV foram aumentados para até 80% do máximo teórico no caso de *B. sacchari* (SILVA *et al.*, 2000) e cerca de 30% no caso de *R. eutropha* (LEE *et al.*, 1996).

A mesma estratégia foi recentemente aplicada a linhagens de *Pseudomonas*. Mutantes deficientes na  $\beta$ -oxidação se tornaram capazes de aumentar o acúmulo dos monômeros com tamanho de cadeia carbônica similar à cadeia do ácido graxo fornecido como substrato, tornando-se promissoras para a produção de P3HB-co-3HA<sub>MCL</sub> (OUYANG *et al.*, 2007 a,b; MA *et al.*, 2009). Entretanto, esta estratégia não foi bem sucedida para os mutantes *hx*<sup>-</sup> aqui estudados. Os mutantes, embora *hx*<sup>-</sup> ainda usam o hexanóico, embora de forma precária, já que foram capazes de acumular 3HHx, mesmo em pequenas quantidades. Já que, em presença somente de glicose não houve acúmulo de 3HHx, conclui-se que o ácido hexanóico é transportado para o interior da célula. Se este transporte foi afetado e ocorrer em menor intensidade, a disponibilidade intracelular do hexanoato pode ser reduzida, de modo que a partição de fluxos favoreça a  $\beta$ -oxidação em detrimento do desvio de intermediários para a polimerização (Fig 5.7). Outra hipótese seria que o fenótipo *hx*<sup>-</sup> seja devido à inativação de genes envolvidos na  $\beta$ -oxidação, mas que produtos de outros genes supririam sua função. Os resultados aqui apresentados mostram que os mutantes apresentaram perfis distintos de acúmulo de unidades 3HHx, o que poderia indicar que sofreram mutações distintas. A identificação dos genes afetados, após o seqüenciamento das regiões interrompidas pelo transposon, permitirá confirmar estas hipóteses ou mesmo formular outras.



**Figura 5.7-** Proposta das possíveis regiões da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (A, B e C) afetadas nos mutantes obtidos por transposon *mini-Tn5*. As linhas tracejadas indicam os passos metabólicos que drenam intermediários desta via para síntese de PHA.

As tentativas de mutação e aumento da capacidade de acúmulo, nem sempre são alcançadas de forma satisfatória. Salomoni (2005) na tentativa de obtenção de mutantes, também, por radiação UV da linhagem *Burkholderia cepacia* IPT 046 alterado quanto à capacidade de crescer em ácido 4-pentenóico, obteve 6 mutantes parcialmente afetados no consumo deste ácido e nenhum totalmente incapaz de crescer nesta fonte de carbono. Contudo, foram testados para verificação do aumento de acúmulo do polímero poli-3-hidroxi-4-pentenoato P(3H4PE), observando-se um acúmulo menor por parte dos mutantes, entre 0,8 e 1,7 mol%, quanto comparado à linhagem selvagem, 2,4 mol% do PHA em questão. Uma possível explicação para a dificuldade de se conseguir determinados mutantes seria a relevância da via metabólica que precisaria ser afetada para a obtenção da mutação desejada. Caso esta via seja uma rota essencial do metabolismo do microrganismo para a manutenção da sobrevivência, a obtenção do mutante seria inviável. O mesmo pode ser considerado analisando-se o trabalho de Silva-Queiroz (2008) que, empregando o transposon mini *Tn-5*, obteve apenas alguns mutantes de *Pseudomonas putida* afetados na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos insaturados depois de avaliar mais de 20000 clones .

### **5.3 Construção de linhagens recombinantes de *Burkholderia sacchari* portando genes de outros microrganismos**

A terceira estratégia adotada neste trabalho para verificar a incorporação de 3HHx por *B. sacchari* foi a inserção dos genes *phaB* (codificador de 3-cetoacilCoA redutase NADPH dependente) de *R. eutropha*, *phaJ1* e *phaJ4* [ambos codificadores de enoil-CoA hidratases (*R*)-específicas] de *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* possui quatro genes codificadores de enoil-CoA hidratases (Anexo D). Entre estas, aquelas codificadas por *phaJ1* e *phaJ4* apresentam maior atividade de hidratase frente a *trans*-2-enoil-CoAs de 6 carbonos (Tsuge et al., 1999, 2003), por isso foram selecionadas para este trabalho.

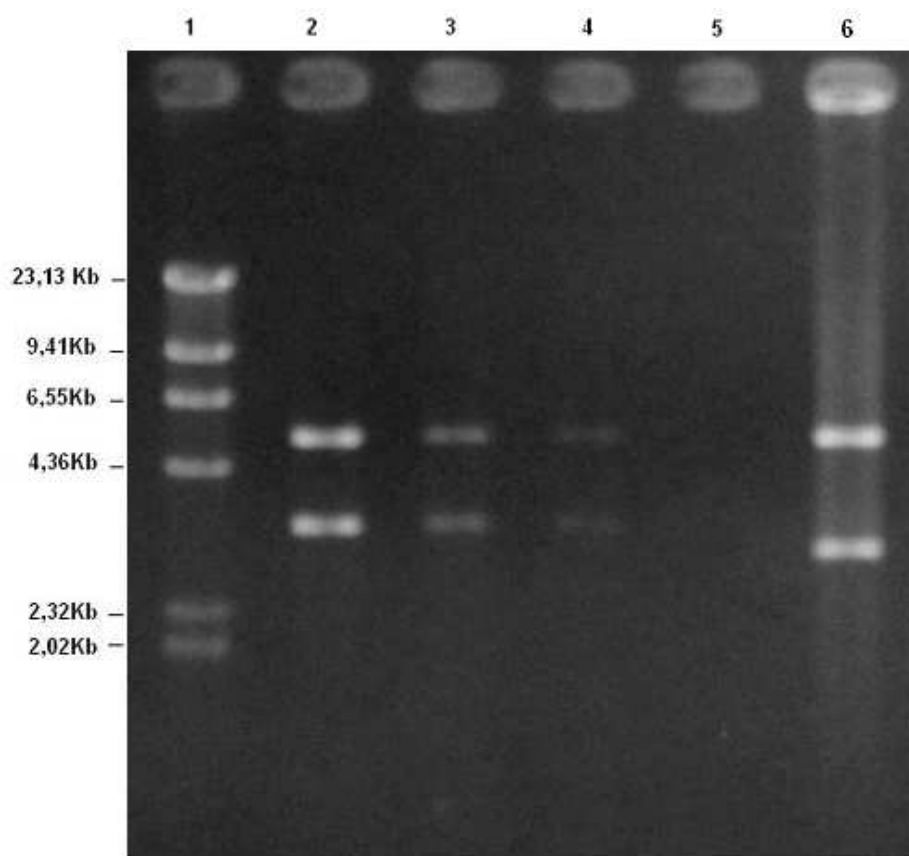
### 5.3.1 Construção de *Burkholderia sacchari* abrigando *phaB<sub>Re</sub>*

Para a construção de linhagens recombinantes, inicialmente pela inserção do gene *phaB<sub>Re</sub>*, foram feitos três procedimentos: (i) extração plasmidial, realizada porque a bactéria *E. coli* XL1 Blue (*E. coli* pBBR1MCS-2::*phaB*) (GOMES *et al.*, 2006, 2007), não é capaz de fazer conjugação; (ii) transformação, inserção do plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaB<sub>Re</sub>* em *E. coli* S17-1, capaz de fazer conjugação; (iii) conjugação entre *E. coli* S17-1 pBBR1MCS-2::*phaB<sub>Re</sub>* e *B. sacchari* selvagem.

O plasmídeo pBBR1MCS-2 confere, ao microrganismo que o contém, resistência ao antibiótico canamicina. Como dito anteriormente, *B. sacchari* LFM 101 é sensível à canamicina, não haverá crescimento deste microrganismo em MMG1K. Entretanto, nos pontos semeados com *E. coli* S17-1 pBBR1MCS-2::*phaB*, que não cresce em MMG1K, se houver conjugação, ou seja, passagem do plasmídeo para *B. sacchari*, ocorrerá o crescimento de um recombinante (*B. sacchari* pBBR1MCS-2::*phaB*).

O plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaB* foi recuperado a partir da linhagem *E. coli* XL1- Blue e transferido para a linhagem S17-1 por transformação. *E. coli* S17-1 pBBR1MCS-2::*phaB* foi submetida à conjugação com *B. sacchari* LFM 101. Testes preliminares em meio MMG1K sólido indicaram que 13 clones de *B. sacchari* recombinante (*B. sacchari* pBBR1MCS-2::*phaB*) receberam o plasmídeo que confere resistência à canamicina, tornado-se resistente ao antibiótico. Dentre estes, 4 clones recombinantes (TTM01, TTM02, TTM06 e TTM14) foram escolhidos por avaliação visual, em que se consideraram aspecto e tamanho das colônias, e preservadas por congelamento em freezer -80 °C. Para constatar a presença dos plasmídios nos recombinantes de *B. sacchari* (*B. sacchari* pBBR1MCS-2::*phaB*), procedeu-se a extração dos plasmídios dos respectivos clones recombinantes, os quais foram digeridos com enzima de restrição *Hind*III e verificados por eletroforese em um gel de agarose 0,8%. Os resultados podem ser verificados na figura 5.8.

Observa-se que 3 (TTM01, TTM02 e TTM14) dos 4 clones analisados possuíam no DNA plasmidial extraído o gene *phaB*. Foram selecionados os clones TTM01 e TTM02, que receberam a denominação LFM 841 e 842.



**Figura 5.8-** Perfil de migração em gel de agarose 0,8% mostrando os plasmídios pBBR1MCS-2 portando o gene *phaB* de *R. eutropha* extraídos de recombinantes: 1- Marcador  $\lambda$ -*Hind*III; 2- pBBR1MCS-2::*phaB<sub>Re</sub>* de *E. coli* XL1Blue digerido com *Hind*III; 3- (LFM841 - TTM01) pBBR1MCS-2::*phaB<sub>Re</sub>* de *B. sacchari* digerido com *Hind*III; 4- (LFM842 – TTM02) pBBR1MCS-2::*phaB<sub>Re</sub>* de *B. sacchari* digerido com *Hind*III; 5- (TTM06) pBBR1MCS-2::*phaB<sub>Re</sub>* de *B. sacchari* digerido com *Hind*III; 6- (TTM14) pBBR1MCS-2::*phaB<sub>Re</sub>* de *B. sacchari* digerido com *Hind*III. O pBBR1MCS-2 digerido apresenta tamanho próximo de 5,0 kb e o gene *phaB<sub>Re</sub>* possui aproximadamente 3,4 kb.

### 5.3.2 Construção de *Burkholderia sacchari* abrigando *phaJ1<sub>Pa</sub>* e *phaJ4<sub>Pa</sub>*

A construção de linhagens recombinantes pela inserção dos gene *phaJ1<sub>Pa</sub>* ou *phaJ4<sub>Pa</sub>* foram feitos em duas etapas. A primeira consistiu da montagem do vetor pBBR1MCS-2 abrigando os genes de interesse (pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* ou pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>*), já disponíveis no nosso laboratório ligados ao pGEM<sup>®</sup>-T Easy (*E. coli* XL1 Blue pGEM::*phaJ1<sub>Pa</sub>* ou *E. coli* XL1 Blue pGEM::*phaJ4<sub>Pa</sub>*) (GOMES *et al.*, 2006), e inserção em *E. coli* XL1 Blue. A segunda foi realizada em três procedimentos: (i) extração plasmidial, realizada porque a bactéria *E. coli* XL1 Blue (abrigando os vetores

pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* ou pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>*) não é capaz de fazer conjugação; (ii) transformação dos plasmídios pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* ou pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>* em *E. coli* S17-1, capaz de fazer conjugação; (iii) conjugação entre *E. coli* S17-1 pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* ou *E. coli* S17-1 pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>* e *B. sacchari* selvagem.

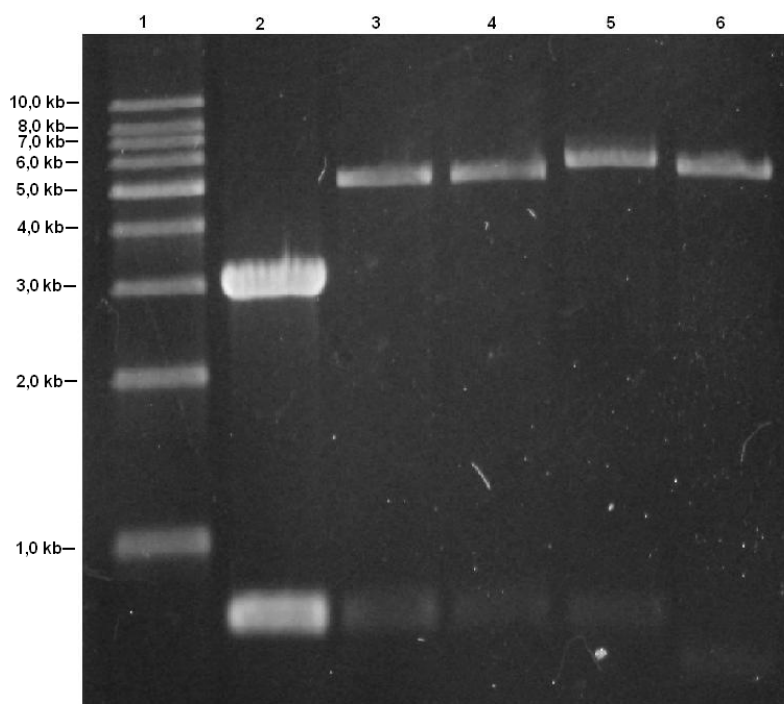
### 5.3.2.1 Montagem e inserção de pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* ou pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>*, em *E. coli* XL1 Blue

Inicialmente, para a montagem dos vetores pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* ou pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>*, os plasmídios pBBR1MCS-2, pGEM::*phaJ1<sub>Pa</sub>* ou pGEM::*phaJ4<sub>Pa</sub>* foram extraídos de *E. coli* XL1 Blue e as concentrações de DNA presentes foram medidas conforme descrito no item 4.6.1 de Material e Métodos. Em seguida, ambos os plasmídios foram digeridos com enzima *EcoRI*, uma vez que os genes presentes nos vetores pGEM::*phaJ1<sub>Pa</sub>* e pGEM::*phaJ4<sub>Pa</sub>* apresentaram como iniciadores sítios de restrição para esta enzima e ligados com T4 DNA ligase na proporção de 50:1 (pGEM+ inserto: pBBR1MCS-2). Dessa forma, os genes excisados do pGEM pela ação da enzima *EcoRI* poderiam se ligar ao pBBR1MCS-2, agora aberto no sítio de restrição *EcoRI*. Após a ligação, os plasmídios, agora pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* ou pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>*, foram transformados para *E. coli* XL1 de acordo com o descrito no item 4.6.4 de Material e Métodos e selecionados. Foram obtidos 2 clones recombinantes de *E. coli* XL1 pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* (T1 e T2) e 7 de *E. coli* XL1 pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>* (A1, A2, A3, B1, B2, B3 e B4), destes últimos apenas A3, B1, B3 e B4 continham o plasmídeo e inserto.

Para avaliar a orientação na qual o inserto se posicionava em relação ao promotor *lacZ* procederam-se alguns ensaios. As manipulações realizadas levaram em conta a presença de sítios de restrição únicos que ocorressem tanto no vetor utilizado, quanto no gene inserido.

Para verificar a orientação na qual o gene *phaJ1<sub>Pa</sub>* se inseriu em relação ao promotor *lac* presente no vetor em T1 e T2, optou-se pela digestão do mesmo com a enzima de restrição *SalI*. Esta corta numa região cerca de aproximadamente 200 bp acima (*upstream*) da região carboxiterminal (3') do gene, cortando também alguns pares de bases acima do local escolhido para inserção do fragmento de DNA no vetor (ou seja o sítio de

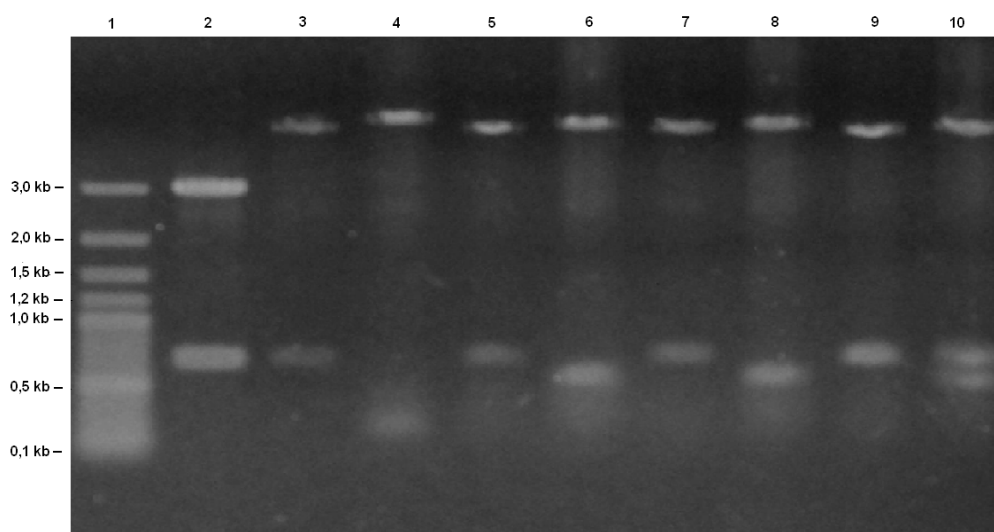
restrição *EcoRI*) (Anexo E). Após digestão com *Sall*, a expectativa era que um de dois possíveis perfis fosse visualizado no gel de agarose: (i) caso o operon estivesse na orientação que permitisse a transcrição a partir do promotor *lac* presente no vetor, duas bandas seriam visualizadas no gel de agarose, uma das quais representando parte do gene *phaJ1<sub>Pa</sub>* pouco maior que o tamanho original deste (aproximadamente 0,5 kb), e outra representando o plasmídio (com 4,5 kb) (Figura 5.9 coluna 5); (ii) por outro lado, caso o fragmento se encontrasse na orientação contrária ao sentido que permitiria a transcrição pelo promotor *lac*, seriam visualizadas no gel uma banda representando a soma dos tamanhos do vetor e mais parte do inserto e uma outra muito menor (com cerca de 0,2 kb) (Figura 5.9 coluna 6).



**Figura 5.9-** Perfil de migração em gel de agarose 0,8% mostrando os plasmídios pBBR1MCS-2 portando o gene *phaJ4* de *P. aeruginosa* extraídos de recombinantes: 1- Marcador GelPilot<sup>®</sup> 1 kb Ladder (QUIAGEN); 2- pGEM::*phaJ1<sub>Pa</sub>* de *E. coli* XL1Blue digerido com *EcoRI*; 3-(T1) pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* de *E. coli* XL1Blue digerido com *EcoRI*; 4--(T2) pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* de *E. coli* XL1Blue digerido com *EcoRI*; 5- (T1) pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* de *E. coli* XL1Blue digerido com *Sall*; 6-(T2) pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* de *E. coli* XL1Blue digerido com *Sall*. O pBBR1MCS-2 digerido apresenta tamanho próximo de 5,0 kb, o pGEM de 3,0 kb e o gene *phaJ1<sub>Pa</sub>* possui aproximadamente 0,6 kb.

Da mesma forma, para verificar a orientação na qual o gene *phaJ4<sub>Pa</sub>* se inseriu em relação ao promotor *lac* presente no vetor dos recombinantes A3, B1, B3 e B4, optou-se

pela digestão com a mesma a enzima de restrição *Sall* utilizadas para o gene *phaJ1<sub>Pa</sub>*. Esta corta numa região cerca de aproximadamente 200 bp abaixo (*downstream*) da região carboxiterminal (3') do gene, cortando também alguns pares de bases acima do local escolhido para inserção do fragmento de DNA no vetor (ou seja o sítio de restrição *EcoRI*) (Anexo F). Agora, de maneira contrária ao observado para o gene *phaJ1<sub>Pa</sub>*, após a digestão com *Sall*, visualizou-se no gel de agarose: (i) caso o operon estivesse na orientação que permitisse a transcrição a partir do promotor *lac* presente no vetor, seriam visualizadas no gel uma banda representando a soma dos tamanhos do vetor e mais parte do inserto e uma outra muito menor (com cerca de 0,2 kb) (Figura 5.10 coluna 4); (ii) por outro lado, caso o fragmento se encontrasse na orientação contrária ao sentido que permitiria a transcrição pelo promotor *lac*, duas bandas seriam visualizadas no gel de agarose, uma das quais representando parte do gene *phaJ4<sub>Pa</sub>* pouco menor que o tamanho original deste (aproximadamente 0,5 kb), e outra representando o plasmídeo (com 4,5 kb) (Figura 5.10 colunas 6, 7 e 8).



**Figura 5.10-** Perfil de migração em gel de agarose 0,8% mostrando os plasmídios pBBR1MCS-2 portando o gene *phaJ4* de *P. aeruginosa* extraídos de recombinantes: 1- Marcador GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas); 2- pGEM::*phaJ4<sub>Pa</sub>* de *E. coli* XL1Blue digerido com *EcoRI*; 3-(A3) pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>* de *E. coli* XL1Blue digerido com *EcoRI*; 4-(A3) pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>* de *E. coli* XL1Blue digerido com *Sall*; 5-(B1) pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>* de *E. coli* XL1Blue digerido com *EcoRI*; 6-(B1) pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>* de *E. coli* XL1Blue digerido com *Sall*; 7-(B3) pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>* de *E. coli* XL1Blue digerido com *EcoRI*; 8-(B3) pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>* de *E. coli* XL1Blue digerido com *Sall*; 9-(B4) pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>* de *E. coli* XL1Blue digerido com *EcoRI*; 10-(B4) pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>* de *E. coli* XL1Blue digerido com *Sall*.

O pBBR1MCS-2 digerido apresenta tamanho próximo de 5,0 kb, o pGEM de 3,0 kb e o gene *phaJ4<sub>Pa</sub>* possui aproximadamente 0,6 kb.



De maneira a tentar compreender a relevância do promotor *lacZ* na expressão dos genes de *phaJ* inseridos no vetor pBBR1MCS-2, agora, conhecendo a orientação dos genes no vetor de cada recombinante, foram selecionados *E. coli* XL1 pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* T1(orientação do promotor *lacZ*) e T2 (orientação inversa ao *lacZ*) e de *E. coli* XL1 pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>* A3(orientação do promotor *lacZ*) e B3 (orientação inversa ao *lacZ*) para construir os recombinantes de *B. sacchari*.

### 5.3.2.2 Inserção de pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* ou pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>*, em *Burkholderia sacchari*

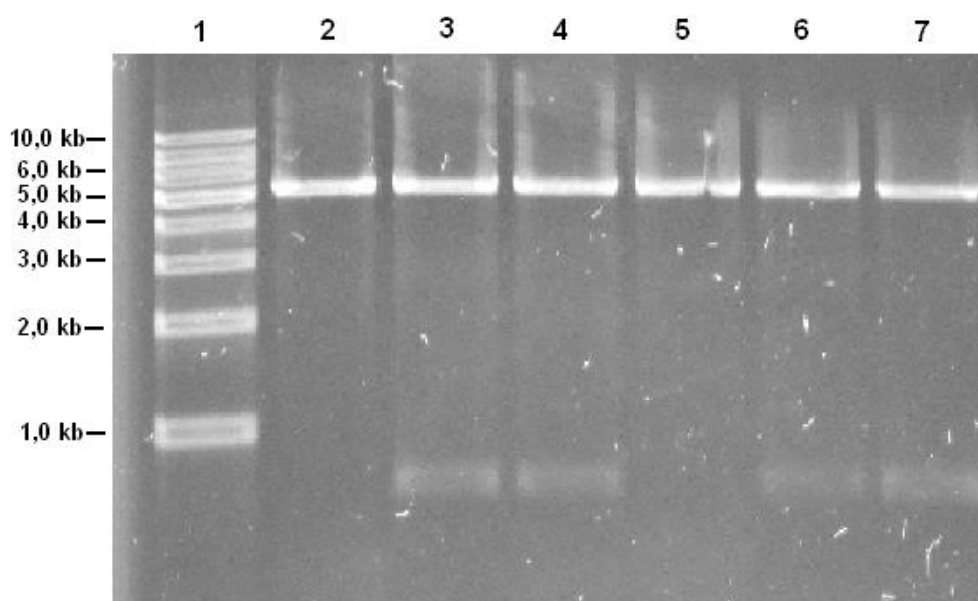
Foram realizados os mesmos procedimentos descritos no item 5.3.1, acima citado, para a inserção dos plasmídios *E. coli* XL1 pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* T1(orientação do promotor *lacZ*) e T2 (orientação inversa ao *lacZ*) e de *E. coli* XL1 pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>* A3 (orientação do promotor *lacZ*) e B3 (orientação inversa ao *lacZ*) em de *B. sacchari*.

Primeiro, realizou-se transformação para *E. coli* S17-1 e, em seguida, conjugação com *B. sacchari* LFM 101. Foram obtidos alguns clones de *B. sacchari* abrigando o plasmídio com inserto proveniente de cada recombinante de *E. coli* utilizado (T1, T2, A3 e B3), deste foram escolhidos quatro: *B. sacchari* pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* (orientação do promotor *lacZ*), agora denominado LFM 937, *B. sacchari* pBBR1MCS-2::*phaJ1<sub>Pa</sub>* (orientação inversa ao *lacZ*) denominado LFM938, *B. sacchari* pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>* (orientação do promotor *lacZ*) agora LFM 939 e *B. sacchari* pBBR1MCS-2::*phaJ4<sub>Pa</sub>* (orientação inversa ao *lacZ*) agora LFM 940. Para constatar a presença dos plasmídios nos recombinantes de *B. sacchari*, procedeu-se a extração dos respectivos clones recombinantes, os quais foram digeridos com enzima de restrição *EcoRI* e verificados por eletroforese em um gel de agarose 0,8% (Figura 5.11).

## 5.4 Avaliação da produção de PHA por linhagens recombinantes

A construção de recombinantes de *B. sacchari* para aumento da fração 3HHx no polímero estão baseados em dados bibliográficos. A literatura indica que o gene *phaB*

codificador da 3-cetoacil-CoA redutase NADPH dependente catalisa a conversão de um 3-cetoacil-CoA, gerado como intermediários da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, em um (*R*)-3-hidroxiacil-CoA (HAYWOOD *et al.*, 1988; DENNIS *et al.*, 1998), isto quer dizer que, quando na presença de ácido hexanóico, deve catalisar também a conversão de 3-cetohexanoil-CoA a (*R*)-3-hidroxihexanoil-CoA. Assim, optou-se por inserir na bactéria em estudo o gene *phaB*, avaliando-se a canalização deste intermediário da  $\beta$ -oxidação para a síntese de 3HHx. Neste trabalho, foram selecionados os clones TTM01 e TTM02 de *B. sacchari*, respectivamente LFM 841 e 842, contendo *phaB* para avaliar os efeitos desta inserção à linhagem.



**Figura 5.11-** Perfil de migração em gel de agarose 0,8% mostrando os plasmídios pBBR1MCS-2 portando o gene *phaJ4* de *P. aeruginosa* extraídos de recombinantes: 1- Marcador GelPilot<sup>R</sup> 1 kb Ladder (QUIAGEN); 2- pBBR1MCS-2; 3- LFM939 pBBR1MCS-2::*phaJ4*<sub>Pa</sub> de *B. sacchari* digerido com *EcoRI*; 4-LFM 940 pBBR1MCS-2::*phaJ4*<sub>Pa</sub> de *B. sacchari* digerido com *EcoRI*; 5- pBBR1MCS-2; 6-LFM 937 pBBR1MCS-2::*phaJ1*<sub>Pa</sub> de *B. sacchari* digerido com *EcoRI*; 7-LFM 938 pBBR1MCS-2::*phaJ1*<sub>Pa</sub> de *B. sacchari* digerido com *EcoRI*. O pBBR1MCS-2 digerido apresenta tamanho próximo de 5,0 kb e os genes *phaJ1*<sub>Pa</sub> e *phaJ4*<sub>Pa</sub> possuem tamanho aproximado de 0,6 kb.

Outra estratégia para modificar a fração 3HHx no copolímero foi baseada na expressão do gene *phaJ* de *P. aeruginosa*, que codifica para uma enoil-coA hidratase (*R*)-específica, que drena intermediários da  $\beta$ -oxidação para a síntese de PHA. Uma vez inserido em *B. sacchari*, espera-se a enzima por ele codificada realize a conversão do

*trans*-2-enoil-CoA (*trans*-2-hexenoil-CoA, quando for utilizado ácido hexanóico), produzido como intermediário da  $\beta$ -oxidação, ao (*R*)-3-hidroxiacil-CoA [(*R*)-3-hidroxihexanoil-CoA] para a síntese de 3HHx. O estudo com as enoil-CoA hidratases (*R*)-específicas codificadas pelos genes de *phaJ*<sub>Pa</sub> e *phaJ4*<sub>Pa</sub> de duas linhagens de *P. aeruginosa*, expressos separadamente em recombinantes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , constatou atividade desta enzima quando substratos de quatro, seis e oito carbonos foram fornecidos. E reportou ainda a similaridade dos genes *phaJ* de *P. aeruginosa* e *Aeromonas caviae* (*phaJ*) (TSUGE *et al.*, 1999). Fukui e Doi (1998) demonstraram que a PhaJ de *Aeromonas caviae* supre de (*R*)-3-hidroxiacil-CoAs de C<sub>4</sub> e C<sub>6</sub> à síntese de PHA via oxidação de ácidos graxos e óleos vegetais. Em recombinantes de *E. coli* JM109, DH5 $\alpha$  e XL1Blue abrigando juntamente os genes *phaC*<sub>Ac</sub> e *phaJ*<sub>Ac</sub> de *A. caviae*, conseguiram-se porcentagens do monômero 3HHx, no PHA produzido, de 16,33, 15,81 e 19,25% respectivamente (LU *et al.*, 2003). No presente trabalho, foram selecionados os recombinantes T1 e T2 (LFM 937 e LFM 938), contendo *phaJ1* e A3 e B3 (LFM 939 e 940), abrigando *phaJ4*. Estes recombinantes foram submetidos a experimentos de acúmulo.

As linhagens recombinantes de *B. sacchari* abrigando os genes *phaB*<sub>Re</sub> ou *phaJ1* ou *phaJ4* foram submetidas a ensaios de acúmulo em frascos agitados, na condição previamente selecionada de glicose (5 g/L) e ácido hexanóico (0,25 a 2,0 g/L) e também com glicose a 5 g/L combinada ao ácido octanóico nas concentrações entre 0,25 e 2,0 g/L. Ainda para a linhagem recombinante que possuía o gene *phaB*<sub>Re</sub>, utilizou-se um terceiro grupo de ensaios em que se empregou a glicose 5 g/L associada ao ácido butírico, nas mesmas concentrações dos anteriormente citados (0,25 a 2,0 g/L).

Os experimentos de acúmulo em que foram fornecidos glicose (5 g/L) e ácido hexanóico (0,25 a 2 g/L) aos recombinantes geraram resultados que estão apresentados nas Tabelas 5.5 e 5.6.

**Tabela 5.5-** Produção de PHA por recombinantes de *Burkholderia sacchari* abrigando o gene *phaB<sub>Re</sub>* (LFM841 e LFM842) a partir de glicose e ácido hexanóico.

Linhagem/ Condição de cultivo	Tempo (h)	MSC g/L	pH	PHA (mol%)		PHA (%MSC)	3HB (g/L)	3HHx (g/L)	PHA (g/L)	X(R) (g/L)
				3HB	3HHx					
LFM936 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,30 ±0,0	6,68 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	25,63 ±0,0	0,5894	0,0000	0,5894	1,71
LFM936 MMG5+H0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,58 ±0,0	6,61 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	27,7 ±0,0	0,7133	0,0000	0,7133	1,87
LFM936 MMG5+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	20,49 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,68 ±0,1	6,66 ±0,01	99,44 ±0,6	0,56 ±0,6	28,6 ±6,9	0,7639	0,0048	0,7687	1,91
LFM936 MMG5+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	19,05 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	3,02 ±0,02	6,87 ±0,02	98,28 ±0,6	0,72 ±0,6	33,9 ±16,1	1,0145	0,0077	1,0222	2,00
LFM936 MMG5+H1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	19,75 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	3,19 ±0,2	6,67 ±0,3	99,35 ±0,9	0,65 ±0,9	37,1 ±20,8	1,1579	0,0063	1,1642	2,03
LFM936 MMG5+H2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	3,36 ±0,0	6,93 ±0,0	99,66 ±0,0	0,34 ±0,0	46,2 ±0,0	1,5443	0,0070	1,5513	1,81
LFM841 MMG5	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,58 ±0,0	6,37 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	28,6 ±0,0	0,7387	0,0000	0,7387	1,84
LFM841 MMG5+H0,25	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,83 ±0,0	6,49 ±0,0	99,97 ±0,0	0,03 ±0,0	34,7 ±4,4	0,9804	0,0004	0,9808	1,85
LFM841 MMG5+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	21,52 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,93 ±1,2	6,62 ±0,01	99,24 ±1,0	0,76 ±1,0	31 ±8,1	0,9475	0,0053	0,9528	1,98
LFM841 MMG5+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	21,77 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	3,22 ±0,15	6,84 ±0,1	99,26 ±1,0	0,74 ±1,0	31,7 ±12,0	1,0216	0,0070	1,0286	2,19
LFM841 MMG5+H1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	15,21 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	3,14 ±0,5	6,51 ±0,1	99,95 ±0,01	0,05 ±0,01	36,44 ±19,2	1,1927	0,0008	1,1935	1,95
LFM841 MMG5+H2,0	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	72	3,60 ±0,0	7,19 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	46,35 ±0,0	1,6687	0,0000	1,6687	1,93
LFM842 MMG5	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	72	0,75 ±0,0	6,40 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	27,11 ±0,0	0,2033	0,0000	0,2033	0,55
LFM842 MMG5+H0,25	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,77 ±0,0	6,96 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	32,39 ±0,0	0,8972	0,0000	0,8972	1,87
LFM842 MMG5+H0,5	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,69 ±0,0	6,47 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	34,50 ±0,0	0,9280	0,0000	0,9280	1,76
LFM842 MMG5+H1,0	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	72	3,20 ±0,0	6,56 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	39,40 ±0,0	1,2608	0,0000	1,2608	1,94
LFM842 MMG5+H1,5	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	72	3,37 ±0,0	6,75 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	43,89 ±0,0	1,4790	0,0000	1,4790	1,89
LFM842 MMG5+H2,0	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	72	3,61 ±0,0	7,08 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	50,28 ±0,0	1,8149	0,0000	1,8149	1,80

MMGH: cultivo em meio mineral com glicose e/ou ácido hexanóico (o número após a sigla indica a concentração de glicose e/ou ácido hexanóico utilizada); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); ND: não determinado.

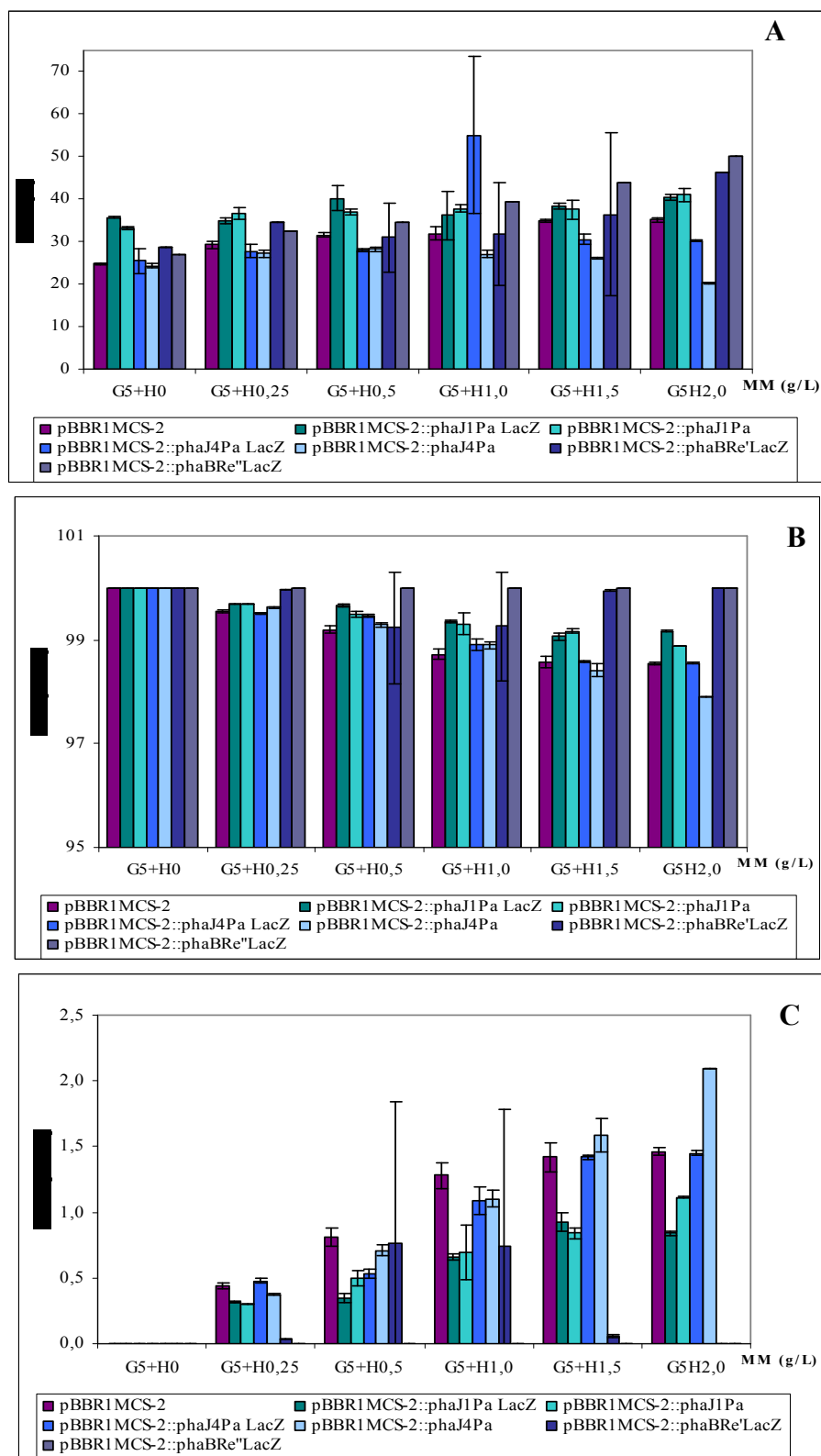
LFM936: linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2; LFM841: linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando pBBR1MCS-2::*phaB<sub>Re</sub>* na orientação do promotor *LacZ*; LFM842: linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando pBBR1MCS-2::*phaB<sub>Re</sub>* na orientação do promotor *LacZ*.

**Tabela 5.6-** Produção de PHA por recombinantes de *Burkholderia sacchari* abrigando os genes *phaJ<sub>Pa</sub>* ou *phaJ<sub>4Pa</sub>* a partir de glicose e ácido hexanóico.

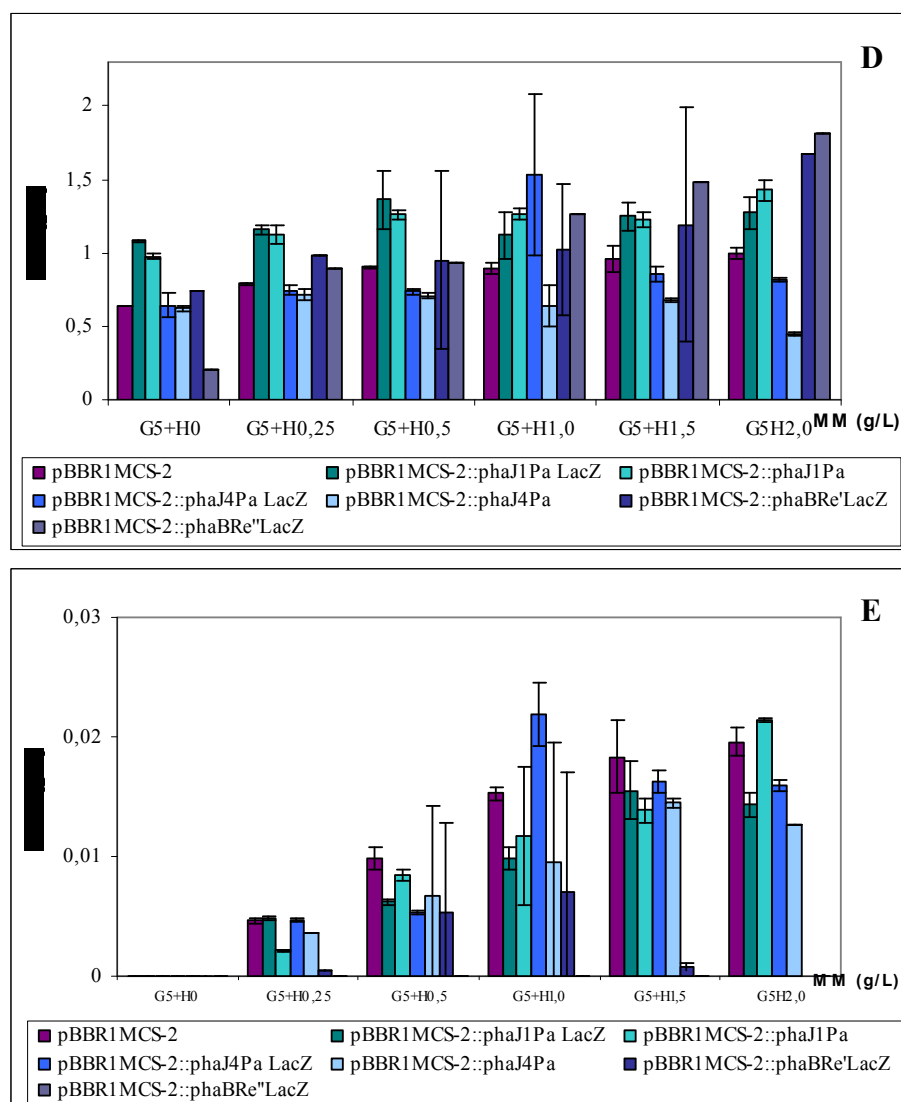
Linagem/ Condição de cultivo	Tempo (h)	MSC g/L	pH	PHA (mol%)		PHA (%MSC)	3HB (g/L)	3HHx (g/L)	PHA (g/L)	X <sub>(R)</sub> (g/L)
				3HB	3HHx					
LFM936 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	41,38 ±3,2	ND	ND	ND	ND
	72	2,59 ±0,2	6,48 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	24,27 ±0,2	0,64	0,000	0,64	1,95
LFM936 MMG5+H0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	29,06 ±1,6	ND	ND	ND	ND
	72	2,71 ±0,5	6,61 ±0,0	99,56 ±0,03	0,44 ±0,03	29,3 ±0,8	0,79	0,005	0,79	1,92
LFM936 MMG5+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	33,93 ±1,6	ND	ND	ND	ND
	72	2,89 ±0,01	6,72 ±0,0	99,19 ±0,07	0,81 ±0,07	31,6 ±0,5	0,90	0,010	0,91	1,98
LFM936 MMG5+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	31,43 ±2,1	ND	ND	ND	ND
	72	2,84 ±0,3	6,90 ±0,0	98,72 ±0,0	1,28 ±0,1	31,9 ±1,5	0,89	0,015	0,91	1,93
LFM936 MMG5+H1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	30,55 ±0,1	ND	ND	ND	ND
	72	2,80 ±0,2	7,10 ±0,0	98,58 ±0,1	1,42 ±0,1	34,8 ±0,4	0,96	0,018	0,97	1,83
LFM936 MMG5+H2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	30,23 ±0,5	ND	ND	ND	ND
	72	2,90 ±0,07	7,10 ±0,0	98,54 ±0,0	1,46 ±0,03	35,1 ±0,5	1,00	0,020	1,02	1,88
LFM937 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	40,48 ±0,8	ND	ND	ND	ND
	72	3,04 ±0,1	6,51 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	35,7 ±0,1	1,08	0,000	1,08	1,96
LFM937 MMG5+H0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	32,54 ±5,8	ND	ND	ND	ND
	72	3,35 ±0,2	6,61 ±0,0	99,68 ±0,01	0,32 ±0,01	34,8 ±0,7	1,16	0,005	1,16	2,19
LFM937 MMG5+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	41,57 ±2,0	ND	ND	ND	ND
	72	3,39 ±0,2	6,69 ±0,0	99,65 ±0,04	0,35 ±0,04	40,2 ±2,9	1,36	0,006	1,37	2,02
LFM937 MMG5+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	40,95 ±8,5	ND	ND	ND	ND
	72	3,13 ±0,5	6,9 ±0,0	99,34 ±0,03	0,66 ±0,03	35,7 ±6,4	1,12	0,010	1,13	2,00
LFM937 MMG5+H1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	33,51 ±1,6	ND	ND	ND	ND
	72	3,30 ±0,3	7,10 ±0,0	99,07 ±0,1	0,93 ±0,1	38,50 ±0,7	1,25	0,016	1,26	2,04
LFM937 MMG5+H2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	32,47 ±8,0	ND	ND	ND	ND
	72	3,19 ±0,2	7,33 ±0,0	99,16 ±0,01	0,84 ±0,01	40,40 ±0,8	1,27	0,014	1,29	1,90
LFM938 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	39,48 ±1,09	ND	ND	ND	ND
	72	2,93 ±0,2	6,47 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	33,28 ±0,4	0,97	0,000	0,97	1,96
LFM938 MMG5+H0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	3,24 ±2,7	ND	ND	ND	ND
	72	3,09 ±0,6	6,59 ±0,0	99,70 ±0,0	0,30 ±0,0	36,59 ±1,3	1,13	0,002	1,13	1,96
LFM938 MMG5+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	36,61 ±4,5	ND	ND	ND	ND
	72	3,44 ±0,2	6,70 ±0,0	99,50 ±0,1	0,50 ±0,1	36,89 ±0,7	1,26	0,008	1,27	2,17
LFM938 MMG5+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	33,80 ±1,1	ND	ND	ND	ND
	72	3,38 ±0,2	6,93 ±0,0	99,31 ±0,2	0,70 ±0,2	37,83 ±0,8	1,27	0,012	1,28	2,10
LFM938 MMG5+H1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	37,91 ±0,1	ND	ND	ND	ND
	72	3,32 ±0,08	7,12 ±0,0	99,16 ±0,04	0,84 ±0,04	37,55 ±2,3	1,23	0,014	1,24	2,08
LFM938 MMG5+H2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	35,98 ±1,3	ND	ND	ND	ND
	72	3,54 ±0,05	7,36 ±0,0	98,89 ±0,01	1,12 ±0,01	40,98 ±1,4	1,43	0,021	1,45	2,09
LFM939 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	30,76 ±1,7	ND	ND	ND	ND
	72	2,54 ±0,1	6,49 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	25,42 ±3,0	0,06	0,000	0,06	2,48
LFM939 MMG5+H0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	32,28 ±2,4	ND	ND	ND	ND
	72	2,71 ±0,05	6,61 ±0,0	99,52 ±0,01	0,48 ±0,01	27,78 ±1,6	0,75	0,005	0,75	1,96
LFM939 MMG5+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	35,38 ±4,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,65 ±0,06	6,72 ±0,0	99,47 ±0,04	0,54 ±0,04	28,00 ±0,2	0,74	0,005	0,74	1,91
LFM939 MMG5+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	38,64 ±8,26	ND	ND	ND	ND
	72	2,82 ±0,2	7,13 ±0,0	98,92 ±0,1	1,09 ±0,1	55,07 ±18,4	1,53	0,022	1,56	1,26
LFM939 MMG5+H1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	29,89 ±0,2	ND	ND	ND	ND
	72	2,89 ±0,05	7,22 ±0,0	98,58 ±0,01	1,42 ±0,01	30,51 ±1,1	0,85	0,016	0,87	2,02
LFM939 MMG5+H2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	26,51 ±0,2	ND	ND	ND	ND
	72	2,77 ±0,05	7,17 ±0,0	98,55 ±0,5	1,45 ±0,01	30,24 ±0,03	0,82	0,016	0,84	1,93
LFM940 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	32,25 ±1,3	ND	ND	ND	ND
	72	2,56 ±0,1	6,47 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	24,20 ±0,8	0,62	0,000	0,62	1,94
LFM940 MMG5+H0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	35,45 ±3,3	ND	ND	ND	ND
	72	2,65 ±0,05	6,62 ±0,0	99,62 ±0,01	0,38 ±0,01	27,18 ±0,9	0,71	0,007	0,72	1,93
LFM940 MMG5+H0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	37,96 ±1,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,53 ±0,03	6,71 ±0,0	99,29 ±0,04	0,71 ±0,04	28,18 ±0,6	0,71	0,007	0,71	1,82
LFM940 MMG5+H1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	34,46 ±1,8	ND	ND	ND	ND
	72	2,40 ±0,4	6,98 ±0,0	98,89 ±0,06	1,11 ±0,6	27,05 ±0,9	0,64	0,010	0,65	1,75
LFM940 MMG5+H1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	31,71 ±0,2	ND	ND	ND	ND
	72	2,64 ±0,03	7,13 ±0,0	98,41 ±0,1	1,59 ±0,1	26,15 ±0,2	0,68	0,014	0,69	1,95
LFM940 MMG5+H2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	28,93 ±1,8	ND	ND	ND	ND
	72	2,26 ±0,1	7,17 ±0,0	97,91 ±0,0	2,09 ±0,0	20,32 ±0,2	0,45	0,126	0,57	1,69

MMGH: cultivo em meio mineral com glicose e/ou ácido hexanóico (o número após a sigla indica a concentração de glicose e/ou ácido hexanóico utilizada); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); ND: não determinado. LFM936: linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2; LFM937: linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando pBBR1MCS-2:: *phaJ<sub>Pa</sub>* na orientação do promotor *LacZ*; LFM938: linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando pBBR1MCS-2:: *phaJ<sub>Pa</sub>* na orientação contrária a do promotor *LacZ*; LFM939: linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando pBBR1MCS-2:: *phaJ<sub>4Pa</sub>* na orientação do promotor *LacZ*; LFM940: linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando pBBR1MCS-2:: *phaJ<sub>4Pa</sub>* na orientação contrária a do promotor *LacZ*.

Os dados destas tabelas foram compilados, gerando a Figura 5.12.



**Figura 5.12-** Gráficos do perfil de acúmulo de PHA total e monômeros 3HB e 3HHx por *Burkholderia sacchari* linhagem abrigando plasmídio vazio e recombinantes a partir de glicose e ácido hexanóico (o número após a sigla indica a concentração de glicose e/ou ácido hexanóico utilizada) (continua).



**Figura 5.12-** Gráficos do perfil de acúmulo de PHA total e monômeros 3HB e 3HHx por *Burkholderia sacchari* linhagem abrigando plasmídio vazio e recombinantes a partir de glicose e ácido hexanóico (conclusão).

Em quatro das condições testadas, observa-se que a expressão do gene *phaJ1* aparentemente, seja na orientação cuja transcrição é regulada pelo promotor do *lacZ*, seja na orientação invertida, leva a um aumento do teor de PHA acumulado pela célula (Fig. 5.12 A). Nas outras duas condições avaliadas de ácido hexanóico (1 e 1,5 g/L) pelo menos uma das linhagens recombinantes apresentou valores significativamente maiores que aqueles observados para o controle (*B. sacchari* abrigado o plasmídio pBBR1MCS-2 sem inserto). Assim, o gene *phaJ1* deve promover maior direcionamento de 3-hidroxicanoatos (3HA) para a PHA sintase.

As Fig 5.12 B e D demonstram que não há um aumento na fração molar de 3HHx produzido, nem no fluxo deste monômero para a síntese de PHA. Por outro lado, a Fig. 5.12 C mostra que há um aumento no fluxo de 3HB, mesmo em ausência de ácido hexanóico, o que indica que a expressão de *phaJ1* aumentou a síntese de PHA a partir de carboidrato, ou seja, mesmo quando a via de beta oxidação não estaria suprindo intermediários para a síntese de 3HB. A maneira pela qual isto ocorre ainda precisa ser melhor investigada. Entretanto, uma explicação possível seria a formação de *S*-3-hidroxi-butiril-CoA por outras tiolases e a conversão desta molécula pra *R*-3-hidroxi-butiril-CoA ocorreria pela ação de enoil-CoA hidratases, via crotonil-CoA, como foi anteriormente proposto para a síntese de P3HB em *Rhodospirillum rubrum* (MOSKOWITZ e MERRICK, 1969; STEINBÜCHEL, 1991).

Em alguns experimentos, observou-se um aumento no teor de PHA acumulado com a expressão dos genes *phaJ4* (Fig. 5.12 A). Entretanto, essas observações foram esporádicas e não sistemáticas em todos os experimentos, como foi o caso de *phaJ1*. Em apenas um destes experimentos (glicose 5 g/L e hexanoato 1 g/L), em que *phaJ4* está na orientação sob controle do promotor de *lacZ*, é que houve aumento significativo no fluxo de 3HHx. Nesta mesma condição também se observou um aumento no fluxo de 3HB, o que explica a ausência de aumento na fração molar de 3HHx em relação à linhagem controle. Uma vez que as alterações no teor de polímero, na composição monomérica e os fluxos de monômeros foram observados apenas em um experimento, o papel do gene *phaJ4* na síntese de PHA em *B. sacchari* recombinante necessitaria uma investigação mais ampla.

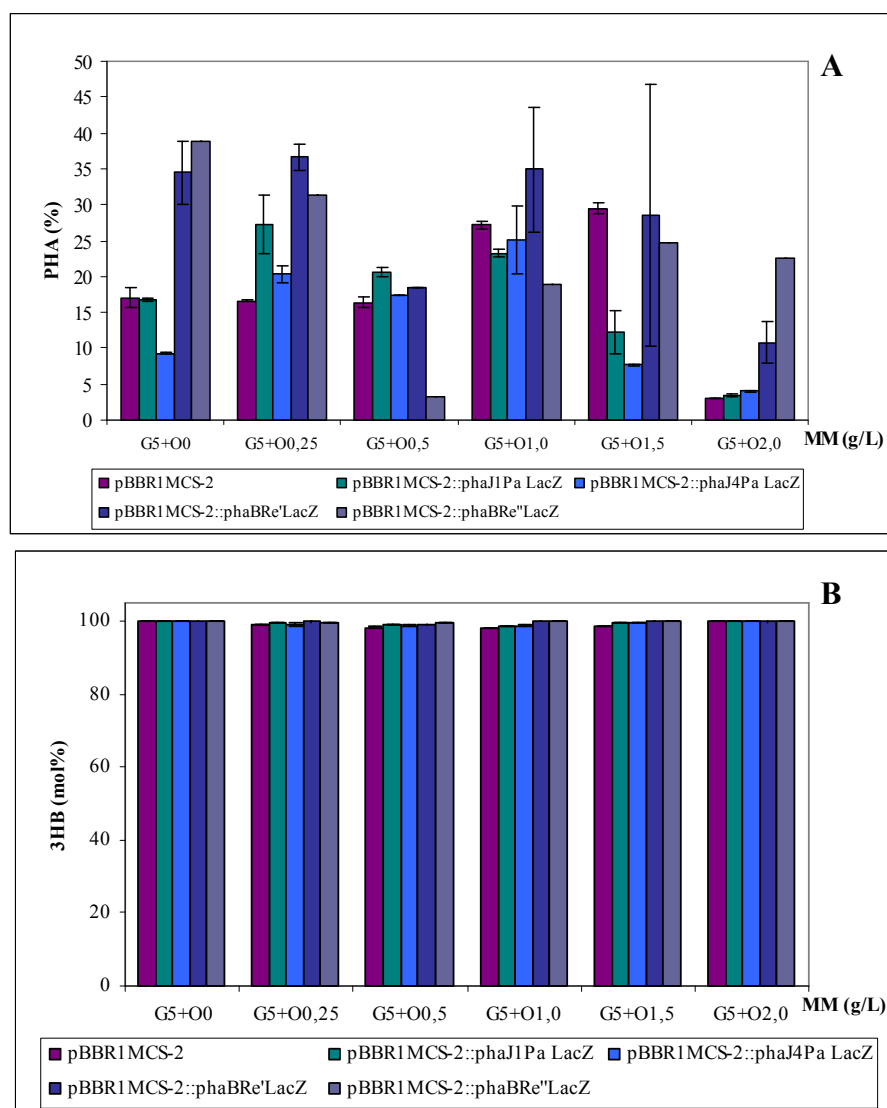
Com a expressão do gene *phaB* em *B. sacchari* também foi observado um aumento no teor de PHA acumulado em alguns dos experimentos. Em nenhum desses experimentos, este aumento resultou de um fluxo maior de 3HHx para a PHA sintase, mas sim de 3HB. Gomes e colaboradores (2007) observaram que a expressão do gene *phaB* em linhagens recombinantes de *Pseudomonas putida* aumentava a fração molar de 3HB e 3HHx no PHA<sub>MCL</sub> sintetizado. Entretanto, o aumento da fração 3HB foi muito maior que o de 3HHx. Esses resultados são compatíveis com aqueles observados por Haywood e colaboradores (1988) que detectaram uma atividade de 3-cetoacil-CoA redutase em *R. eutropha* que correspondia 3,6% para 3-cetohexanoil-CoA em relação à atividade dessa mesma enzima para 3-cetobutiril-CoA. Assim, também neste trabalho observou-se que o efeito do produto do gene *phaB* foi evidenciado na síntese de 3HB e não na de 3HHx, o que está de acordo com a afinidade desta enzima por cadeias carbônicas de diferentes tamanhos.



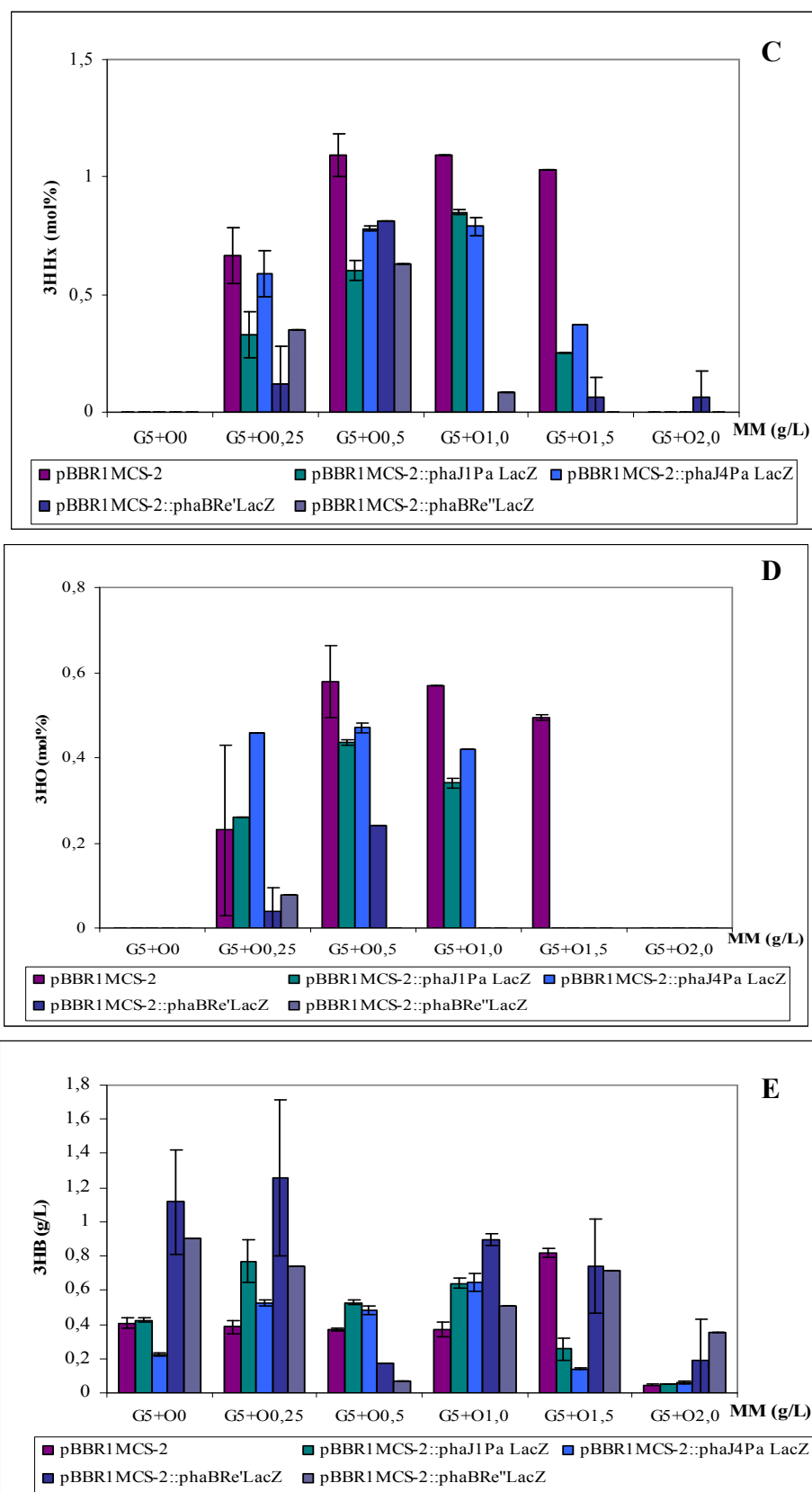
As Tabelas 5.7 e 5.8 mostram os resultados obtidos quando os mesmos recombinantes foram avaliados frente a glicose e ácido octanóico. Quando este ácido foi suprido como co-substrato para as linhagens recombinantes foi observada a incorporação ao polímero de uma pequena fração de 3- hidroxioctanoato (3HO < 1 mol%), mesmo na linhagem abrigando apenas o plasmídiopBBR1 MCS-2. Uma vez que esse plasmídeo não abriga qualquer gene que devesse promover um aumento no direcionamento de intermediários da  $\beta$ -oxidação para a síntese de PHA, o resultado obtido com a linhagem recombinante, que não havia sido verificado com a linhagem selvagem (Tabela 5.2), talvez seja decorrente da condição de cultivo, que se deu em presença do antibiótico da marca de seleção do plasmídeo. O aumento da fração 3HO, em relação ao controle (a linhagem abrigando apenas o plasmídeo) foi observado em apenas uma situação: *phaJ4* suprido com 0,25 g/L de octanoato (Figura 5.13 D). Observou-se também um aumento do fluxo de 3HO quando os genes *phaJ1* e *phaJ4* foram expressos na presença de 1 g/L de octanoato e quando comparados com a linhagem selvagem (Figura 5.13 G). Entretanto, como as quantidades de 3HO detectadas foram muito pequenas, é difícil afirmar que essas diferenças sejam realmente significativas. Os resultados em conjunto, entretanto, sugerem que a PHA sintase de *B. sacchari* é capaz de incorporar também monômeros de 3HO. Ao estudarem *phaJ1* e *phaJ4*, Tsuge e colaboradores (2003) evidenciaram a atividade enzimática específica dos produtos destes genes por octenoil-CoA, além de outros intermediários (crotonil-CoA e hexenoil-CoA), isto indica que a participação destes no metabolismo de *B. sacchari* possa ter aumentado a incorporação de unidades 3HO ao polímero.

Não foi observado qualquer aumento na fração molar de 3HHx ou no fluxo deste monômero quando os genes *phaJ1*, *phaJ4* e *phaB* (Figura 5.13 C e F) foram expressos. Entretanto, em algumas situações de cultivo observou-se um aumento no fluxo de 3HB. A expressão do gene *phaJ1* levou a um aumento no fluxo de 3HB quando ácido octanóico correspondia entre 0,25 e 1,0 g/L, mas não nas demais situações. Ou seja, neste experimento não se confirmou que o produto deste gene contribuiria com o aumento de fluxo de 3HB quando apenas carboidrato foi suprido, como havia sido observado nos experimentos utilizando ácido hexanóico como co-substrato. A expressão do gene *phaJ4* também levou a um aumento do fluxo de 3HB quando ácido octanóico entre 0,25 e 1,0 g/L foi suprido. Deve-se destacar que esse aumento de fluxo não foi observado nos experimentos utilizando ácido hexanóico como precursor (Figura 5.12 D). Considerando que os experimentos com ácido hexanóico e octanóico têm o mesmo objetivo, ou seja,

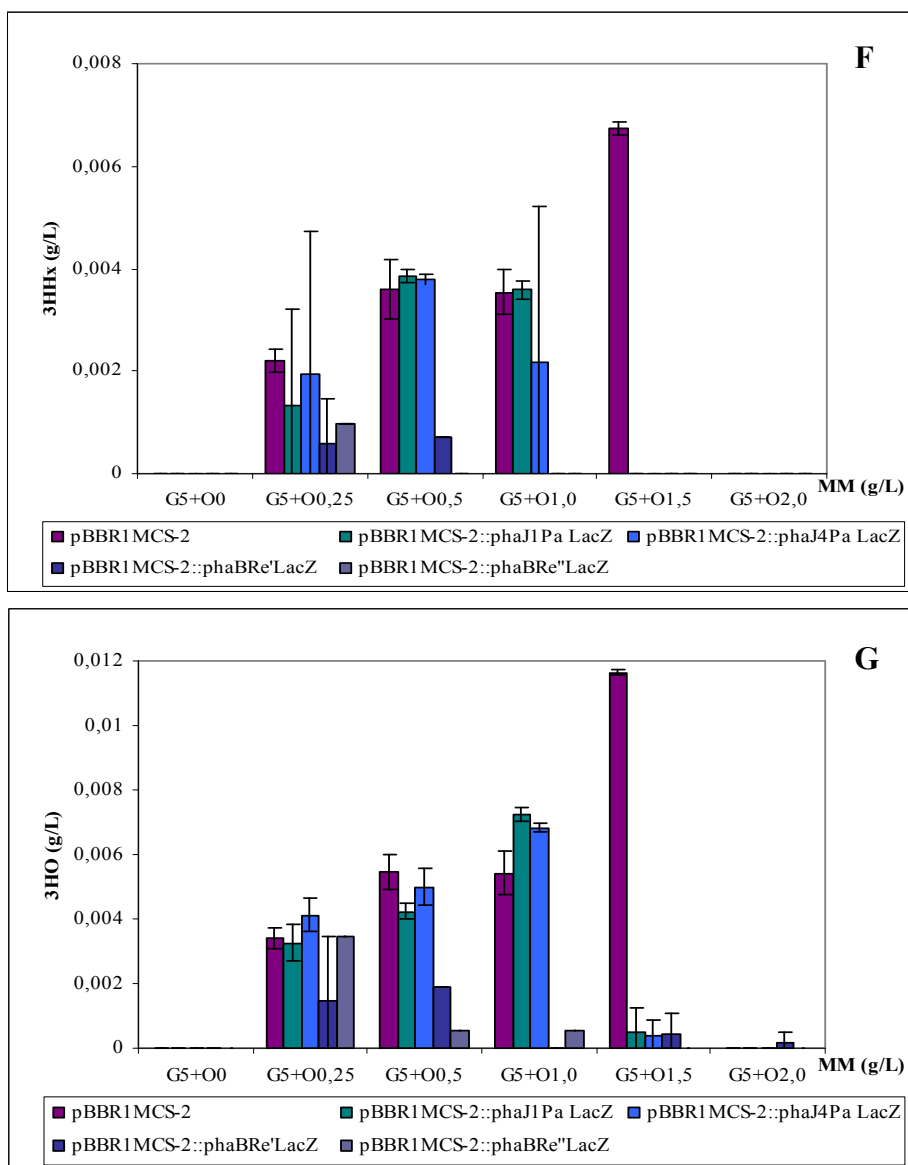
avaliar a especificidade dos produtos de diferentes genes em promover o direcionamento de intermediários da  $\beta$ -oxidação para a síntese de PHA, não se pode afirmar que as diferenças observadas em um dos experimentos, mas não em outros sejam realmente significativas.



**Figura 5.13-** Gráficos do perfil de acúmulo de PHA total e monômeros 3HB e 3HHx por *Burkholderia sacchari* linhagem abrangendo plasmídeo vazio e recombinantes a partir de glicose e ácido octanóico (continua).



**Figura 5.13-** Gráficos do perfil de acúmulo de PHA total e monômeros 3HB e 3HHx por *Burkholderia sacchari* linhagem abrangendo plasmídio vazio e recombinantes a partir de glicose e ácido octanóico (continuação).



**Figura 5.13-** Gráficos do perfil de acúmulo de PHA total e monômeros 3HB e 3HHx por *Burkholderia sacchari* linhagem abrigando plasmídeo vazio e recombianes a partir de glicose e ácido octanóico (concluão).

Com a expressão do gene *phaB*, em presença de octanoato, também foi observado um aumento no teor de PHA acumulado em alguns dos experimentos, sempre decorrentes de um aumento no fluxo de 3HB. Novamente, os resultados não são observados em todas as condições analisadas e também não são as mesmas em hexanoato e octanoato, o que torna questionável a significância dos resultados nesta escala de experimentos.

**Tabela 5.7-** Produção de PHA por recombinantes de *Burkholderia sacchari* abrigando o gene *phaB<sub>Re</sub>* e a partir de glicose e ácido octanóico.

Linhagem/ Condição de cultivo	Tempo (h)	MSC g/L	pH	PHA (mol%)			PHA (%MSC)	3HB (g/L)	3HHx (g/L)	3HO (g/L)	PHA (g/L)	X(R) (g/L)
				3HB	3HHx	3HO						
LFM936 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	40,02 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	3,03 ±1,0	6,46 ±0,1	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	31,86 ±0,4	0,9636	0,0000	0,0000	0,9636	2,07
LFM936 MMG5+O0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	38,16 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	3,17 ±0,9	6,56 ±0,1	99,91 ±0,1	0,03 ±0,05	0,06 ±0,8	33,37 ±2,9	1,0699	0,0004	0,0007	1,0710	2,10
LFM936 MMG5+O0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	24,64 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,79 ±0,1	6,63 ±0,1	99,66 ±0,5	0,13 ±0,2	0,21 ±0,3	24,26 ±23,6	0,6925	0,0003	0,0007	0,6935	2,10
LFM936 MMG5+O1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	25,61 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,87 ±0,3	6,70 ±0,2	99,56 ±0,4	0,23 ±0,3	0,21 ±0,2	30,19 ±11,8	0,8400	0,0023	0,0025	0,8448	2,03
LFM936 MMG5+O1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	32,31 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,96 ±0,8	6,35 ±0,9	99,80 ±0,05	0,16 ±0,1	0,03 ±0,05	31,80 ±25,3	0,8391	0,0015	0,0006	0,8412	2,12
LFM936 MMG5+O2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	40,43 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	3,07 ±0,6	6,17 ±1,2	99,83 ±0,1	0,13 ±0,01	0,04 ±0,1	37,80 ±14,3	1,1137	0,0019	0,0009	1,1165	1,95
LFM841 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	38,36 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	3,33 ±1,3	6,51 ±0,1	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	34,52 ±4,4	1,1191	0,0000	0,0000	1,1191	2,21
LFM841 MMG5+O0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	36,80 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	3,41 ±1,1	6,55 ±0,1	99,85 ±0,2	0,12 ±0,2	0,04 ±0,05	36,60 ±1,9	1,2564	0,0014	0,0006	1,2584	2,15
LFM841 MMG5+O0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	33,08 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	0,96 ±0,0	6,73 ±0,2	98,47 ±0,0	0,82 ±0,0	0,24 ±0,0	18,37 ±0,0	0,1738	0,0019	0,0007	0,1764	0,78
LFM841 MMG5+O1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	35,17 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,66 ±0,8	5,85 ±1,4	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	34,89 ±8,7	0,8935	0,0000	0,0000	0,8935	1,77
LFM841 MMG5+O1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	33,08 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,86 ±0,9	5,98 ±1,4	99,94 ±0,1	0,06 ±0,1	0,00 ±0,0	28,63 ±18,2	0,7389	0,0004	0,0000	0,7393	2,12
LFM841 MMG5+O2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	34,73 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	1,81 ±0,3	6,14 ±1,4	99,94 ±0,1	0,06 ±0,1	0,00 ±0,0	10,78 ±2,9	0,1901	0,0002	0,0000	0,1903	1,62
LFM842 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	39,54 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,32 ±0,0	6,56 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	38,92 ±0,0	0,9030	0,0000	0,0000	0,9030	1,42
LFM842 MMG5+O0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	34,03 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,38 ±0,0	6,66 ±0,0	99,57 ±0,0	0,35 ±0,0	0,08 ±0,0	31,25 ±0,0	0,7393	0,0035	0,0010	0,7438	1,64
LFM842 MMG5+O0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	17,69 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,04 ±0,0	6,85 ±0,0	99,37 ±0,0	0,63 ±0,0	0,00 ±0,0	3,26 ±0,0	0,0660	0,0006	0,0000	0,0666	1,97
LFM842 MMG5+O1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	40,22 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,69 ±0,0	7,15 ±0,0	99,92 ±0,0	0,08 ±0,0	0,00 ±0,0	18,83 ±0,0	0,5060	0,0006	0,0000	0,5066	2,18
LFM842 MMG5+O1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	37,87 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,90 ±0,0	7,44 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	24,75 ±0,0	0,7179	0,0000	0,0000	0,7179	2,18
LFM842 MMG5+O2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	35,39 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	1,56 ±0,0	8,09 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	22,60 ±0,0	0,3526	0,0000	0,0000	0,3526	1,21

MMGO: cultivo em meio mineral com glicose e/ou ácido octanóico(o número após a sigla indica a concentração de glicose e/ou ácido octanóico utilizada); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxi butirato (4 C); HHx: 3-hidroxi hexanoato (6 C); ND: não determinado. LFM936: linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2; LFM841: linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando pBBR1MCS-2:*phaB<sub>Re</sub>* na orientação do promotor *LacZ*; LFM842: linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando pBBR1MCS-2:*phaB<sub>Re</sub>* na orientação do promotor *LacZ*.

Com estes dados, a expressão do gene *phaB* não levou a um aumento do teor de PHA acumulado, quando ácido butírico foi fornecido (Tabela 5.9 e Figura 5.14 A), ao contrário, mesmo frente a 0,25 g/L de ácido butírico foi observada uma forte inibição do acúmulo. Nestes experimentos foi observada a síntese de copolímeros contendo 3HB e 3HHx, embora em pequenas quantidades, mesmo quando apenas o plasmídeo foi expresso, o contrário do observado com a linhagem selvagem, o que sugere que *B. sacchari* é capaz de promover a condensação de acetil-CoA e butiril-CoA formando 3-cetohexanoil-CoA que é posteriormente reduzido a 3HHx (Anexo C). Fukui e colaboradores (2002) reportaram a capacidade de *R. eutropha* recombinante incorporar 3-hidroxi hexanoil-CoA gerados pela ação da enzima BktB ao condensar acetil-CoA com butiril-CoA, fornecido

pela ação da crotonil-CoA redutase de *Streptomyces cinnamomensis* sobre o substrato crotonil-CoA. Isto sugere que *B. sacchari* selvagem possivelmente condense acetil-CoA e butiril-CoA, gerado a a partir de ácido butírico, utilizando o produto gene *bktB*, em um mecanismo similar ao de *R. eutropha*.

**Tabela 5.8-** Produção de PHA por recombinantes de *Burkholderia sacchari* abrigando os genes *phaJ1<sub>Pa</sub>* ou *phaJ4<sub>Pa</sub>* a partir de glicose e ácido octanóico.

Linhagem/ Condição de cultivo	Tempo (h)	MSC g/L	pH	PHA (mol%)			PHA (%MSC)	3HB (g/L)	3HHx (g/L)	3HO (g/L)	PHA (g/L)	X <sub>(R)</sub> (g/L)
				3HB	3HHx	3HO						
LFM936 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	19,99 ±4,0	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,40 ±0,02	6,47 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	17,04 ±1,4	0,4080	0,000	0,000	0,4080	1,99
LFM936 MMG5+O0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	12,09 ±0,3	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,36 ±0,3	6,55 ±0,0	99,11 ±0,1	0,67 ±0,1	0,23 ±0,2	16,6 ±0,4	0,3839	0,003	0,002	0,3893	1,97
LFM936 MMG5+O0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	7,16 ±0,1	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,32 ±0,1	6,64 ±0,0	98,33 ±0,2	1,10 ±0,1	0,58 ±0,1	16,4 ±0,1	0,3704	0,005	0,004	0,3793	1,94
LFM936 MMG5+O1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	12,57 ±1,1	ND	ND	ND	ND	ND
	72	1,39 ±0,1	6,82 ±0,0	98,34 ±0,0	1,09 ±0,0	0,57 ±0,0	27,2 ±0,6	0,3696	0,005	0,004	0,3785	1,01
LFM936 MMG5+O1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	13,49 ±2,1	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,83 ±0,01	6,89 ±0,0	98,48 ±0,01	1,03 ±0,0	0,50 ±0,01	29,5 ±0,8	0,8149	0,012	0,007	0,8333	2,00
LFM936 MMG5+O2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	14,06 ±1,4	ND	ND	ND	ND	ND
	72	1,56 ±0,1	5,66 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	3,01 ±0,1	0,0468	0,000	0,000	0,0468	1,51
LFM937 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	21,30 ±2,8	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,55 ±0,04	6,46 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	16,70 ±0,3	0,4257	0,000	0,000	0,4257	2,12
LFM937 MMG5+O0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	15,98 ±0,3	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,84 ±0,03	6,52 ±0,0	99,42 ±0,3	0,33 ±0,1	0,26 ±0,0	27,28 ±4,0	0,7706	0,003	0,001	0,7751	2,06
LFM937 MMG5+O0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	10,63 ±0,1	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,61 ±0,02	6,64 ±0,0	98,97 ±0,04	0,60 ±0,04	0,44 ±0,01	20,6 ±0,7	0,5288	0,004	0,004	0,5368	2,07
LFM937 MMG5+O1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	12,47 ±0,1	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,80 ±0,1	6,77 ±0,0	98,82 ±0,0	0,85 ±0,01	0,34 ±0,01	23,2 ±0,5	0,6397	0,007	0,004	0,6505	2,15
LFM937 MMG5+O1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	8,97 ±0,2	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,08 ±0,01	6,59 ±0,0	99,75 ±0,0	0,25 ±0,0	0,00 ±0,0	12,33 ±3,0	0,2553	0,001	0,000	0,2558	1,82
LFM937 MMG5+O2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	13,62 ±3,1	ND	ND	ND	ND	ND
	72	1,50 ±0,1	5,76 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	3,49 ±0,2	0,0522	0,000	0,000	0,0522	1,45
LFM939 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	14,64 ±0,5	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,39 ±0,1	6,48 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	9,32 ±0,2	0,2222	0,000	0,000	0,2222	2,17
LFM939 MMG5+O0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	16,00 ±3,3	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,61 ±0,1	6,56 ±0,0	98,95 ±0,4	0,59 ±0,1	0,46 ±0,0	20,36 ±1,2	0,5237	0,004	0,002	0,5297	2,08
LFM939 MMG5+O0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	11,73 ±2,4	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,81 ±0,1	6,66 ±0,0	98,75 ±0,1	0,78 ±0,1	0,47 ±0,01	17,40 ±0,1	0,4791	0,005	0,004	0,4877	2,32
LFM939 MMG5+O1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	20,19 ±1,6	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,64 ±0,3	6,81 ±0,0	98,79 ±0,3	0,79 ±0,04	0,42 ±0,0	25,08 ±4,8	0,6456	0,007	0,002	0,6545	1,99
LFM939 MMG5+O1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	12,81 ±0,6	ND	ND	ND	ND	ND
	72	1,87 ±0,5	6,47 ±0,0	99,63 ±0,0	0,37 ±0,0	0,00 ±0,0	7,63 ±0,2	0,1418	0,000	0,000	0,1422	1,73
LFM939 MMG5+O2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	19,98 ±0,6	ND	ND	ND	ND	ND
	72	1,43 ±0,1	5,68 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	4,07 ±0,1	0,0580	0,000	0,000	0,0580	1,37

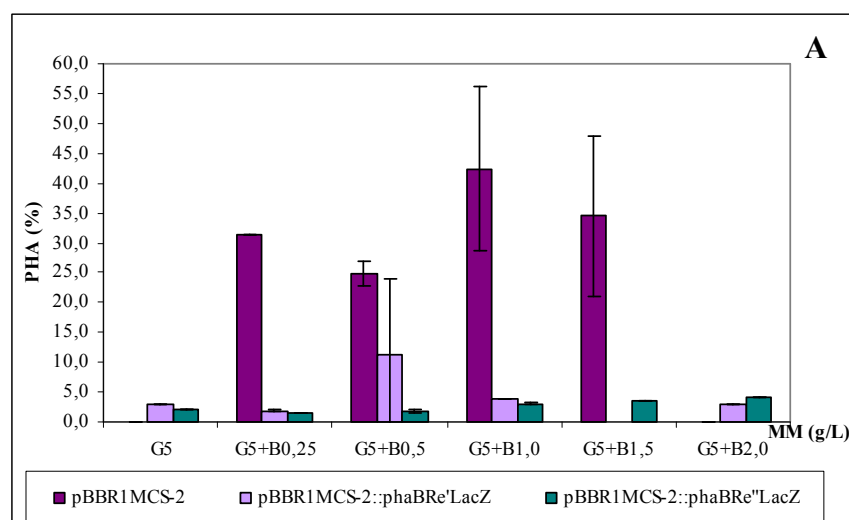
MMGO: cultivo em meio mineral com glicose e/ou ácido octanóico(o número após a sigla indica a concentração de glicose e/ou ácido octanóico utilizada); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxi butirato (4 C); HHx: 3-hidroxi hexanoato (6 C); ND: não determinado. LFM936: linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2; LFM837: linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando pBBR1MCS-2:: *phaJ1<sub>Pa</sub>* na orientação do promotor *LacZ*; LFM839: linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando pBBR1MCS-2:: *phaJ4<sub>Pa</sub>* na orientação do promotor *LacZ*.

A expressão do gene *phaB* não promoveu aumento de fluxo de 3HB (Figura 5.14 D) ou de 3HHx (Figura 5.14 E).

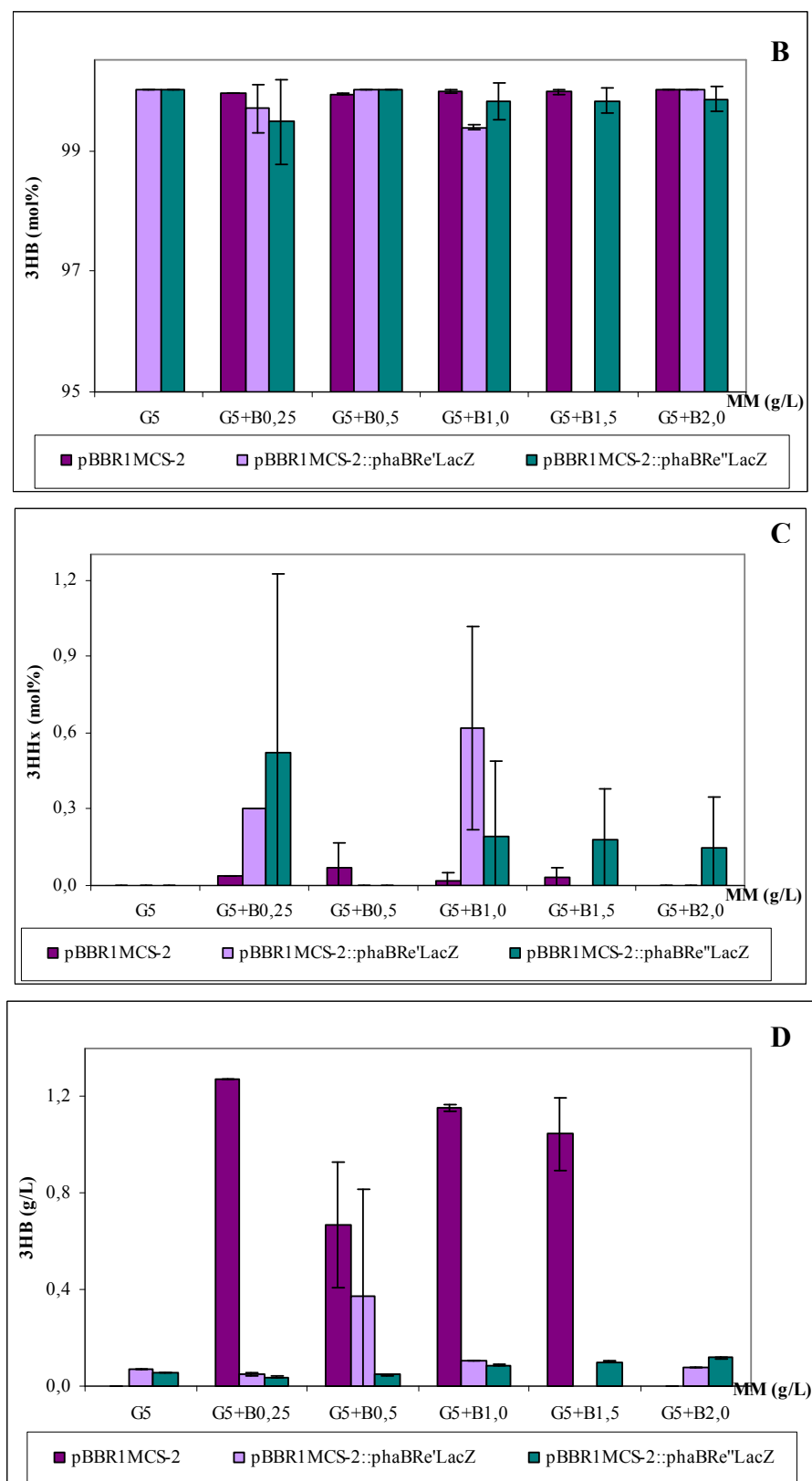
**Tabela 5.9-** Produção de PHA por recombinantes de *Burkholderia sacchari* abrigando o gene *phaB<sub>Re</sub>* (LFM841 e LFM842).a partir de glicose e ácido butírico.

Linhagem/ Condição de cultivo	Tempo (h)	MSC g/L	pH	PHA (mol%)		PHA (%MSC)	3HB (g/L)	3HHx (g/L)	PHA (g/L)	X(R) (g/L)
				3HB	3HHx					
LFM936 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND
LFM936 MMG5+B0,25	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	72	4,05 ±0,0	6,46 ±0,0	99,96 ±0,0	0,04 ±0,0	31,38 ±0,0	1,2704	0,0007	1,2711	2,78
LFM936 MMG5+B0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	20,39 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,66 ±0,8	5,99 ±1,1	99,93 ±0,1	0,07 ±0,1	24,88 ±2,1	0,6686	0,0005	0,6691	1,99
LFM936 MMG5+B1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	18,29 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,88 ±0,1	5,88 ±1,6	99,98 ±0,03	0,02 ±0,03	42,33 ±13,8	1,1549	0,0003	1,1552	1,72
LFM936 MMG5+B1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	21,25 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	3,14 ±0,8	6,18 ±1,6	99,97 ±0,04	0,03 ±0,04	34,50 ±13,5	1,0450	0,0003	1,0453	2,09
LFM936 MMG5+B2,0	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	72	2,56 ±0,0	5,19 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,02 ±0,0	0,0005	0,0000	0,0005	2,56
LFM841 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	1,87 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,56 ±0,0	5,49 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	2,82 ±0,0	0,0722	0,0000	0,0722	2,49
LFM841 MMG5+B0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	2,79 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,53 ±0,04	5,80 ±0,0	99,70 ±0,4	0,30 ±0,0	1,90 ±0,2	0,0480	0,0002	0,0482	2,48
LFM841 MMG5+B0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	13,18 ±13,3	ND	ND	ND	ND
	72	3,01 ±0,6	6,53 ±0,7	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	11,18 ±12,72	0,3703	0,0000	0,3703	2,64
LFM841 MMG5+B1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	10,60 ±9,7	ND	ND	ND	ND
	72	3,05 ±0,4	6,57 ±0,3	99,38 ±0,4	0,62 ±0,4	3,87 ±0,0	0,1055	0,0009	0,1064	2,94
LFM841 MMG5+B1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	11,58 ±11,2	ND	ND	ND	ND
	72	3,22 ±0,7	6,98 ±0,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LFM841 MMG5+B2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	3,05 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,62 ±0,0	6,85 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	3,00 ±0,03	0,0785	0,0000	0,0785	2,54
LFM842 MMG5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,73 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,65 ±0,0	4,60 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	2,17 ±0,0	0,0575	0,0000	0,0575	2,59
LFM842 MMG5+B0,25	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	2,75 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,61 ±0,0	5,19 ±0,0	99,48 ±0,7	0,52 ±0,7	1,48 ±0,1	0,0382	0,0003	0,0385	2,57
LFM842 MMG5+B0,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	2,86 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,67 ±0,0	5,76 ±0,0	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	1,81 ±0,2	0,0484	0,0000	0,0484	2,62
LFM842 MMG5+B1,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	2,54 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,80 ±0,0	6,15 ±0,0	99,81 ±0,3	0,19 ±0,3	3,08 ±0,2	0,0859	0,0002	0,0861	2,71
LFM842 MMG5+B1,5	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	1,80 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,83 ±0,0	6,40 ±0,0	99,82 ±0,2	0,18 ±0,2	3,58 ±0,1	0,1010	0,0002	0,1012	2,73
LFM842 MMG5+B2,0	24	ND	ND	100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	31,96 ±0,0	ND	ND	ND	ND
	72	2,89 ±0,0	6,65 ±0,0	99,85 ±0,2	0,15 ±0,2	4,03 ±0,01	0,1161	0,0002	0,1163	2,77

MMGB: cultivo em meio mineral com glicose e/ou ácido butírico (o número após a sigla indica a concentração de glicose e/ou ácido butírico utilizada); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); ND: não determinado. LFM936: linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2; LFM841: linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando pBBR1MCS-2::*phaB<sub>Re</sub>* na orientação do promotor *LacZ*; LFM842: linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando pBBR1MCS-2::*phaB<sub>Re</sub>* na orientação do promotor *LacZ*.

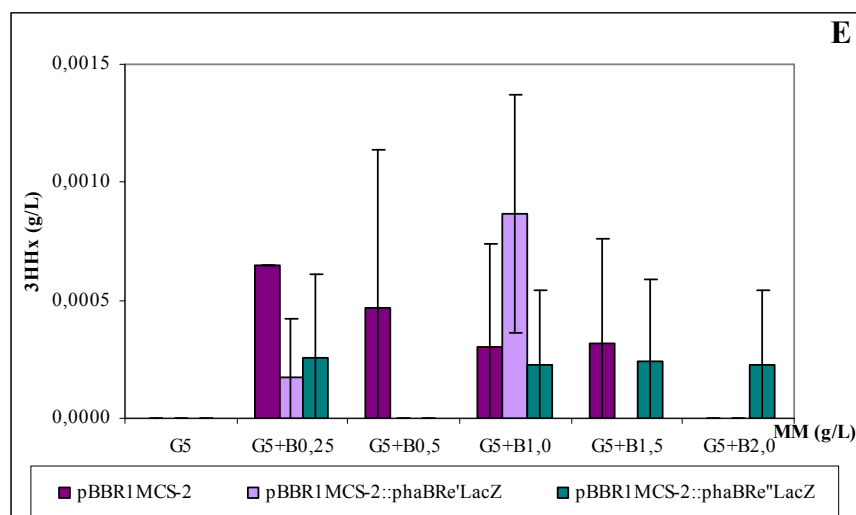


**Figura 5.14** Gráficos do perfil de acúmulo de PHA total e monômeros 3HB e 3HHx por *Burkholderia sacchari* linhagem abrigando plasmídeo vazio e recombinantes a partir de glicose e ácido butírico (continua).



**Figura 5.14** Gráficos do perfil de acúmulo de PHA total e monômeros 3HB e 3HHx por *Burkholderia sacchari* linhagem abrangendo plasmídeo vazio e recombinantes a partir de glicose e ácido butírico (continuação).





**Figura 5.14** Gráficos do perfil de acúmulo de PHA total e monômeros 3HB e 3HHx por *Burkholderia sacchari* linhagem abrigando plasmídio vazio e recombianes a partir de glicose e ácido butírico (conclusão).

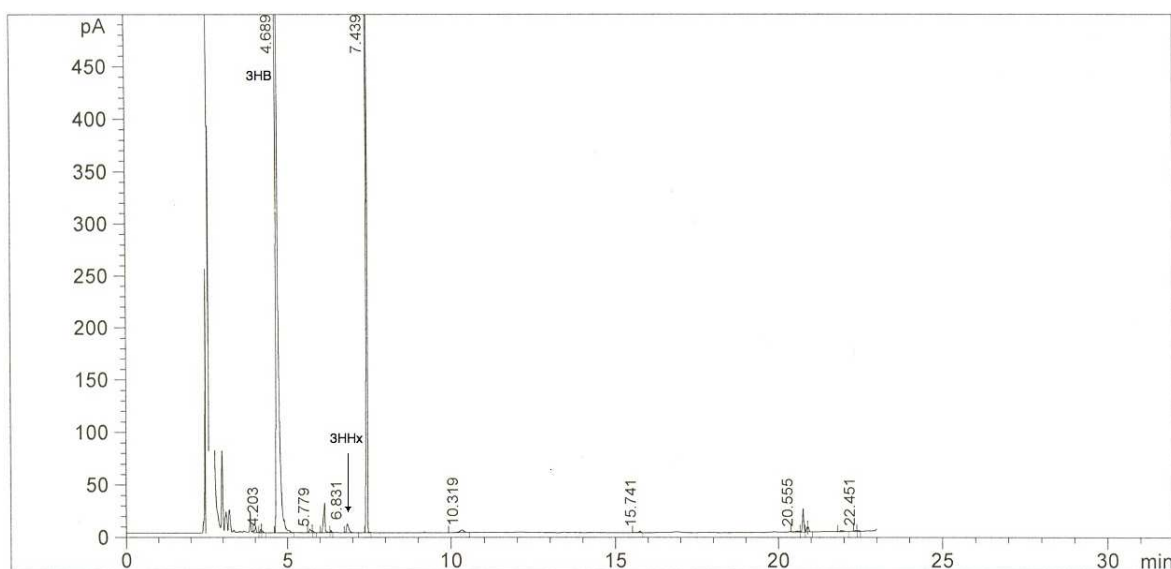
## 5.5 Caracterização e análise das propriedades térmicas do polímero produzido por *Burkholderia sacchari*

### 5.5.1 Caracterização por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (CG-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN)

Para caracterizar o polímero produzido nos ensaios em maior escala, foram realizados experimentos utilizando a concentração de 5 g/L de glicose associada a 1 g/L de ácido hexanóico, procedeu-se a extração com clorofórmio, a partir de células liofilizadas e purificação do material por precipitação em éter de petróleo, conforme descrito no item 4.7.4 de Material e Métodos. Foram feitas análises por cromatografia gasosa (CG), esta associada à espectrometria de massa (CG-MS) e por ressonância magnética nuclear (RMN).

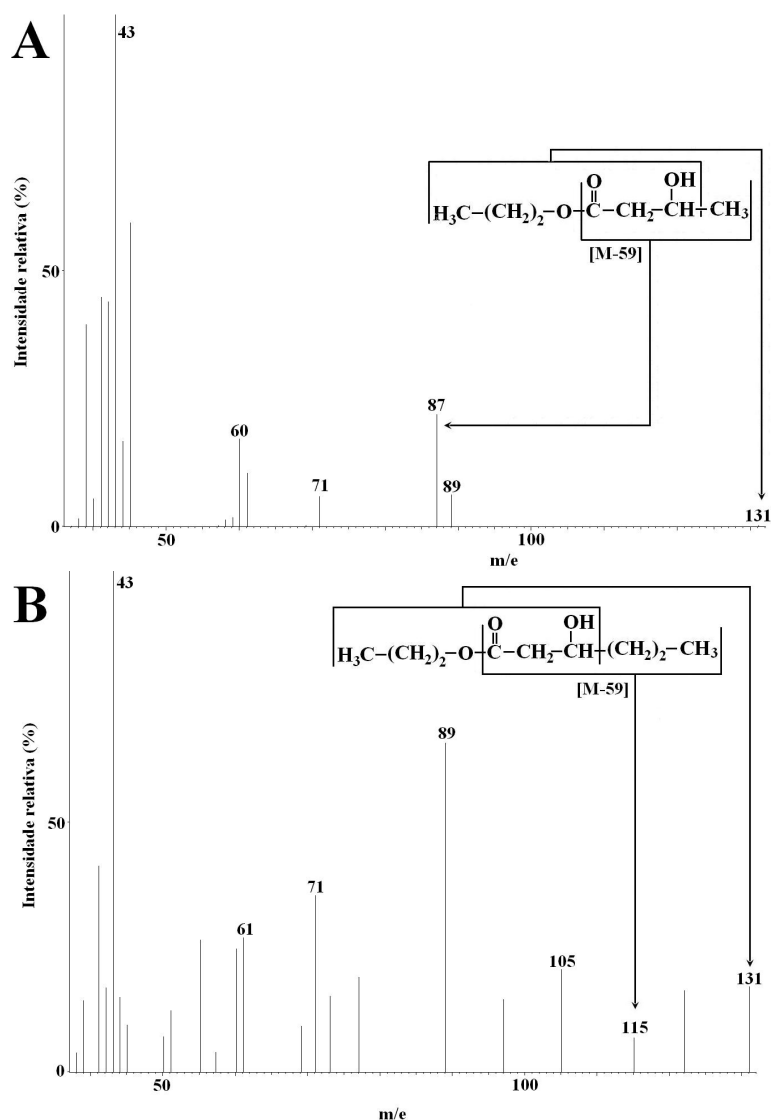
Com o objetivo de excluir a hipótese que o monômero 3HHx detectado por cromatografia gasosa correspondesse a estruturas livres, não efetivamente incorporadas ao PHA, o polímero extraído foi analisado por CG e CG-MS. A análise da composição do PHA extraído por CG detectou 0,60 mol% de 3HHx e 99,40 mol% de 3HB no polímero acumulado [P(3HB-co-0,6mol%3HHx)] por *B. sacchari* (Figura 5.15). Como dito anteriormente, este trabalho se encontra inserido no contexto de um projeto cujo objetivo é

produzir P(3HB-co-3HA<sub>MCL</sub>), com o último monômero em várias proporções. No que diz respeito ao copolímero P(3HB-co-3HHx), várias faixas de porcentagem em mol de 3HHx compõem o copolímero. São conseguidos desde quantidades pequenas, até 2 mol% de 3HHx com *B. sacchari* (este trabalho), entre 2 e 8 mol% deste monômero com linhagens recombinantes de *P. putida* (GOMES, 2009) e até 20 mol% com linhagens do gênero *Aeromonas* (MATSUDA, 2009).



**Figura 5.15-** Espectro de cromatografia gasosa indicando a presença dos picos (tempos de retenção em minutos) de 3HB e 3HHx.

O PHA extraído também foi analisado por CG-MS e os espectros de massas correspondentes aos picos 3HB e 3HHx foram analisados. Os resultados obtidos são compatíveis com esses monômeros, uma vez que para todos os picos foi detectado o fragmento de m/e 131, correspondente a alfa-clivagem do grupo funcional hidroxil de propil-ésteres de 3-hidroxiácidos (LEE e CHOI, 1995). Além disso, foram também detectados os fragmentos m/e [M-59] que correspondem a 87 e 115, respectivamente, para os propil-ésteres dos ácidos 3-hidroxi-butírico e 3-hidroxi-hexanóico (Figura 5.16).



**Figura 5.16-** Espectro de massas relativos a propil-ésteres de 3-hidroxiacanoatos. A. 3-hidroxybutiril-propil-éster. B. 3-hidroxihexanoil-propil-éster.

A ressonância magnética nuclear (RMN) foi realizada utilizando-se o polímero purificado, conforme citado acima. Os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN e  $^{13}\text{C}$ -RMN do polímero produzido por *B. sacchari* estão de acordo com os deslocamentos químicos associados com a estrutura do P3HB (Figura 5.17 A e B) encontrados na literatura. Como pode ser verificado no estudo de Pereira e colaboradores (2008) que observaram para polímeros P3HB, ao analisar o espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, deslocamento químico 5,26 ppm do grupo CH, para o metileno o deslocamento esteve entre 2,6 e 2,47 ( $\text{CH}_2$ ) e para  $\text{CH}_3$  1,27 ppm. Já para o espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN, foram observados picos de deslocamento químico de 169,19 ppm para grupo carboxil ( $\text{C}=\text{O}$ ), 67,64 ppm para o grupo CH, 40,79 para  $\text{CH}_2$  e 19,79 ppm para  $\text{CH}_3$ . Não é possível visualizar picos de 3HHx na ressonância, devido às pequenas

quantidades deste monômero (0,6 mol%) observadas no material analisado, já que esta análise não detecta sinais em amostras de composição menor que 1 mol%.

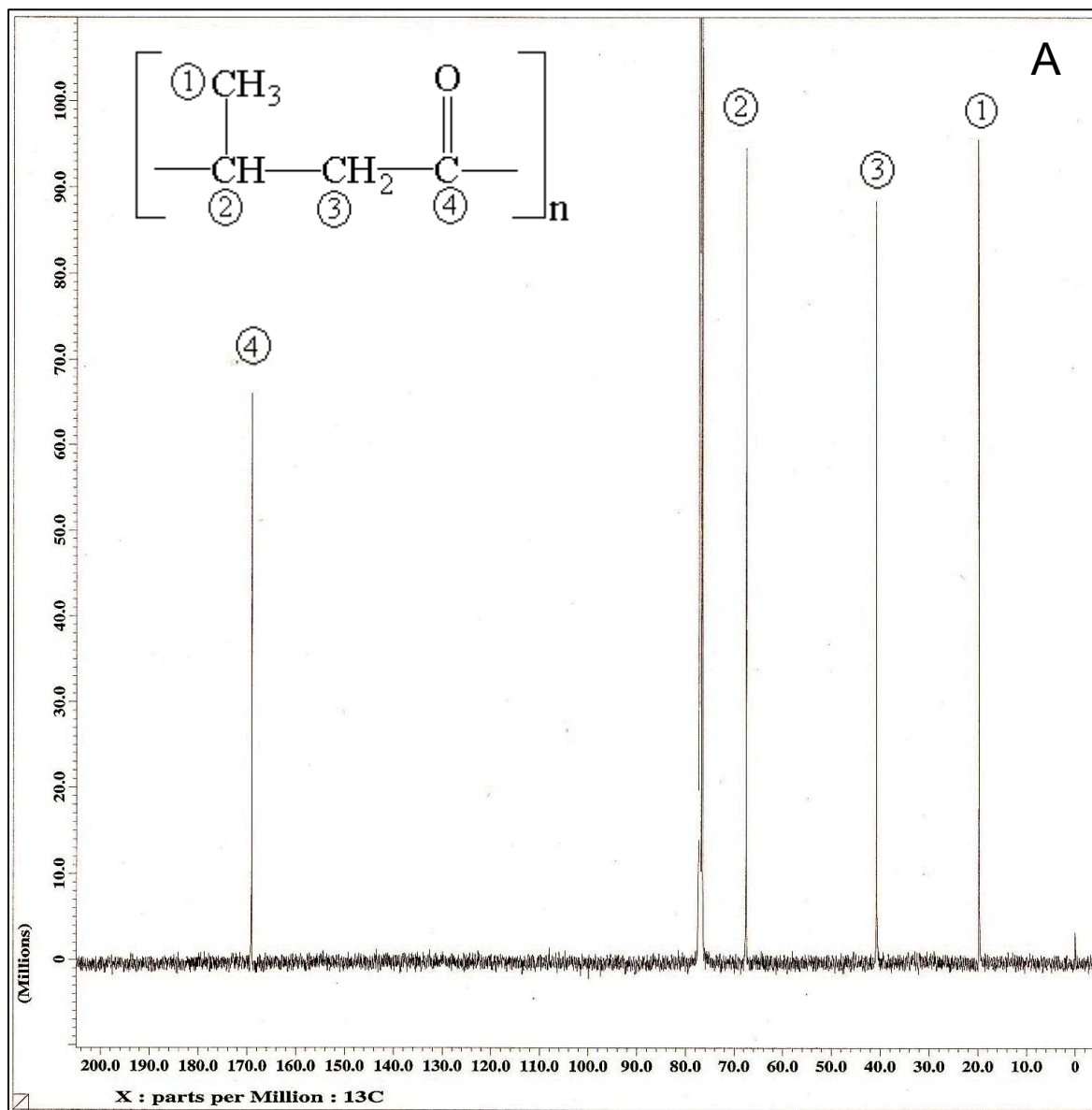


Figura 5.17- Espectro de ressonância magnética de  $^{13}\text{C}$  (A) e  $^1\text{H}$  (B) de P(3HB-co-0,6mol%3HHx) produzido por *B. sacchari* (continua).

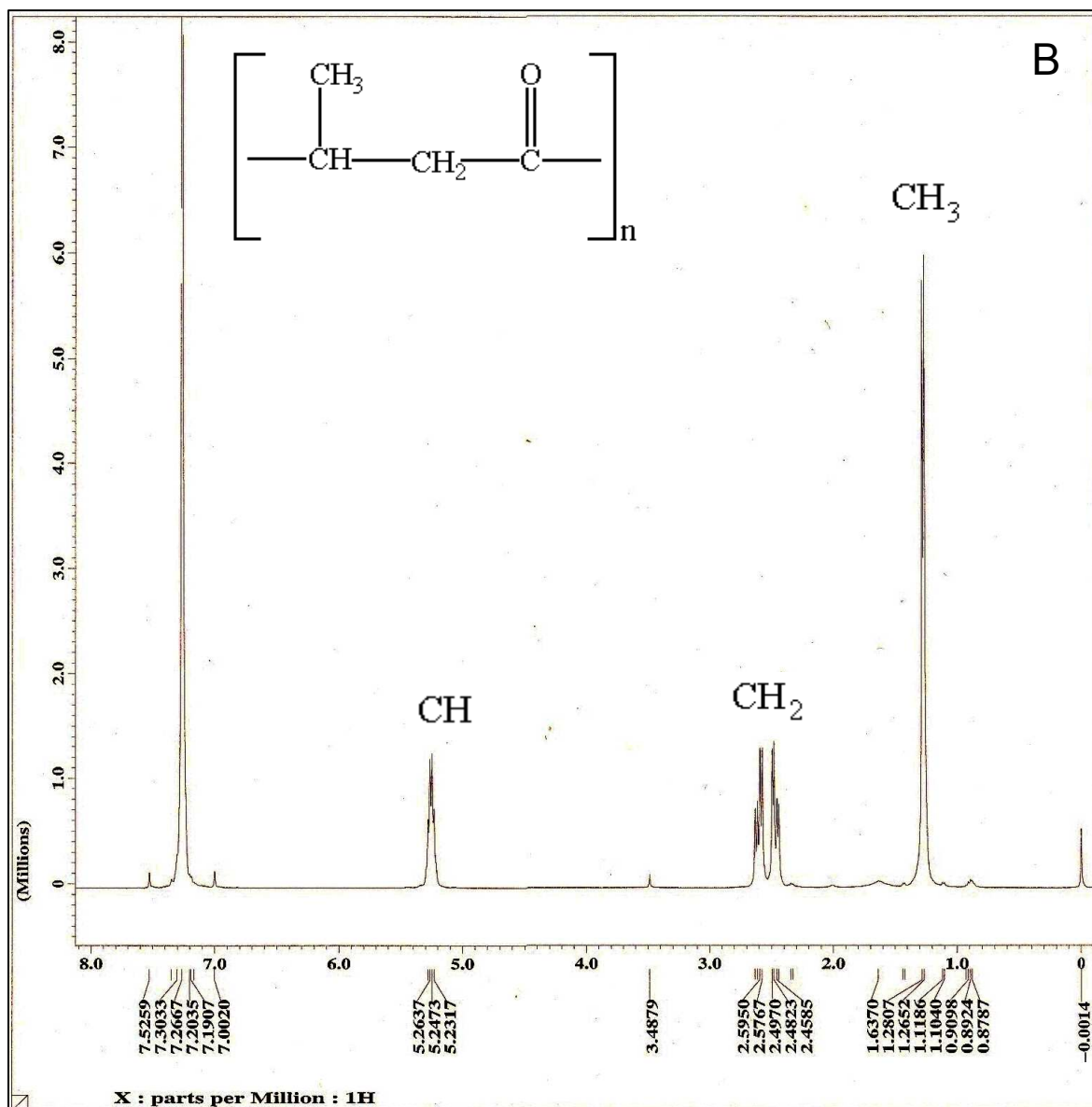


Figura 5.17- Espectro de ressonância magnética de  $^{13}\text{C}$  (A) e  $^1\text{H}$  (B) de P(3HB-co-0,6mol%3HHx) produzido por *B. sacchari* (conclusão).

### 5.5.2 Análise das propriedades térmicas por *Thermogravimetry analysis* (TGA) *Dynamical mechanical analysis* (DMA) e *Differential scanning calorimetry* (DSC)

Para as análises de propriedade de P(3HB-co-0,6mol%3HHx) produzido por *B. sacchari* foram feitos filmes do polímero purificado, cuja espessura aproximada era de 0,1 mm. Os resultados de análise termogravimétrica (TGA), que demonstra a estabilidade térmica, apresentaram uma temperatura de degradação 287,7 °C (Anexo G), valor menor

do que aquele observado para o P3HB (293 °C) (Dr. Rubén Sánchez, comunicação pessoal), isto talvez possa ser explicado pela presença de unidades 3HHx no polímero. Shánchez e colaboradores (2003) detectaram temperatura de degradação de 234 °C para polímero de PHA<sub>MCL</sub> composto por 20-25% de 3HO e 60 a 70% de 3-hidroxidecanoato (3HD), indicando que a inserção de monômeros HA<sub>MCL</sub> diminui esta temperatura.

A análise das propriedades mecânicas do material (DMA) evidenciou que o polímero tem uma temperatura de transição vítrea ( $T_G$ ) de 16 °C (Anexo H). A  $T_G$  do polímero de 3HB tem sido descrita como 4 °C (DOI *et al.*, 1995; SUDESH *et al.*, 2000), entretanto também foram reportadas  $T_G$  de 1 °C (FUKUI *et al.*, 2002) e de 0,1 °C (PEREIRA *et al.*, 2008). Segundo Cheung e colaboradores (2002) a  $T_G$  é dependente da porcentagem molar de unidades 3HHx no polímero. Doi e colaboradores (1995) reportaram temperatura de transição vítrea entre 0 a -4 °C para copolímeros de P(3HB-co-3HHx) com 3HHx variando de 5 a 25 mol%, indicando que o acréscimo destas unidades ao 3HB diminui a  $T_G$ , entretanto isto não foi observado para o copolímero produzido por *B. sacchari*. Uma pequena transição observada no gráfico de DMA antes da transição vítrea principal (Anexo H) poderia ser indicativo da presença de domínios formados por segmentos com a seqüência 3HHx (Dr. Rubén Sánchez, comunicação pessoal).

A *Differential scanning calorimetry* (DSC) apresentou como resultado uma temperatura de fusão ( $T_M$ ) 173 °C (Anexo I). O valor de  $T_M$  observado também é um pouco inferior ao valor frequentemente reportado para 3HB que varia entre 175 e 180 °C (DOI *et al.*, 1995; SUDESH *et al.*, 2000; FUKUI *et al.*, 2002). Pereira e colaboradores (2008), avaliando propriedades térmicas de polímeros 3HB produzidos a partir de várias fontes de carbono, obtiveram valores de  $T_M$  entre 170 e 176 °C. O polímero de 3HB também foi reportado com  $T_M$  de 170 °C por Nomura e colaboradores (2004). Embora estes trabalhos tenham apresentado valores de  $T_M$  semelhantes ao valor encontrado para P(3HB-co-0,6mol%3HHx) produzido por *B. sacchari*, alguns trabalhos têm demonstrado que a adição de pequenas quantidades de HA<sub>MCL</sub> ao polímero de 3HB diminui a  $T_M$  para 150 °C [P(3HB-co-0,92mol%3HHx-co-0,20mol%HO)] ou 141 °C [P(3HB-co-0,98mol%3HHx-co-0,28mol%HO)] (Nomura *et al.*, 2004). Fukui e colaboradores (2002) reportaram um polímero P(3HB-co-1,5mol%3HHx) com  $T_M$  variando entre 150 e 161 °C. Segundo análise de Sánchez (Dr. Rubén Sánchez, comunicação pessoal), estes dados de DSC não indicam uma diferença com o 3HB que possa justificar a introdução de seqüências de 3HHx, mas esta técnica não poderia detectar o impacto nas propriedades de pequenas quantidades de 3HHx. Embora a  $T_M$  se mostre um pouco menor do que outras

publicações para P3HB, para se ter uma boa análise, deve-se comparar polímeros com massas molares da mesma ordem e dispersão de massas molares semelhantes. Novas análises de DMA e de morfologia da fase cristalina foram sugeridos para confirmar uma aparente maior flexibilidade observada para o polímero analisado.

## 6 CONCLUSÕES

1. Este trabalho permitiu confirmar que *Burkholderia sacchari* é capaz de acumular P3HB-co-3HHx a partir de glicose e ácido hexanóico. O fornecimento de concentrações crescentes de ácido hexanóico permitiu um discreto aumento da fração 3HHx (até 2 mol%), indicando que a PHA sintase de *B. sacchari* permite a formação de PHA com teores combinados de 3HB e de 3HHx. Entretanto, as vias de catabolismo de ácido hexanóico devem ser mais eficientes, já que os valores de conversão de ácido hexanóico a 3HHx correspondem a menos do que 10% do máximo teórico. Dois fatores podem contribuir para isto: a eficiência maior da  $\beta$ -oxidação na degradação do ácido hexanóico, que diminuiria o seu direcionamento para a formação de 3HHx e a baixa especificidade da PHA sintase por esses monômeros;
2. Experimentos fornecendo-se ácido octanóico indicaram que, na linhagem selvagem, este foi utilizado principalmente para o crescimento e/ou acúmulo de 3HB, não gerando unidades 3HHx;
3. A partir de ácido butírico, apenas monômeros de 3HB foram detectados no PHA, sugerindo que *B. sacchari* selvagem não foi capaz de condensar os intermediários do metabolismo de modo a produzir monômeros de 3HHx ao se utilizar glicose e ácido butírico como substratos;
4. Mutantes incapazes de crescer em ácido hexanóico ( $hx^-$ ) de *B. sacchari* foram obtidos empregando irradiação ultravioleta e também o transposon mini *Tn5*. Tais mutantes ainda usam o ácido hexanóico para o acúmulo, embora de forma precária, convertendo-o a 3HHx, em proporções reduzidas. Além de não ter havido aumento do fluxo de ácido hexanóico para a formação de unidades 3HHx, as mutações acarretaram a redução no direcionamento da fonte de carbono para a formação de 3HB. A identificação dos genes alterados nestes mutantes trará informações que podem permitir explicar este fenômeno;
5. Foram construídos recombinantes de *B. sacchari*, portando genes *phaB* (codificador de 3-cetoacilCoA redutase NADPH dependente) de *R. eutropha*, *phaJ1* e *phaJ4* [ambos codificadores de enoil-CoA hidratases (*R*)-específicas] de *P. aeruginosa*. Neste segundo caso, cada gene foi inserido em duas orientações inversas de modo a permitir a avaliação da relevância do promotor *lacZ* na expressão dos genes de *phaJ*;



6. A expressão de *phaJ1* em *B. sacchari* promoveu maior direcionamento de 3HA para a PHA sintase, sem, contudo aumentar a fração molar de 3HHx produzido, nem o fluxo deste monômero para a síntese de PHA. Houve um aumento no fluxo de 3HB, mesmo em ausência de ácido hexanóico, o que indica que a expressão deste gene aumentou a síntese de PHA a partir de carboidrato, ou seja, mesmo quando a via de beta oxidação não estaria suprindo intermediários para a síntese de 3HB. A maneira pela qual isto ocorre ainda precisa ser melhor investigada;
7. Os resultados a cerca do papel do gene *phaJ4* não permitem traçar uma conclusão objetiva, uma vez que as alterações no teor de polímero, na composição monomérica e os fluxos de monômeros foram observados apenas em um experimento, necessitando assim de uma investigação mais ampla;
8. A expressão do gene *phaB* em *B. sacchari* também levou ao aumento no teor de PHA acumulado em alguns dos experimentos, sem, contudo aumentar o fluxo de 3HHx para a PHA sintase, mas sim de 3HB. A partir de ácido butírico, entretanto, a expressão do gene *phaB* não levou a um aumento do teor de PHA acumulado, ao contrário, mesmo frente a 0,25 g/L de ácido butírico foi observada uma forte inibição do acúmulo. Nestes experimentos foi observada a síntese de copolímeros contendo 3HB e 3HHx, embora em pequenas quantidades, mesmo quando apenas o plasmídeo foi expresso, o contrário do observado com a linhagem selvagem, o que sugere que *B. sacchari* é capaz de promover a condensação de acetil-CoA e butiril-CoA formando 3-cetohexanoil-CoA que é posteriormente reduzido a 3HHx. Os resultados, em conjunto com aqueles obtidos a partir de octanoato, sugerem que a PHA sintase de *B. sacchari* é capaz de incorporar também monômeros de 3HO;
9. A análise, por CG, da composição do PHA produzido pela linhagem selvagem detectou 0,60 mol% de 3HHx e 99,40 mol% de 3HB no polímero acumulado [P(3HB-co-0,6mol%3HHx)]. Os resultados obtidos por CG-MS são compatíveis com a presença desses monômeros. Os espectros de <sup>1</sup>H-RMN e <sup>13</sup>C-RMN do polímero estão de acordo com os deslocamentos químicos associados com a estrutura do P3HB encontrados na literatura. Não é possível visualizar picos de 3HHx na ressonância, devido às pequenas quantidades deste monômero (0,6 mol%) observadas no material analisado, já que esta análise não detecta sinais em amostras de composição menor que 1 mol%. Para comprovar

indícios de uma possível melhoria na flexibilidade do material produzido por *B. sacchari*, ensaios mais amplos de caracterização do polímero são necessários;

10. No contexto em que foi desenvolvido este trabalho, que vem a ser a produção de P(3HB-co-3HA<sub>MCL</sub>), com o último monômero em várias proporções, estes resultados são promissores quando se pretende gerar PHA com frações de 3HHx de até 2 mol%. Outras linhagens e condições permitem obter frações entre 2 e 8 mol% deste monômero com linhagens recombinantes de *P. putida* (Gomes, 2009) e até 20 mol% com linhagens do gênero *Aeromonas* (Matsuda, 2009), cobrindo um espectro amplo de teores de 3HHx.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ABE, H.; DOI, Y.; FUKUSHIMA, T.; EYA, H.; Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoate by *Pseudomonas* sp. 61-3. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 16, n. 3, p. 115-119, 1994.

ALDOR, I.S. E KEASLING, J.D. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. **Cur. Op. Biotechnol.**, v. 14, p. 475-483, 2003.

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

ANTONIO, R.V.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B.H.A. Analysis of in vivo substrate specificity of the PHA synthase from *Rashtonia eutropha*: formation of novel copolyesters in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 182, p. 111-117, 2000.

AMARA, A.A., STEINBÜCHEL, A., REHM, B.H.A. "In vivo evolution of the *Aeromonas punctata* polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: isolation and characterizations of modified PHA synthases with enhanced activity". **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 477-482, 2002.

BIAN, Y.Z.; WANG, Y.; AIBAIDOU, G.; CHEN, G.Q.; WU, Q. Evaluation de poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration. **Biomaterials.**, v. 30, p. 217-225, 2009.

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.

BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 1977-1982, 1988.

BRANDL, H.; KNEE JR, E.J.; FULLER, R.C.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W. The ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 11, p. 49-55, 1989.

BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. **Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.**, v. 41, p.77-93, 1990.

---

\* De acordo com:

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

BRAUNEGG, B.; LEFEBVRE, J.M.; SHORT, J.M. XL1- Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with Beta-galactosidase selection. **BioTechniques**, v. 5, n. 4, p. 376-378, 1998.

BRAZ, V. S.; MARQUES, M. V. Genes involved in cadmium resistance in *Caulobacter crescentus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, p. 289-295, 2005.

BUENO NETTO, C.L.; CRAVEIRO, A.M.; PRADELLA, J.G.C.; OLIVEIRA, M.S.; MAIORANO, A.E.; PINTO, A.G.; SAITO, R.M. Processo para produzir polihidroxicanoatos a partir de açúcares extraídos da cana-de-açúcar. **Patente Brasileira** PI 9103116-8, 1993.

BUFFONI, E.; GOMEZ, J.G.C.; SILVA, L.F. Avaliação da composição de polímeros biodegradáveis produzidos por *Burkholderia sacchari* a partir de diferentes substratos. **Simpósio Nacional de Bioprocesso**, Recife-PE, 2005.

BUFFONI, E. Avaliação da composição de polímeros biodegradáveis produzidos por *Burkholderia sacchari* a partir de diferentes substratos. **Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia USP-IPT**, 80 p., 2006.

BULLOCK, W.O.; FERNANDEZ, J.M.; SHORT, J.M. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with Beta-galactosidase selection. **BioTechniques**, v. 5, n. 4, p. 376-378, 1987.

BYROM, D. Industrial production of copolymers from *Alcaligenes eutrophus*. In: Dawes, E.A. (Ed.) Novel biodegradable microbial polymers. **Dordrecht: Kluwer academic Publishers.**, p. 113-117, 1990.

CABALLERO, R.C, KAREL, S.F., REGISTER, R. Biosynthesis and characterization of hydroxybutyrate-hydroxycaproate copolymers. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17, p. 86-92, 1995.

CARMINATTI, C., MESSANE, F.E., BRANDÃO, M.C.Z., PINHEIRO, V.R. **Produção de polihidroxicanoatos**, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, 2006.

CHEN, G.Q.; ZHANG, G.; PARK, S.J.; LEE, S.Y. Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Appl. Microbial Biotechnol.**, v. 57, p. 50-55, 2001.

CHEN, S.; WANG, P. P.; WANG, J. P.; CHEN, G. Q.; WU, Q. Guided growth of smooth muscle cell on poly(3-hydroxybutyrate-co-3 hydroxyhexanoate) scaffolds with uniaxial microtubular structures **Journal of Biomedical Materials** DOI: 10.1002/jbm.a.31780, 2008

CHEUNG, M. K., WAN, K. P. Y., AND YU, P. H. Miscibility and morphology of chiral semicrystalline poly-(R)-(3-hydroxybutyrate)/chitosan and poly-(R)-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan blends studied with DSC, <sup>1</sup>H T<sub>1</sub> and T<sub>1</sub> CRAMPS. **J. Appl. Polym. Sci.** v. 86, p. 1253–1258, 2002.

DE LORENZO, V.; HERRERO, M.; JAKUBZIK, V.; TIMMIS, K. N. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter, probing, and chromosomal insertion for cloned DNA in gram-negative Eubacteria. **Journal of Bacteriology**, v.172, n. 11, 1990.

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(2±3), p. 177, 1998.

DENNIS, D.E. Expression of polyhydroxyalkanoates in recombinant bacteria. In: **International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates**. Montreal, Canada, 1994.

DE SMET, M.J.; EGGINK, G.; WITHOLT, B.; KINGMA, J.; WYNBERG, H. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. **J. Bacteriol.**, v. 154, n. 2, 870-878, 1983.

DOI, Y., KUNIOKA, M., NAKAMURA, Y., *et al.* Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from <sup>13</sup>C-labelled acetate and propionate. **Macromolecules**, v. 20, p. 2988-2991, 1987.

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

DOI, Y. KITAMURA, S. ABE, H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Macromolecules**, v. 28, p. 4822, 1995.

ELIGIO, T.; RIEUMONT, J.; SÁNCHEZ, R.; SILVA, J. F. S. **Angew. Makromol. Chem.**, v. 270, p. 69, 1999.

FILIPOV, M.C. O. Obtenção e caracterização de mutantes de *Burkholderia* sp. IPT 101 deficientes na síntese ou no reconsumo de poli-3-hidroxibutirato- um plástico biodegradável. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 154 p., 2000.

FINDLAY, R.H.; WHITE, D.C. Polymeric  $\beta$ -hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 45, p. 71-78, 1983.

FÜCHTENBUSCH, B.; FABRITIUS, D.; & STEINBÜCHEL, A. Incorporation of 2-methyl-3-hydroxybutyric acid by axenic cultures in defined media. **FEMS Microbiology Letters**, v. 138, p. 153-160, 1996.

FÜCHTENBUSCH, B.; FABRITIUS, D.; WÄLTERMANN, M. & STEINBÜCHEL, A. Biosynthesis of novel copolyesters containing 3-hydroxypivalic acid by *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126 and related bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 159, p. 85-92, 1998.

FUKUI, T.; DOI, Y. Cloning and analysis of the poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 15, p. 4821-4830, 1997.

FUKUI, T.; DOI, Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 49, p. 333-336, 1998.

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. 18, p. 667-673, 1998.

FUKUI T.; YOKOMIZO S.; KOBAYASHI G.; DOI Y. Co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and (*R*)-enoyl-CoA hydratase genes of *Aeromonas caviae* establishes copolyester biosynthesis pathway in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 170, p. 69–75, 1999.

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.

GOMES, R.S.; SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C. Biossíntese de PHA por linhagens recombinantes de *Pseudomonas putida*. 25<sup>a</sup> REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO ESALQ/USP, 2006. **Resumos...** São Pedro-SP, 2006.

GOMES, R.S., UNGAR, A.B., SILVA, L.F., GOMEZ, J.G.C. Produção de polihidroxialcanoatos contendo 3-hidroxibutirato e 3-hidroxialcanoatos de cadeia média (3HAMcl) por linhagens recombinantes de *Pseudomonas putida*. XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16, 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba - PR, 2007.

GOMES, R.S. **Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para controle da composição monomérica**. 100p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 2009.

GOMEZ, J.G.C. Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos. **Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia USP-IPT-I. Butantã** 92 pp., 1994.

GOMEZ, J.G.C.; RODRIGUES, M.F.A.; ALLI, 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, 1996a.

GOMEZ, J.G.C.; BUENO NETTO, C.L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Rev. Bras. Eng. Quím.**, v. 17, p. 24-29, 1997

GOMEZ, J.G.C.; FONTOLAN, V.; ALLI, 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; BUENO NETTO. Produção de poliésteres bacterianos In: Biotecnologia Industrial, v. 3 Processos fermentativos e enzimáticos. Lima, Aquarone, Borzani e Schmidell (Ed.) **Editora Edgard Blücher Ltda.** SP, 2001.

GOMEZ, J.G.C.; SILVA, L.F.; PRADELLA, J.G.C.; TACIRO, M.K.; SILVA-QUEIROZ, S.R.; BRETAS, A.F.; RANGEL E, F.A. SANCHEZ, R. J. Explorando o potencial metabólico de bactérias para a produção de elastômeros biodegradáveis. **SINAFERM**, 2005.

GREEN, P. R.; KEMPER, J.; SCHECHTMAN, L.; GUO, L.; SATKOWSKI, M.; FIEDLER, S.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B. H. A. Formation of Short chain length/medium chain length polyhydroxyalkanoate copolymers by fatty acid  $\beta$ -oxidation inhibited *Ralstonia eutropha* **Biomacromolecules**, v. 3, p. 208-213, 2002.

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.

HASSAN, M. K.; ABOU-HUSSEIN, R.; ZHANG, X.J.; MARK, J.E.; NODA, I. Biodegradable copolymers of 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate (Nodax<sup>TM</sup>), including recent improvements in their mechanical properties. **Mol. Cryst. Liq. Cryst.**, v. 447, p. 341-362, 2006.

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, 1988a.

HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; CHU, L.; DAWES, E.A.. The role of NADH- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 52, p. 259-264, 1988b.

HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A.. A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria. **Biotechnol. Lett.**, v. 11, p. 471-476, 1989.

HAYWOOD, G.W., ANDERSON, A.J., EWING, D.F., DAWES, E.A. Accumulation of polyhydroxyalkanoate containing primary 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrates by *Pseudomonas* sp Strain NCIMB 40135. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 3354-3359, 1990.

HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; WILLIAMS, G.A.; DAWES, E.A.; EWING, D.F. Accumulation of a poly (hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126. **Int J Biol Macromol**, v. 13, p. 83, 1991.

HOLMES, P.A. Applications of PHB – a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physics Technol**, v.16, p. 32-36, 1985.

HUIJBERTS, G.N.; EGGINK, G.; DE WAARD, P.; HISMANN, G.W.; WITHOLT, B. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 1949-1954, 1992.

HUIJBERTS, G.N.M.; DE RIJK, T.C.; DE WAARD, P.; EGGINK, G. <sup>13</sup>C Nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. **J. Bacteriol.**, v.176, p. 1661-1666, 1994. HOLMES, P.A. Biologically produced PHA polymers and copolymers p. 1-65. IN. D.C. Bassett (ed.), Develop. in crystalline polymers. **Elsevier**, London, England, 1988.

HUISMAN, G.W.; LEEUW, O.; EGGINK, G.; WITHOLT, B. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonas. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, n. 8, p. 1949-1954, 1989.

HUISMAN GW, WONINK E, MEIMA R, KAZEMIER B, TERPSTRA P, WITHOLT B. Metabolism of poly (3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. **J Biol Chem** 266:2191–2198(1991)

HUSTEDE, E. & STEINBKHEL, A. Characterization of the polyhydroxyalkanoate synthase gene locus of *Rhodobacter sphaeroides*. **Biotechnol Lett** . v15, p.709-714, 1993

JI, Y.; LI, X. T.; CHEN, G. Q. Interactions between a poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) terpolyester and human keratinocytes. **Elsevier Biomaterials**, v. 29, p. 3807–3814, 2008.

KAHAR, P.; TSUGE, T.; TAGUCHI, K.; DOI, Y. High yield of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. **Pol. Deg. Stab.**, v. 83, p. 79-86, 2004.

KING, P.P. Biotechnology. An industrial view. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 32, p. 2-8, 1982.

KOBAYASHI, G.; SHIOTANI, T.; SHIMA, Y., DOI, Y. Biosynthesis and Characterization of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from oils and fats by *Aeromonas* sp. OL-338 and *Aeromonas* sp. FA-440. **Biodegradable Plastics and Polymers.**, p. 410-416, 1994.

KOVACH, M.E., PHILLIPS, R.W., ELZER, P.H., ROOP II, R.M., PETERSON, K.M. “pBBR1MCS: A broad-host-range cloning vector”. **BioTechniques**, v. 16, n. 5, p. 800-802, 1994.

KRAAK, M.N.; KESSLER, B.; WITHOLT, B. *In vitro* Activities of Granule-Bound Poly[(R)-3-Hydroxyalkanoate] Polymerase C1 of *Pseudomonas oleovorans*. **Eur. J. Biochem.**, v. 250, p. 432-439, 1997.

KUNIOKA, M.; NAKAMURA, Y.; DOI, Y. New bacterial copolyesters produced in *Alcaligenes eutrophus* from organic acids. **Polymer Communic.**, v. 29, p. 174-176, 1988.



KUNIOKA, M., KAWAGUCHI, Y., DOI, Y. Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 30, p. 569-573, 1989

LAFFERTY, R.M., KORSATKO, B., KORSATKO, W. **Microbial production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid**. In: RHEM, H.J., REED, G. (eds) Biotechnology. Weinheim: VCH, 1988. v. 6b, p. 136-176.

LAGEVEEN, R.; HUISMAN, G.W.; PREUSTING, H.; KETELAAR, P.; EGGINK, G.; WITHOLT, B. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition do poly-(R)-3hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 54, n. 12, p. 2924-2932, 1988.

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 Microbiology Letters**, v. 150, p. 303-309, 1997.

LEAF, T.A.; PETERSON, M.S.; STOUP, S.K. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* expressing bacterial polyhydroxybutyrate synthase produces poly-3-hydroxybutyrate. **Microbiol.**, v. 142, p. 1169-1180, 1996.

LEE, I.Y.; KIM, G.J.; CHOI, D.K.; YEON, B.K.; PARK, Y.H. Improvement of Hydroxyvalerate Fraction in Poly(3-Hydroxybutyrate- Co-Hydroxyvalerate) by a Mutant Strain of *Alcaligenes eutrophus* **J. Ferm. Bioeng.**, v. 81, n. 3, p. 255-258, 1996.

LEE, E.Y.; CHOY, C.Y. Gas chromatography-mass spectrometric analysis and its application to a screening procedure for novel bacterial polyhydroxyalkanoic acids containing long chain saturated and unsaturated monomers. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 80, p. 408-414, 1995.

LEE, S.H., OH, D.H., AHN, W.S., LEE, Y., CHOI, J. AND LEE, S.Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 67, p.240-244, 2000.

LENZ, R.W.; KIM, B.W.; ULMER, H.W. & FRITZSCHE. Funcionalized poly-b-hydroxyalkanoates produced by bacteria. In: **Dawes, E.A. (ed). Novel Biodegradable microbial polymers**, p.23-35, 1990.

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

LEMOIGNE, M. Products of dehydration and of polymerization of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid. **Bull. Soc. Chim. Biol.**, v.8, p. 770-782, 1926.

LI, X.T. ; SUN, J.; CHEN, S.; CHEN; G. Q. *In vitro* investigation of maleated poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for its biocompatibility to mouse fibroblast L929 and human microvascular endothelial cells. **Journal DOI**: 10.1002/jbm.a.31890 , 2007.

LIANGQ, Z.; JINGFAN, X.; TAO, F.; HAIBIN, W. Synthesis of poly (3-hydroxybutirate-co-3-hydroxyoctanoate) by a *Sinorhizobium fredii* strain. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 344-349, 2006.

LIEBERGESELL, M.; HUSTEDE, E.; TIMM, E.; STEINBÜCHEL, A.; FULLER, R.C.; LENZ, R.W.; SCHLEGEL, H.G. Formation of poly(3-hydroxyalkanoic acids) by phototrophic and chemolithotrophic bacteria. **Arch. Microbiol.**, v. 155, p. 42-521, 1991.

LIEBERGESELL, M.; MAYER, F. e STEINBÜCHEL, A. Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacterial reveals synthesis of polyester exhibiting an unusual composition. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 40, p. 292-300, 1993.

LÍCIO, D.C.P.; 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.

LOPES, M.S.G.; ACHANARAY, M.A.P.; CAMPOS, N.F.; GOMEZ, J.G.C.; SILVA, L.F. Isolamento de linhagens de solo antártico degradadoras de xilose e produtoras de PHA. Resumo publicado no **52º Congresso Latinoamericano de Genética**, 2006.

LOPES, M.S.G., GOMEZ, J.G.C., SILVA, L.F. Cloning and overexpression of the xylose isomerase gene from *Burkholderia sacchari* and production of polyhydroxybutyrate from xylose. **Can. J. Microbiol.**, v. 55, p. 1012-1015, 2009.

LOO, C.Y., LEE, W.H., TSUGE, T., DOI, Y., SUDESH, K. Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant. **Biotechnology Letters**, v. 27, p.1405-1410, 2005.

LU, X.; ZHANG, J.; WU, Q.; CHEN, G. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid  $\beta$ -oxidation pathway in *E. coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 221, p. 97-101, 2003.

LU, X.; ZHANG, W.; JIAN, J.; WU, Q.; CHEN, G. Molecular cloning and functional analysis of two polyhydroxyalkanoate synthase from two strains of *Aeromonas hydrophila* spp. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 243, n. 1, p. 149-155, 2005.

LÜTKE-EVERSLOH, T.; KAWADA, J.; MARCHESSAULT, R. H.; STEINBÜCHEL, A. Characterization of microbial polythioesters: physical properties of novel copolymers synthesized by *Ralstonia eutropha*. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 1, p. 159-166, 2002.

MA, L.; ZHANG, H.; LIU, Q.; CHEN, J.; ZHANG, J., CHEN, G.Q. Production of two monomer structures containing medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by  $\beta$ -oxidation-impaired mutant of *Pseudomonas putida* KT 2442 **Biores Technol**, v. 100, p. 4891-4894, 2009

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M; PARKER, J. Microbiologia de Brock. **Prentice Hall**. p. 256;280-283, 2004.

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

MATSUDA, T.S. **Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxicanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais.** 84f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 2009.

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

MICHELIN RAMOS. M. E. Caracterização de linhagens bacterianas para a produção de poli-3-hidroxi-butarato (P3HB) a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. **Tese de doutoramento apresentada ao ICB-USP** 94pp. São Paulo, 2003.

MIMURA, K.; NODA, A.; NAKANO, Y.; MORI, A. Porous sheet. European Patente Applications, EP 1939240A1, 2008.

MOSCOWITZ, G.J.; MERRICK, J.M. Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. Enzymatic synthesis of D-(-)- $\beta$ -hydroxybutyryl Coenzyme A by an enoyl hydratase from *Rhodospirillum rubrum*. **Biochemistry**, v.8, p.2748-2755, 1969.

NODA, I.; BOND, E.C. Polyhydroxyalkanoate copolymer and polylactic acid polymer composition for laminate films. **US Patent** 2002143136, 2002.

NODA, I. e SATKOWSKI, M.M. Agricultural items and agricultural methods comprising biodegradable copolymers. **US Patent** 2003143261, 2003.

NODA, I.; GREEN, P.R.; SATKOWSKI, M.M.; SCHECHTMAN, L.A. Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymers. **Biomacromolecules**, 6: 580-586, 2005.

NOGUEIRA, N.R.; GOMES, R.S.; GOMEZ, J.G.C.; SILVA, L.F. Estudo dos genes envolvidos na biossíntese de plástico em *Burkholderia sacchari*, 2005. **Simpósio Nacional de Bioprocesso**, Recife-PE, 2005.

NOGUEIRA, N.R. Estudo dos genes envolvidos na biossíntese de plástico em *Burkholderia sacchari*, **Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia USP-IPT**, 2006.

NOMURA C.T; TANAKA, T.; GAN, Z.; KUWABARA, K.; ABE, H.; TAKASE, K.; TAGUCHI, K.; DOI, Y. Effective enhancement of short-chain-length (SCL)-medium-chain-length (MCL) polyhydroxyalkanoate copolymer production by co-expression of genetically engineered 3-ketoacyl-acyl-carrier protein synthase III (*fabH*) and polyhydroxyalkanoate synthesis genes. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1457–1464, 2004b.

NONATO, R.V.; MANTELATO, P.E.; ROSSEL, C.E.V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 57, p.1-5, 2001.

OEDING, V.; SCHLEGEL, H.  $\beta$ -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H-16 and its significance in the regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism. **Biochem.J.**, v.134, p.239-248, 1973.

OUYANG, S.P.; LIU, Q.; FANG, L.; CHEN, G.Q. Construction of pha-operon-defined knockout mutants of *Pseudomonas putida* KT2442 and their applications in polyhydroxyalkanoate production **Macromol Biosci**, v.7, p.227-233, 2007a.

OUYANG, S.P.; LUO, R.C.; CHEN, S.S.; LIU, Q.; CHUNG, A.; WU, Q.; CHEN, G.Q. Production of polyhydroxyalkanoates with high 3-hydroxydecanoate monomer content by *fadB* and *fadA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442 **Biomacromolecules**, v. 8, p. 2504-2511, 2007 b.

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

PEREIRA, E. M. Avaliação da Influência de genes deo catabolismo de propionato sobre a síntese de copolímero biodegradável em *B. sacchari* e outras bactérias. Doutorado, Biotecnologia USP, 113 p., 2007.

PEREIRA, S.M.F., ROFRIGUEZ, R.S., GOMEZ, J.G.C. Biosynthesis and characterization of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) from renewable sources. **Revista Matéria**, v.13, n. 1, p. 01-11, 2008.

PEREIRA, E.M., SILVA-QUEIROZ, S.R., GOMEZ, J.G.C., SILVA, L.F. Disruption of 2-methylcitric acid cycle (2MCC) and evaluation of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate. **International Microbiology** (enviado para publicação), 2008.

PEREIRA, EM, SILVA-QUEIROZ, SR, GOMEZ, JGC, SILVA, LF . Disruption of the 2-methylcitric 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. 688-97, 2009.

PIEPER U; STEINBÜCHEL A Identification, cloning and sequence analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase gene of the gram-positive bacterium *Rhodococcus ruber*. **FEMS Microbiol Lett**, v.75, n.1, p. 73-9. 1992

PRADELLA, J.G.C. Biopolímeros e intermediários químicos. In: Relatório Técnico nº 84 396-205- Centro de Tecnologia de Processos e Produtos Laboratório de Biotecnologia Industrial- LBI/CTPP, São Paulo, 2006.

RAMSAY ,J.A.; ALY HASSAN. M.C.; RAMSAY, B.A. Hemicellulose as a potential substrate for production of poly ( $\beta$ -hydroxyalkanoates). **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 262 – 266, 1990.

QIU, Y.Z.; HAN, J.; GUO, J.J.; CHEN, G.Q. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from gluconate and glucose by recombinant *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas putida*. **Biotechnol. Lett.**, v. 27, n. 18, p. 1381-1386, 2005.

REHM, B.H.A.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25, p. 3-19, 1999.

REHM, B.H.A.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A. A new metabolic link between fatty acid *de novo* synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 37, p. 24044-24061, 1998.

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

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

REHM, B. Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoates granules: a platform technology for the production of tailor-made bioparticles. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 9, n.1, p. 41-62, 2007.

REN, Q.; DE ROO, G.; KESSLER, B.; WITHOLT, B. Recovery of active medium-chain-length-poly-3-hydroxyalkanoate polymerase from inactive inclusion bodies using ion-exchange resin. **Biochem. J.**, v. 349, p. 599–604, 2000.

REN, Q.; KESSLER, B.; VAN DER LEIJ, F.; WITHOLT, B. Mutants of *Pseudomonas putida* affected in poly-3-hydroxyalkanoate Produce in Recombinant *Escherichia coli* Strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 4, p.1311- 1320, 1998.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatography determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass-ester hydrochloric acid propanolysis. **J. Chromatogr.**, v. 445, p. 285-289, 1988.

ROCHA, R.C.S. Produção de poli-3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato por *Burkholderia sacchari* IPT 189 **Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em biotecnologia USP-IPT-I. Butantã**, 140p., 2002.

ROCHA, R.C.S., TACIRO, M.K., SILVA, L.F., PRADELLA, J.G.C. Feeding strategy for production of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) P(3HB-*co*-3HV) with *Burkholderia sacchari* IPT 189 **European Symposium on Biochemical Sciences ESBES-4**, Delft University of Technology, The Netherlands, Book of abstracts., p. 174, 2002.

ROCHA, R. C. S.; SILVA, L. F.; TACIRO, M.K.; PRADELLA, J.G.C. Production of P(3HB-*co*-3HV) with a broad range of 3HV content at high  $Y_{3HV/prop}$  values by *Burkholderia sacchari* IPT 189. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, DOI 10.1007/s11274-007-9480-x, 2007.

SHÁNCHEZ, J.R.; SCHRIPEMA, J.; SILVA, L.F.; TACIRO, M.K.; PRADELLA, J.G.C., GOMEZ, J.G.C. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoates acids (PHA<sub>mcl</sub>) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. **European Polymer Journal**, v. 39, p. 1385-1394, 2003.

SALOMONI, R. Obtenção de mutantes de *Burkholderia cepacia* deficientes no consumo de ácido 4pentenóico para produção de polihidroxicanoatos insaturados. **Dissertação de Mestrado (Biotecnologia IPT) USP**. São Paulo, 2005

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

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, p.343–350, 2002.

SENIOR, P.J. & DAWES, E.A. The regulation of poly-3-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **J. Biochem.**, v. 34, p.225-238, 1973.

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

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

SHERMAN, D.H.; WILLIAMS, M.D.; XUE, Y. PCT **Patent Application** WO97/22711, 1997.

SHIMAMURA, E.; KASUYA, K.; KOBAYASHI, G.; SHIOTANI, T.; SHIMA, Y.; DOI, Y. Physical properties and biodegradability of microbial poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate). **Macromolecules**, v. 27, p. 878-880, 1994.

SHIOTANI, T.; KOBAYASHI, G. Japanese Patent. Appl. 93049, 1993.

SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C.; OLIVEIRA, M.S.; ALTHERTHUM, F. Freeze-drying of industrial yeast strains: influence of growth conditions, cooling rates and suspending media on the viability of recovered cell. **Rev. Microbiol.** (São Paulo), v. 23, p. 117-122, 1992.

SILVA, L. F. Estudo do catabolismo de propionate em *Burkholderia sp* visando o aumento da eficiência na produção de poli-3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato (P3HB-*co*-3HV) – um plástico biodegradável. **Tese de doutoramento em microbiologia apresentada ao ICB USP**. 62 pp., 1998.

SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C. Cepa mutante de *Burkholderia sp* e método de obtenção da cepa, **Patente brasileira** PI 9806557-2, 1998.

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

SILVA, L.F.; RODRIGUES, M.F.A.; GOMEZ, J.G.C. Biodiversidade brasileira é fonte microorganismos produtores de plásticos e elastômeros biodegradáveis, ComCiência - Biodiversidade, <http://www.comciencia.br/reporagens/biodiversidade/bio15.htm>, acessado em 02/01/2007, 2001a.

SILVA, L.F.; TACIRO, M.K., MICHELIN, M.E.; CARTER, J.M.; PRADELLA, J.G.C.; GOMEZ, J.G.C. Fabrica viva de plástico biodegradável. **Ciência Hoje**, agosto v. 29, n.174, p. 69-71, 2001b.

SILVA, L.F.; TACIRO, M.K., MICHELIN, M.E.; CARTER, J.M.; PRADELLA, J.G.C.; GOMEZ, J.G.C., Process development for poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production from sugar cane bagasse hydrolysate,- **International Symposium on Biological Polyesters ISBP**, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Germany, Book of Abstracts SL 08, p. 64, 2002.

SILVA, L. F.; TACIRO, M. K. ; RAMOS, M. E. M; CARTER, J. M; PRADELLA, J. G. C.; GOMEZ, J. G. C. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugar cane bagasse hydrolysate. **J. Ind. Microbiol Biotechnol.**, Berlin e Heidelberg, v. 31, p. 245-254, 2004.

SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C.; ROCHA, R.C.S.; TACIRO, M.K.; PRADELLA, J.G.C. Produção biotecnológica de polihidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1732-1743, 2007.

SILVA-QUEIRÓZ, S.R. Estudo do metabolismo de ácidos graxos em *Pseudomonas putida* visando à modulação da composição monomérica de elastômero biodegradável. **Tese de doutoramento apresentada ao Programa de Doutorado em Biotecnologia USP-IPT-I. Butantã**, 110 pp., 2008.

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. **Journal of Bacteriology**, v.170, p. 4431-4436, 1988.

SLATER S.; HOUMIEL, K.L.; TRAN, M.; MITSKY, T.A.; TAYLOR, N.B.; PADGETTE, S.R.; GRUYS, K.J. Multiple  $\beta$ -ketothiolases mediate poly( $\beta$ -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 8, p.1979-1987,1998.

SIMON, R., U. PRIEFER, e PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Bio/Technology**, v. 1, p. 784-791, 1983.

STEINBUCHEL, A. Polyhydroxyalcanoic acids. In: BYROM, D. (Ed.). **Biomaterial. Novel materials from biological sources**. Basingstoke: Macmillan Publisher, 1991, p. 123-213.

STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H.G. Physiology and molecular genetics of poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 535-542, 1991.

STEINBÜCHEL, A. e VALENTIN, H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiol. Lett.** 128: 219-228, 1995.

STEINBÜCHEL, A. PHB and other polyhydroxyalkanoic acids. In: REHM, H.J.; REED, G. (ED.). **Biotechnology**, Germany, Weinheim: VCH Publishers, 1996.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Prog. Polym. Sci.**, v. 25, p. 1503-1555, 2000.

TAGUCHI, K.; AOYAGI, T.; MATSUSAKI, K.; FUKUI, T.; DOI, Y. Over-expression of 3-ketoacyl-ACP synthase III or malonyl-CoA-ACP transacylase gene induces monomer supply for the polyhydroxybutyrate production in *Escherichia coli* HB101. **Biotechnol. Lett.**, v. 21, p. 579-584, 1999.

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

TIMM, A. & STEINBÜCHEL, A. Cloning and molecular analysis of the poly-(3-hydroxyalkanoic acids) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Eur. J. Biochem.**, v. 209, p. 15-30, 1992.

TSUGE, T.; TANAKA, K.; SHIMODA, M.; ISHIZAKI, A. Optimization of L-Lactic Acid feeding for the production of poly-D-3-hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus*. **J Biosc Bioeng**, v. 88, n. 4, p. 404-409, 1999

TSUGE, T.; FUKUI, T.; MATSUSAKI, H.; TAGUSHI, S.; KOBAYASH, G.; ISHIZAKI, A.; DOI, Y. Molecular cloning of two (R)-specific enoyl-CoA hydratase genes from *Pseudomonas aeruginosa* and their use for polyhydroxyalkanoate synthesis. **FEMS Microbiology Letters.**, v.184, p. 193-198, 2000.

TSUGE T.; TAGUCHI, K.; TAGUCHI, S.; DOI, Y. Molecular characterization and properties of (R)-specific enoyl-CoA hydratases from *Pseudomonas aeruginosa*: metabolic tools for synthesis of polyhydroxyalkanoates via fatty acid  $\beta$ -oxidation. **Biological Macromol.**, v.. 31, p. 195-205, 2003.

TSUGE, T.; SAITO, Y.; KIKKAWA, Y.; HIRAISHI, T.; DOI, Y. Biosynthesis and compositional regulation of poly(3-hydroxybutyrate)-*co*-(3-hydroxyhexanoate) in recombinant *Rashtonia eutropha* expressing mutated polyhydroxyalkanoate synthase genes. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, p. 238-242, 2004.

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

VALENTIN, H.E.; SCHÖNENBAUM, A.; STEINBÜCHEL, A. Identification of 4-hydroxyvaleric acid as a constituent in biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 36, p. 507-514, 1992.



VALENTIN, H.E.; LEE, E.Y.; CHOI, C.Y. Identification of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacterial. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 40, p. 710-716, 1994.

VALENTIN H E; STEINBÜCHEL A Cloning and characterization of the *Methylobacterium extorquens* polyhydroxyalkanoic-acid-synthase structural gene. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 39, n. 3, p.309-317, 1993.

VALENTIN, H.E.; SCHÖNENBAUM, A. e STEINBÜCHEL, A. Identification of 5-hydroxyhexanoic acid, 4-hydroxyheptanoic acid and 4-hydroxyoctanoic acid as new constituents of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 46, p. 261-267, 1996.

VASCONCELOS, Y. Plástico de açúcar - O produto brasileiro é aperfeiçoado e ganha espaço no mercado internacional. **Pesquisa FAPESP**, n. 80, p. 68-70, out. 2002.

VOLOVA, T.G.; KALACHEVA, G.S.; STEINBÜCHEL, A. Biosynthesis of multicomponent polyhydroxyalkanoates by the bacterium *Wautersia eutropha*. **Macromol. Symp.**, v. 269, p. 1-76, 2008.

WU, S; LIU, Y.L.; CUI, B.; QU, X. H.; CHEN, G. Q. Study on decellularized porcineaortic valve/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) hybrid heart valve in sheep model. **Artif Organs.**, v. 30, n. 9. p. 690-697, 2007.

WALLEN, L.L. & DAVIS, E.N. Biopolymers of activated sludge. **Environ. Sci. Technol.**, v. 6, p. 161-164, 1972.

WALLEN, L.L.; ROHWEDDER, W.K. Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate from activated sludge. **Env. Sci. Technol.**, v. 8, p. 576-579, 1974.

WEI, X.; HU, Y. J.; XIE, W. P.; LIN, R. L.; CHEN, G.Q. Influence of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on growth and osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Journal DOI: 10.1002/jbm.a.32146**, 2008.

WILLIAMS, M.D.; RAHM, J.A.; SMITH, S. et al. Production of a polyhydroxyalkanoate biopolymer in insect cells with a modified eucaryotic fatty acid synthase **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2540-2546, 1996.

WITHOLT, B.; KESSLER, B. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.10, n.3, p. 279-285, 1999.

WU, S; LIU, Y.L.; CUI, B.; QU, X. H.; CHEN, G. Q. Study on decellularized porcineaortic valve/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) hybrid heart valve in sheep model. **Artif Organs.**, v. 30, n. 9. p. 690-697, 2007.

WU, Q.; WANG, Y.; CHEN, G.Q. Medical application or microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.**, v. 8, p.1-22, 2009.

XI, J.; ZHANG, L.; ZHENG, Z. A.; CHEN, G.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. Composite scaffolds poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)- hydroxyapatite preparation and evaluation of porous. **J Biomater Appl.** DOI: 10.1177/0885328207075425, v. 22, p. 293, 2008.

XIE, W.P. e CHEN, G.Q. Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes *phaPCJ*. **Biochemical Engineering Journal**, 2007.

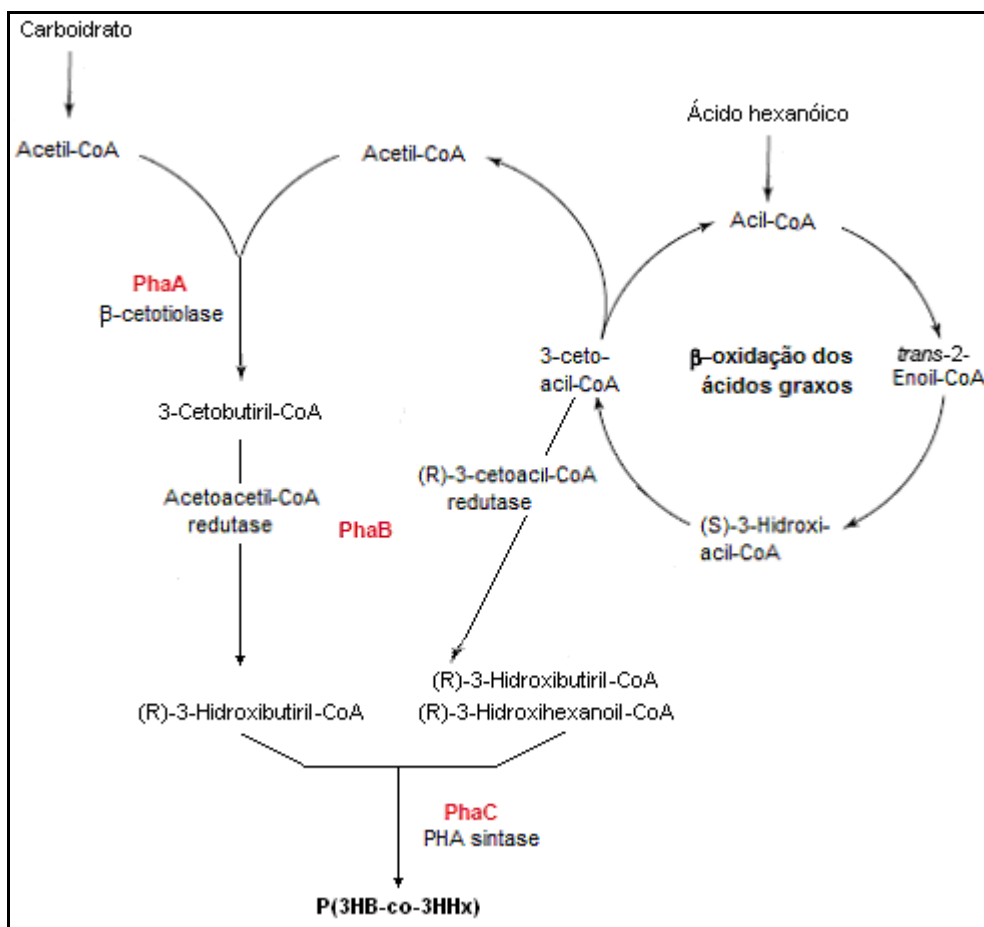
YANG, XS, ZHAO K, CHEN GQ. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates. **Biomaterials**, v. 23, n. 5, p. 1391–7, 2002.

YANG, M., ZHU, S., CHEN, Y. CHANG, Z., CHEN, G., GONG, Y., ZHAO, N., ZHAN, X. Studies on bone marrow stromal cells affinity of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Biomaterials**, v. 25, p.1365–1373, 2004.

ZHAO, W.; CHEN, G.Q. Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes *phaAB*. **Process Biochem.**, v. 42, p.1342-1347, 2007.

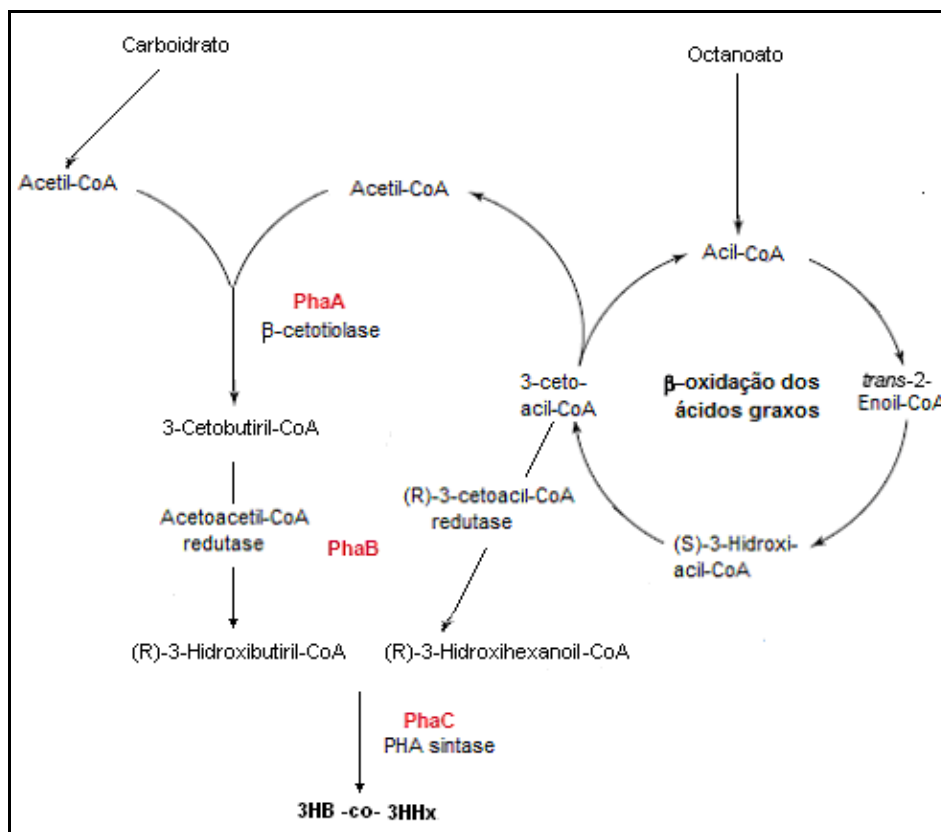
## ANEXO A –

Esquema metabólico para a produção de PHA sugerido para *Burkholderia sacchari* na presença de glicose e ácido hexanóico como fontes de carbono.



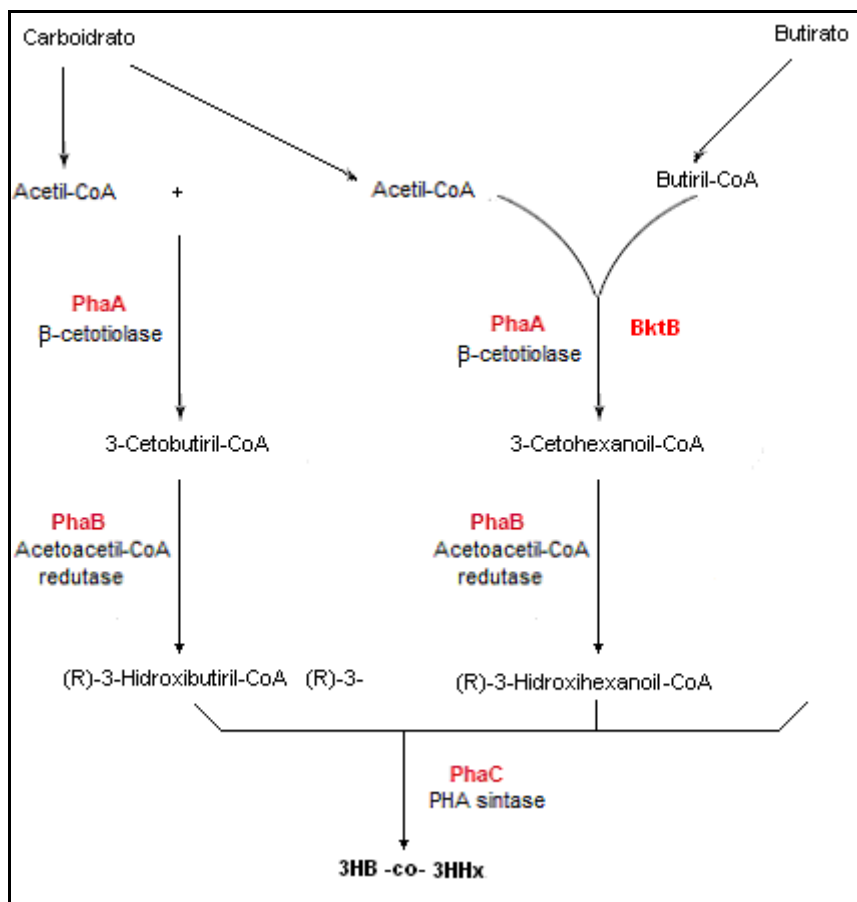
## ANEXO B –

Esquema metabólico para a produção de PHA sugerido para *Burkholderia sacchari* na presença de glicose e ácido octanóico como fontes de carbono.



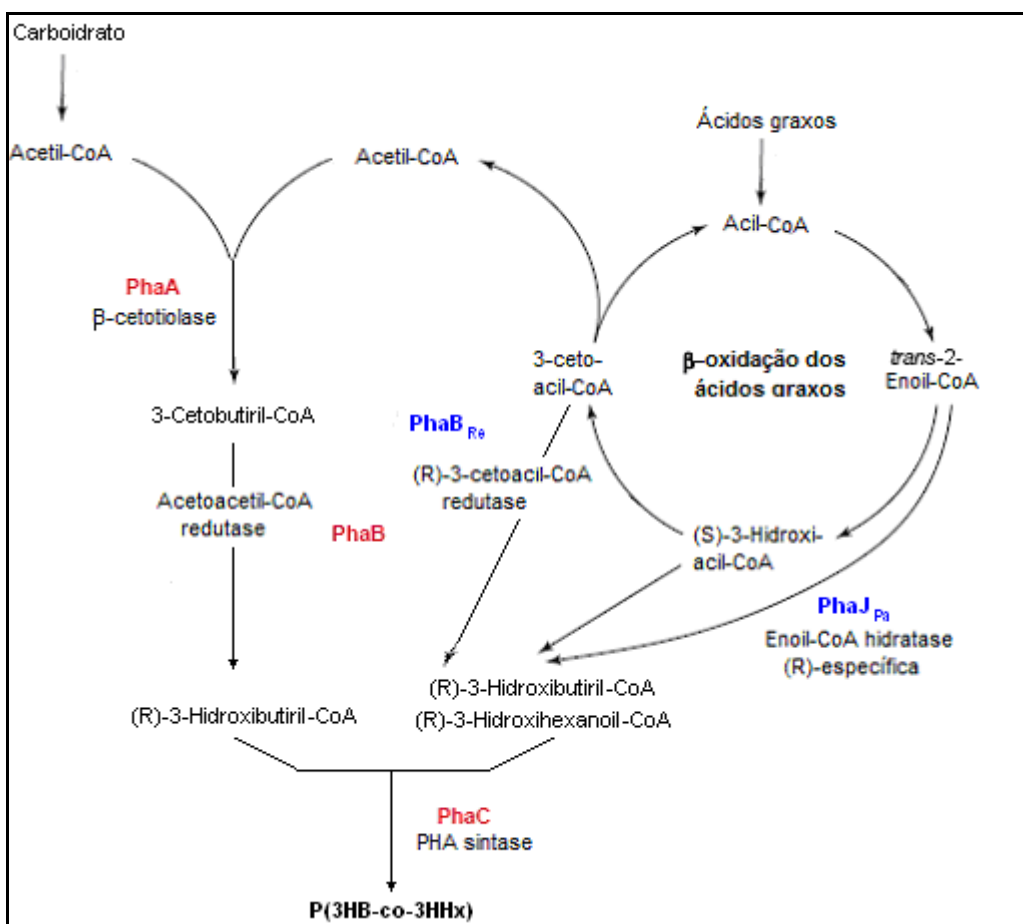
## ANEXO C –

Esquema metabólico para a produção de PHA sugerido para *Burkholderia sacchari* na presença de glicose e ácido butírico como fontes de carbono.



## ANEXO D –

Esquema metabólico para a produção de PHA sugerido para recombianes de *Burkholderia. sacchari* abrigando genes *phaB<sub>Re</sub>*, *phaJ1<sub>Pa</sub>* ou *phaJ4<sub>Pa</sub>* na presença de glicose e ácidos graxos como fontes de carbono.



## ANEXO E –

Seqüência da região do genoma de *Pseudomonas aeruginosa* contendo o gene *phaJ1*. Em azul vê-se o gene *phaJ1<sub>Pa</sub>*, marcado em amarelo vê-se o sítio ativo da enzima de restrição *Sall*.

ATCCGCAGGAAGTCGACAGGTACGTGGCCGACCCGCTGTGCGGCTTCCGCTGCAGCAACCA  
 GTTGTGGGTGGACCTGCTCGGCGGCCTGGCCGATATCACCCCGCCACCCACCTGCGGCAG  
 ATCGATGCCGGCCTGCCGCTGCTGGTCATCGGCGGCGAACGCGACCCGGTCAGCCAGGGCA  
 GGCGCCTGGGCGACCTGGCCGACGCCCTGCGCGGCGCCGGGCTGCGCCAGGTGACCCTGAA  
 GACCTATCCCGAGGCCCGTCACGAGCTGTTCAACGAGAGCAA

CCGCGACGCGGTCACCCAA  
 GACCTGATCGACTGGCTGGAACAGGCCCTGCGCCACCGCCGGGATCATTGACAAAGGAGA  
 GAACATGAGCCAGGTCCAGAACATTCCCTACGCCGAGCTAGAGGTGCGGGCAAAGGCCGAG  
 TACACCAGCAGCATCGCCGAGCGGACCTGCAGTTGTTGCGCCGAGTCTCCGGCGACCGCA  
 ACCCGGTGCACCTGGACGCCGCTACGCGGCCACCACCCAGTTCAAGGAACGCATCGCCCA  
 CGGCATGCTCAGCGGCGCCCTGATCAGCGCGGCGATCGCCACCGTGCTGCCCGGCCAGGC  
 ACCATCTATCTCGGCCAGACCCTGCGCTTACCCGTCCGGTCAAGCTCGGCGACGACCTGA  
 AGGTGCGAACTGGAAGTCTCGAGAAGCTGCCGAAGAACC

CGCGTGCGCATGGCCACGCGGGT  
 GTTCAACCAGGCAGGCAAGCAGGTGGTCGACGGCGAAGCGGAGATCATGGCGCCGGAAGAG  
 AAGCTCAGCGTCGAGCTGGCCGAAGTGCCGCCGATCAGCATCGGCTGAGCAGCCTTCCCTG  
 CCGTCCGGGCCATCCGGCCCGGCGGACTTGCCGGGCCCGCGCGCTGCTCTACCCTGTCCG  
 CTGTCTCACC

TCAATCACCAGGGATAACCGAAGCACTCCACCGCCCGAAACCCCTTACCG  
 GGAATCGGAGCCGCCATGGACCTTCGCTTGCTGTTGCTATCCCTGACCACCTTCGCCGCCG  
 GCCTGGCGGAAAGCATCCTGATCGGCATCCTGCCGCCCTGGCCGAAGACCTGCGGGTCTC  
 CATCAGCCTGGCCGGCCAGCTC

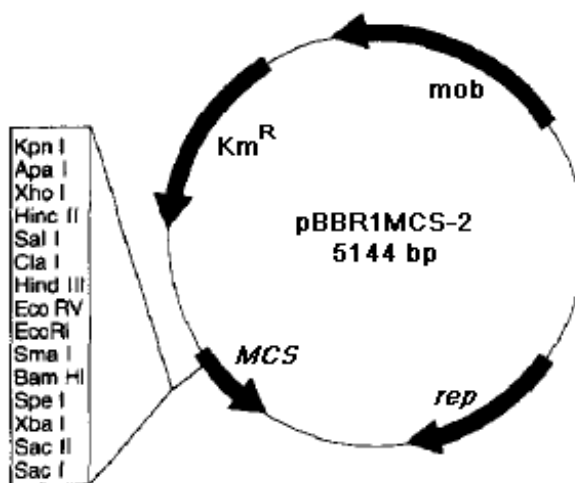


Figura E.1- Plasmídeo pBBR1MCS-2 evidenciando os sítios de restrição da região MCS

## ANEXO F –

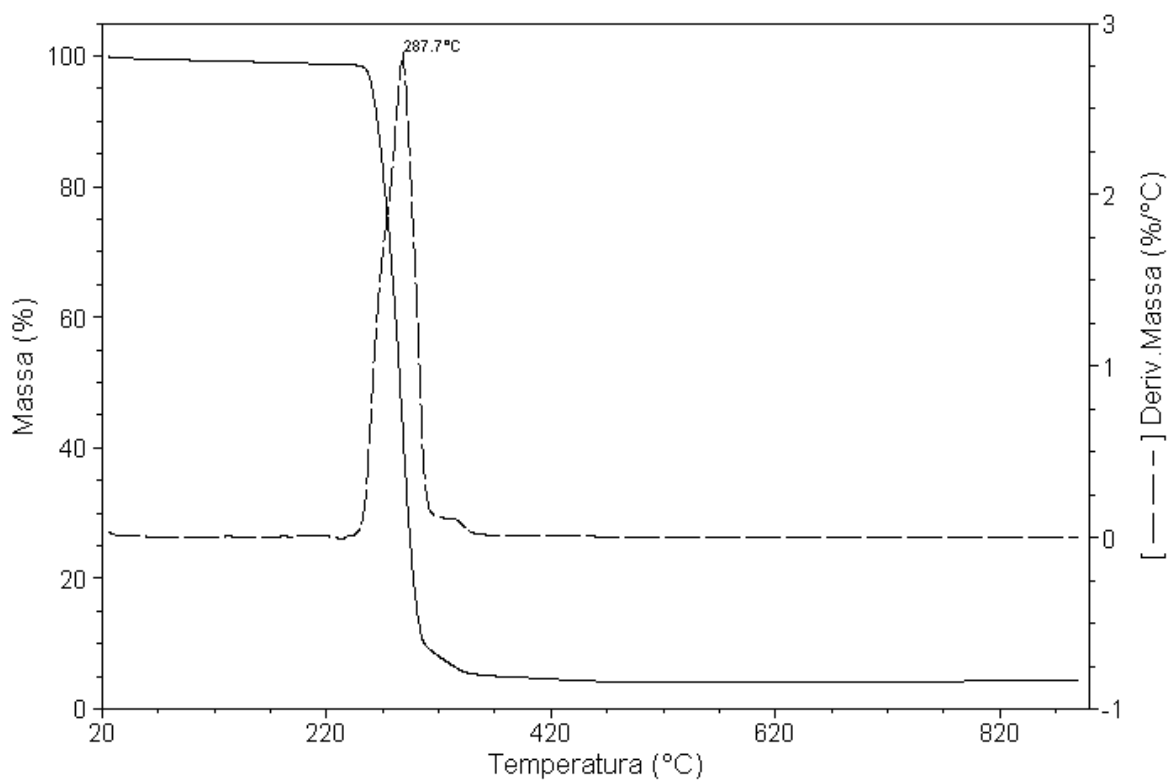
Sequência da região do genoma de *Pseudomonas aeruginosa* contendo o gene *phaJ4*. Em azul vemos o gene *phaJ4<sub>Pa</sub>*; marcado em amarelo vê-se o sítio ativo da enzima de restrição *Sall*.

GCATCATCCAGCCGGCGAACAGGAACGACAGCAGCAGCGACAGTACCAGCGCGCCGACGAT  
 GGCCCAAGATCGGCGGCATCTCCCGCGCATAGGCCATCACCCCGACCGCCGCGGCACC  
 AGCAGCAGCGGCAGGTAGCGCAGCAACGAGCCGGCCGCTCGTTGACCGGCTTGCCGACCT  
 CGCCACGCGCCAGGAAATAACCGAACAGCAGCACCAGGCCGATGATCGGACCGGGCAGCAT  
 GGGCAACAACAGAACGTTTCAGACCTGTGCCGAGCAACTGGAACAGCACCAGCCAGGTCAGA  
 CCACGAAGCAACATGGGCACCTCCAGCAAGGGCCGACCATTATGCCCAGCCCGCCGGGACA  
 TTGGCAGCTCCTCGCCTATCCATCAGTCGCAGTCGCGGCACCGCATGACGCGATATTCGC  
 CAGGCCGATGGTTTTCTTGACCCGGTCGCCAACGCGTGCTGATCTTCCTGCACCATGAGAAC  
 AACAGCCATCCTCCCGGAGGACTTATGCCATTTCGTACCCGTAGCAGCGCTCAAGGACTATG  
 TCGGCAAGGATCTCGGCCATTCGAATGGCTCACCATCGACCAGGAGCGG**GTCGAC**CAGTT  
 CGCCGAATGCACCGGCGACCACCAGTTCATCCACGTCGATCCGGAGAAGGCGGGCAAGACG  
 CCCTTCGGCGGCACCATCGCCACGGTTTTCTGTCCCTGTGCTGATCCCGAAGCTGATGG  
 AAGGCCTGCTGGTGCTTCCCGAAGGACTGAAGATGGCGGTCAACTACGGCCTCGATACGGT  
 GCGCTTCATCCAGCCGGTGCGGGTGCGCTCGCGGTCCGCCTGGGCCTGACCCTGCTCGAC  
 GTCAACGAGAAGAATCCCGGCCAGTGGCTGATCAAGGCGCGGCCACCCTGGAGATCGAAG  
 GCCAGGAGAAACCCGCCTACATCGCCGAGACCCTCAGCCTCTGCTTCGTCTGAGCCCGCCC  
 CAGCGAGCGCTGCCGTTTCGCTTGACGGCCAGGCGCCTTCGCGCCCCTCTCCCCCTTCCAA  
 AAGCCCCGCTCGCGGGGGCGCTCTGGGCCGGCAGGGAAATACCCTACTGCCAGGCAACGA  
 TTTTTCCGCCACACTGTCTCCCCTCCACCCTCGGACCGAACCCTCATCGGGAACGCCGCA  
 TGCTTCGCCCCGCCAGGTCTCTCTCGCTCTGCTCCGCCCTGGTCATCCTGCTCGCCGCTG  
 TGGCGAGGGCGAACCGCTGCTCCCGGCCGATGCGCGCCTGCCGGACGGCGCGCTATCGC  
 GGCGAGCTGGTGGACGGGCGCCTGGAAGGCCAGGGCCGGCTGGACTACGACAACGGCGCCT  
 GGTACGCCGGCCGCTTCGAGCATGGCCTGCTGCACGGCCATGGCACCTGGCAGGGCGCCGA  
 CGGCAGCCGCTACAGCGGTGGCTTCGCGGCCGGCCTGTTTCGACGGCCAGGGACGCCTGGCG



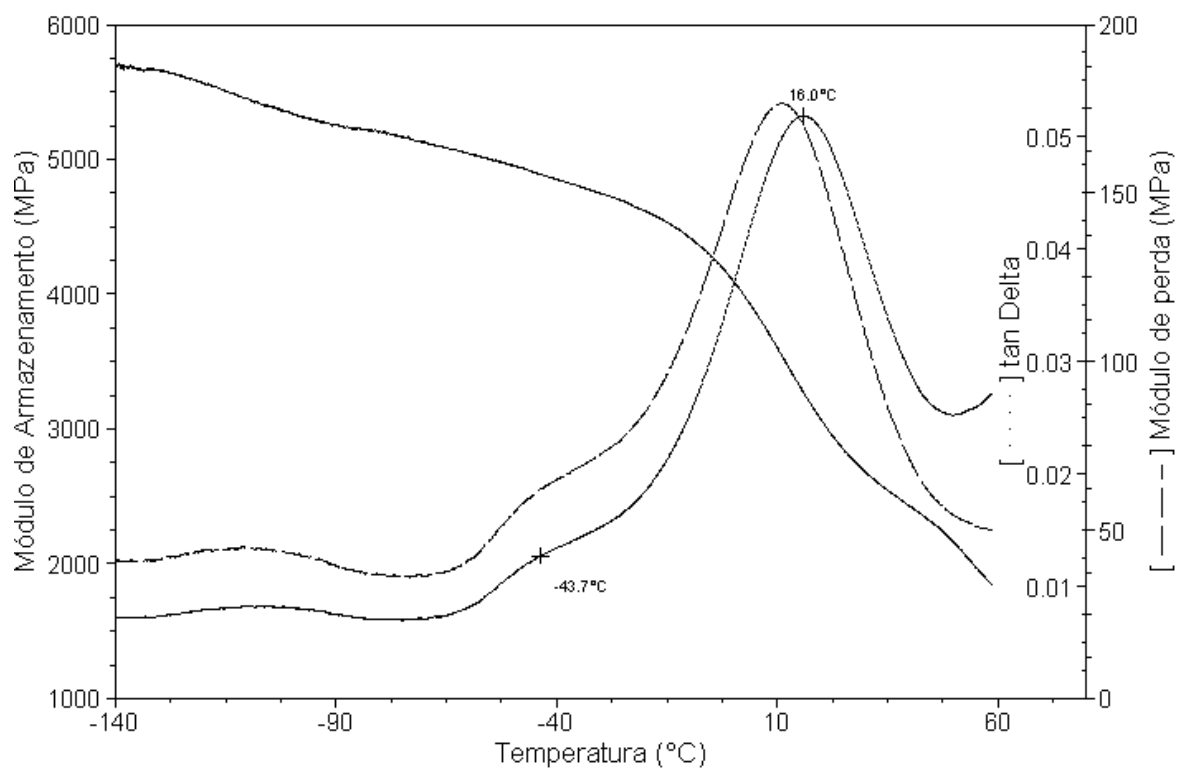
## ANEXO G –

Gráfico resultante da técnica de *Thermogravimetry analysis* (TGA).



## ANEXO H -

Gráfico resultante da técnica *Dynamical mechanical analysis* (DMA).



**ANEXO I –**

Gráfico resultante da técnica de *Differential scanning calorimetry* (DSC)

