CÉZAR VANZIN

**Estudo da biossíntese de Poli-3-
Hidroxibutirato-co-Hidroxialcanoatos de
Cadeia Média (P3HB-co-3HAMcl) a partir
de ácidos graxos livres e óleo vegetal**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/
Instituto Butantan/ IPT, para a obtenção do título
de Doutor em Biotecnologia.**

São Paulo

2008

**Estudo da biossíntese de Poli-3-
Hidroxibutirato-co-Hidroxialcanoatos de
Cadeia Média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de
ácidos graxos livres e óleo vegetal**

CÉZAR VANZIN

**Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/ Instituto Butantan/ IPT, para a obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia.**

**São Paulo
2008**

**Estudo da biossíntese de Poli-3-
Hidroxibutirato-co-Hidroxialcanoatos de
Cadeia Média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de
ácidos graxos livres e óleo vegetal**

CÉZAR VANZIN

**Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/ Instituto Butantan/ IPT, para a obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia.**

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. José Geraldo da Cruz Pradella

Co-orientador: Dr. José Gregório Cabrera Gomez

São Paulo

2008

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

© reprodução total

Vanzin, César.

Estudo da biossíntese de poli-3-hidroxibutirato-co-hidroxialcanoatos de cadeia média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de ácidos graxos livres e óleo vegetal / César Vanzin. -- São Paulo, 2008.

Orientador: José Geraldo da Cruz Pradella

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia EP/IPT/ICB/Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Plásticos biodegradáveis.

Versão do título para o inglês: Biosynthesis study of poly-3hydroxybutirate-co-hidroxyalkanoates of medium chain length (P3HB-co-3HAMcl) from fatty acids and plant oil.

Descritores: 1. Microbiologia 2. Biotecnologia 3. Biossíntese 4. Polihidroxialcanoatos 5. Polímeros microbianos 6. Óleo de soja I. Pradella, José Geraldo da Cruz II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título

ICB/SBIB/042/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em BiocTenologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Cézar Vanzin.

Título: Estudo da biossíntese de poli-3-hidroxibutirato-co-hidroxialcanoatos de cadeia média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de ácidos graxos livres e óleo vegetal.

Orientador(a): José Geraldo da Cruz. Pradella.

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa da **Tese de Doutorado** em sessão pública realizada a / /, considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

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

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e co-orientador José Geraldo da Cruz Pradella e José Gregório Cabrera Gomez, pela oportunidade de realizar este trabalho e sua valiosa ajuda na elaboração do mesmo.

Aos membros que fizeram parte da banca de qualificação Dr. Chiu Chih Ming, Dr^a. Elisabete José Vicente e Dr^a. Luiziana Ferreira da Silva que muito contribuíram com suas observações.

Aos amigos que em vários momentos foram fonte de paciência e motivação: Rafael Rocha, Sonia Regina Queiroz, Teresa Miyahira, Rose Salomoni e Sérgio Fernandes.

À todos os pesquisadores do Centro de Tecnologia de Processos e Produtos, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (CTPP/ IPT).

Aos técnicos e auxiliares do Laboratório de Microbiologia Industrial e de Fermentações Industriais que colaboraram para que este trabalho fosse realizado: Régis, Antonio, Maria de Lourdes, D. Bete, Antonio, Tiana e, principalmente, Waltinho e Aelson os quais participaram dos inúmeros ensaios.

Aos funcionários do Agrupamento de Biotecnologia pela ajuda, colaboração e amizade.

À secretária de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP-IPT-BUTANTAN pelo auxílio e ajuda.

Ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo SA - IPT, pelo suporte técnico.

Aos docentes da Biotecnologia da USP pelos conselhos e ensinamentos.

À minha família, por entender os períodos de ausência e pelo apoio, compreensão e carinho nas horas difíceis.

Aos amigos da Universidade Bandeirante de São Paulo - Profs. Roseana, Valdevino, Simone que tiveram que agüentar minhas apresentações.

Enfim, agradeço por a todas aquelas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Vanzin C. Estudo da biossíntese de poli-3-hidroxibutirato-co-hidroxialcanoatos de cadeia média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de ácidos graxos livres e óleo vegetal. [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo; 2008.

Os poli-3-hidroxialcanoatos (PHA) constituem um grupo de poliésteres acumulados por inúmeras bactérias na forma de grânulos intracelulares, que podem representar até 80% da massa seca celular. A principal vantagem dos biopolímeros sobre os materiais sintéticos é sua degradabilidade no ambiente. Matérias-primas renováveis podem ser utilizadas como fontes de carbono para a produção de polímeros biodegradáveis. Alguns polímeros têm surgido na literatura possuindo características mecânicas consideradas apropriadas tanto para uso em embalagens (flexíveis e filmes de revestimento), quanto matriz para liberação controlada de ativos a serem aplicadas nas áreas médico-farmacêutica, de alimentos e/ou agrícola. Os P3HB-co-3HAMcl são copolímeros de 3-hidroxibutirato e 3-hidroxiacil de 6 ou mais átomos de carbono os quais têm despertado interesse por apresentarem propriedades intermediárias entre HB e HAMcl, atendendo a requisitos para diversas aplicações. Várias linhagens destacam-se, porém, ensaios em frascos agitados com as linhagens *Cupriavidus* sp. e *Burkholderia* sp., utilizando como substrato ácidos graxos livres e óleo de soja, conduziram a resultados promissores. No presente trabalho, foi avaliado em princípio o comportamento de diferentes linhagens (*Cupriavidus necator* DSM545 IPT-026, *C. necator* H16 IPT-027, *Pseudomonas* sp. IPT-066, *Burkholderia cepacia* IPT-048 e *B. sacchari* IPT-189) quanto a capacidade de metabolizarem ácidos graxos livres e óleo de soja para a produção de biopolímeros e, posteriormente, em biorreator, algumas linhagens selvagens e recombinantes foram testadas na presença ou não de um inibidor da β -oxidação (ácido acrílico). Experimentos em frascos com agitação, mostraram valores de PHA em cerca de 70% da biomassa total com cerca de 5% de monômeros de cadeia média permitindo selecionar as linhagens *Burkholderia cepacia* IPT-048 e *Cupriavidus necator* DSM545 para os ensaios seguintes. Experimentos em biorreator mostraram que, as interações entre o substrato, co-substrato e o inibidor de β -oxidação influenciaram na quantidade de P3HB/3HAMcl formado quando utilizado a linhagem *Burkholderia cepacia* IPT-048, contribuindo para a síntese de 3HV e 3HHx. Quando disponibilizado somente o óleo de soja (5g/L) foi obtido uma quantidade de HHx com cerca de 6 mol% com a linhagem *Burkholderia cepacia*. Nesta mesma condição foi verificado que após um determinado período também se evidenciava a monômero HV em uma quantidade de 0,20 mol%. Adicionando o ácido acrílico (0,18 g/L) foi obtido 1,50 mol% de HHx, entretanto, diferentemente da condição anterior a quantidade de HV variou de 0,91 a 2,77 mol%. Um conclusão para a condição óleo de soja e ácido acrílico é que, a linhagem esteja utilizando o ácido acrílico como fonte de carbono, ou seja, a formação de acrilil-CoA com conseqüente formação de cadeias com 5 carbonos. Resultados semelhantes foram obtidos quando analisado o polímero extraído, ou seja, após o etapa de extração com clorofórmio verificou-se que a quantidade variou de 1,60 a 2,14 mol%. Quando adicionado um co-substrato na fase de acúmulo (ácido caprílico) e ausência do ácido acrílico não houve o aumento de HHx em relação à variável anterior, tanto é que, a quantidade do monômero atingiu cerca de 0,50 mol%. Nesta condição a

presença do ácido acrílico também não contribuiu para a síntese de HV, não tendo sido observado monômeros durante os ensaios. Na fase seguinte, no qual trabalhamos com as linhagens *Cupriavidus necator* e uma recombinante (*Cupriavidus necator::phaB*), verificou-se que a quantidade obtida de HHx foram semelhantes, cerca de 0,30 mol%. Em nossa hipótese, acreditamos que o aumento do número de cópias do gene *phaB* poderia contribuir para o aumento do fluxo de carbono no sentido de elevar a quantidade tanto de 3HB quanto de outros monômeros. Como nos ensaios em frascos com agitação os substratos ácido capróico e caprílico também se destacaram quando disponibilizado 2g/L e o óleo de soja em uma concentração de 5g/L, analisamos a linhagem recombinante com óleo de soja e ácido caprílico com 5 g/L. A insistência na utilização do ácido caprílico baseava-se no fato da possibilidade da(s) linhagem(s) oxidarem parte dos ácidos graxos para a produção de células e energia e, no momento que houvesse a limitação de nitrogênio, iniciasse a fase de acúmulo clivando dois carbonos para a produção de acetil-CoA e o restante da cadeia fosse armazenada na forma de 3HHx. Com a disponibilização do ácido caprílico não houve a obtenção de monômeros, pois *Cupriavidus necator* e *Cupriavidus necator::phaB* tiveram sua capacidade replicativa inibida pelo substrato. Nos frascos adicionados de óleo de soja com e sem o ácido acrílico o comportamento foi o contrário aos observados com ácido caprílico. Durante o período de incubação, para ambas as linhagens, a quantidade de PHA, e consequentemente o percentual de 3HB na massa seca celular, foi de 22,95% (100 mol%) e 25,90% (100 mol%) na 28ª e 24ª horas, respectivamente. Nesta condição, na linhagem recombinante, também foi observado a presença de HHx entre a 32ª e 49ª hora com uma quantidade máxima de 1,10 mol%. A partir dos resultados pode-se concluir que a *Burkholderia cepacia* é considerada uma linhagem promissora para a obtenção de HHx e HV disponibilizando óleo de soja com e sem o ácido acrílico, respectivamente. Já na linhagem *Cupriavidus necator* o aumento do número de cópias do gene *phaB*, aparentemente, não contribuiu para o aumento do rendimento de 3HHx, porém, outras variáveis manipuláveis serão propostas para a confirmação.

Palavras-chave: Polihidroxialcanoatos (PHA), P3HB-co-3HAMcl, *Cupriavidus necator* DSM545, *Burkholderia cepacia* IPT-048, acetoacetil-CoA redutase (*phaB*), óleo de soja, ácidos graxos.

ABSTRACT

Vanzin C. Biosynthesis study of poly-3hydroxybutyrate-co-hydroxyalkanoates of medium chain length (P3HB-co-3HAMcl) coming from fatty acids and plant oil. [Ph.D Thesis]. Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo; 2008.

The poly-3-hydroxyalkanoates (PHA) are a group of polyesters accumulated for several bacteria in the intracellular granule form, that can represent up to 80% of the dry mass cellular. The main advantage of the biopolymers on the synthetic materials is its degradation in the environment. Recyclable raw materials can be used as carbon sources for the production biodegradable polymer. Some polymers have appeared in literature having mechanical characteristic considered appropriate in such a way for use in packings (flexible and covering films), how base for controlled release of asset to be applied in the pharmacological-medical and foods area. The P3HB-co-3HAMcl are 3-hydroxybutyrate copolymers and 3-hydroxyacyl of 6 or more carbon atoms which has aroused interest for to present intermediate properties between HB and HAMcl, having taken care of the requirements for diverse applications. Some strains are distinguished, however, assays in bottles agitated with the *Cupriavidus* sp. and *Burkholderia* sp. strains, using as substratum greasy free acid and soy oil, had led the promising results. In the present work, first, was evaluated the behavior of different strains (*Cupriavidus necator* DSM545 IPT-026, *C. necator* H16 IPT-027, *Pseudomonas* sp. IPT-066, *Burkholderia cepacia* IPT-048 and *B. sacchari* IPT-189) how much to metabolizer capacity of free fatty acids and soybean oil for the production of biopolymers and, later, in tank bioreactor some wild strains and recombinant had been tested together or not of an inhibitor of the β -oxidation (acid acrylic). Experiments in bottles with agitation, had shown values of PHA in about 70% of the total biomass with about 5% monomers chain average allowing to select the *Burkholderia cepacia* IPT-048 and *Cupriavidus necator* DSM545 strains for the following assays. Experiments in tank bioreactor had shown that, the interactions between the substratum, co-substratum and the inhibitor of β -oxidation had influenced in the amount of formed P3HB/3HAMcl when used the *Burkholderia cepacia* IPT-048 strains, contributing for the synthesis of 3HV and 3HHx. When used only the soybean oil (5g/L) was gotten an amount of HHx with about 6 mol% with *Burkholderia cepacia* strains. In this same condition was verified that after some determined period also proved monomer HV in an amount of 0.20 mol%. Adding the acid acrylic (0.18 g/L) were gotten 1.50 mol% of HHx, however, differently of the previous condition the amount of HV varied of 0.91 - 2.77 mol%. A conclusion for the condition soybean oil and acrylic acid is that, the strains is using the acrylic fatty acid as carbon source, or either, the formation of acrylil-CoA with consequent formation of chains with 5 carbons. Similar results had been gotten when analyzed extracted polymer, or either, after the stage of extraction with chloroform was verified that the amount varied of 1.60 - 2.14 mol%. When added to a co-substratum in the phase of accumulation (caproic fatty acid) and absence of the acrylic acid, it did not have the increase of HHx in relation to the previous variable, as much that, the amount of monomer reached about 0.50 mol%. In this condition, the presence of the acrylic fatty acid also did not contribute for the HV synthesis, not having been observed monomers during the assays. In the following phase, in which we work with *Cupriavidus necator* and a recombinant (*Cupriavidus necator::phaB*) strains, was verified that the gotten amount of HHx had been similar, about 0.30 mol%. Our hypothesis, we believe that the increase of the number of copies of the

gene *phaB* could contribute for the increase of the carbon flow in the direction to raise the amount of 3HB how much of other monomers. As in the assays in bottles with agitation substrat caproic and caprylic fatty acids they had been distinguished also when availabled 2g/L and the soybean oil of in a concentration of 5g/L, we analyze the strains recombinant with soybean oil and caprylic fatty acid with 5 g/L. The insistence in the use of the caprylic fatty acid was based on the fact of the possibility of strains to oxidate part of fatty acids for the production of cells and energy and, at the moment that had the nitrogen limitation, to begin the accumulation phase dividing two carbons for the production of acetyl-CoA and the remain of the chain was stored in the form of 3HHx. The caprylic fatty acid disponibility it did not have the monomer attainment, therefore, *Cupriavidus necator* and *Cupriavidus necator::phaB* had its replied inhibited capacity by the substratum. In the added soybean oil bottles with and without the acrylic fatty acid the behavior it was the opposite to the observed with caprylic fatty acid. During the incubation period, for both the strains, the amount of PHA, and consequently, the percentage of 3HB in the dry mass cellular was of 22.95% (100 mol%) and 25.90% (100 mol%) in 28^a and 24^a hours, respectively. In this condition, in the recombinant strains, also was observed the presence of HHx between 32^a and 49^a hour with a maxim amount of 1.10 mol%. From the results it can be concluded that the *Burkholderia cepacia* is considered a promising strains for the attainment of HHx and HV allowing that soybean oil with and without the acrylic fatty acid, respectively. The increase in the number of copies of the gene *phaB* in *Cupriavidus necator* apparently did not contribute with the increase of 3HHx efficiency however, other handling variables will be proposed for confirmation.

Key-words: Polyhydroxyalkanoatos (PHA), P3HB-co-3HAMcl, *Cupriavidus necator* DSM545, *Burkholderia cepacia* IPT-048, acetoacetyl-CoA redutase (*phaB*), soybean oil, fatty acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A: Estrutura geral de poli-3-hidroxialcanoatos (Ojumo <i>et al.</i> , 2004; Steinbuchel & Valentin, 1995).	24
Figura 1B: Célula bacteriana contendo grânulos de PHA (Rita C. Paro Alli - IPT)	28
Figura 2: A) Microcápsulas de PHA contendo ativo (Pereira <i>et al.</i> , 2002). B) Materiais produzidos com plástico biodegradável (COPERSUCAR).	33
Figura 3: Vias de biossíntese de P(3HB) em <i>Cupriavidus necator</i> e <i>Rhodospirillum rubrum</i> (Steinbüchel, 1996).	36
Figura 4: Reação de hidrólise de triacilglicerol.	43
Figura 5: Esquema da oxidação de ácido graxos (Di Russo <i>et al.</i> , 1999)	45
Figura 6: Plasmídeo pJM9131 abriga o operon <i>phaCAB</i> (Kidwell <i>et al.</i> , 1995)	70
Figura 7: Vetor pBBR1MCS-2 (Kovach <i>et al.</i> , 1995)	71
Figura 8: Construções dos plasmídeos pJM9131 Δ <i>phaA</i> e pJM9131 Δ <i>phaCA</i>	72
Figura 9: Construção e transferência do plasmídeo pJM9131 Δ <i>phaCA</i> para pBBR1MCS-2	72
Figura 10: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Pseudomonas</i> spp. IPT-066 durante 48h e 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de ácido caprílico (C6)	83
Figura 11: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Pseudomonas</i> spp. IPT-066 durante 48h e 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de ácido caprílico (C8).	84
Figura 12: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Pseudomonas</i> spp. IPT-066 durante 48h e 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de ácido palmítico (C16).	86
Figura 13: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Pseudomonas</i> spp. IPT-066 durante 48h e 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de óleo de soja (OS).	86
Figura 14: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> spp. H16 IPT-027 durante 48h e 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de ácido caprílico (C6) e ácido acrílico nas concentrações de 0, 10 e 30 mM.	87

Figura 15: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> spp. H16 IPT-027 durante 48h e 96h em meio mineral acrescentado respectivamente de 2g/L de ácido caprílico (C8) e ácido acrílico nas concentrações de 0, 10 e 30 mM.	89
Figura 16: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> spp. H16 IPT-027 durante 48h e 96h em meio mineral acrescentado respectivamente de 2g/L de ácido palmítico (C16) e ácido acrílico nas concentrações de 0, 10 e 30 mM.	90
Figura 17: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> spp. H16 IPT-027 durante 48h e 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de óleo de soja (OS) e ácido acrílico nas concentrações de 0, 10 e 30 mM.	91
Figura 18: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> spp. DSM545 IPT-026 durante 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de ácido capróico (C6).	94
Figura 19: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> spp. DSM545 IPT-026 durante 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de ácido capróico (C6) e ácido acrílico nas concentrações de 2,5 mM.	95
Figura 20: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> spp. DSM545 IPT-026 durante 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de óleo de soja (OS).	97
Figura 21: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> spp. DSM545 IPT-026 durante 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de óleo de soja (OS) e ácido acrílico na concentração de 2,5 mM.	98
Figura 22: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Burkholderia cepacia</i> (IPT-048) durante 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de ácido capróico (C6).	101
Figura 23: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Burkholderia cepacia</i> (IPT-048) durante 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de ácido capróico (C6) juntamente com ácido acrílico na concentração de 2,5 mM.	102
Figura 24: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo <i>Burkholderia cepacia</i> (IPT-048) durante 96h em meio mineral acrescentado de 2g/L de óleo de soja (OS).	105
Figura 25: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Burkholderia cepacia</i> (IPT-048) durante 96h em meio mineral acrescentado durante 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de óleo de soja (OS) e ácido acrílico em concentração de 2,5 mM.	105

Figura 26: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Burkholderia sachari</i> IPT-189 durante 96h em meio mineral acrescentado respectivamente de 2g/L de ácido caprílico (C6) e ácido acrílico nas concentrações de 10,0 e 30,0 mM.	109
Figura 27: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Burkholderia sachari</i> IPT-189 durante 96h em meio mineral acrescentado respectivamente de 2g/L de ácido caprílico (C8) e ácido acrílico nas concentrações de 10,0 e 30,0 mM.	110
Figura 28: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Burkholderia sachari</i> IPT-189 durante 96h em meio mineral acrescentado respectivamente de 2g/L de ácido palmítico (C16) e ácido acrílico nas concentrações de 10,0 e 30,0 mM.	110
Figura 29: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de <i>Burkholderia sachari</i> IPT-189 durante 96h em meio mineral acrescentado respectivamente de 2g/L de óleo de soja (OS) e ácido acrílico nas concentrações de 10,0 e 30,0 mM.	111
Figura 30: Média dos resultados da linhagem <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 em meio mineral durante 48 horas a 30 °C/ 300 rpm adicionado de 5 g/L de óleo de soja em biorreator.	115
Figura 31: Percentual molar médio dos polímeros obtidos por <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 em meio mineral durante 48 horas a 30 °C/ 300 rpm iniciado com 5 g/L de óleo de soja em biorreator.	115
Figura 32: Cultivo da linhagem <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 em meio mineral durante 48 horas a 30 °C e 300 rpm adicionado de óleo de soja 5g/L.	117
Figura 33: Média da multiplicação celular de <i>B. cepacia</i> IPT-048 em meio mineral durante 48 horas a 30 °C e 300 rpm adicionado de óleo de soja 5g/L:	117
Figura 34: Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 dos processos iniciado com 5 g/L de óleo de soja e adicionado na 10 ^a hora de cultivo o ácido acrílico 2,5mM.	120
Figura 35: Percentual molar médio dos polímeros obtidos durante a multiplicação de <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 dos processos iniciado com 5 g/L de óleo de soja e adicionado na 10 ^a hora de cultivo o ácido acrílico 2,5mM.	120
Figura 36: Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 dos processos iniciado com 5 g/L de óleo de soja e adicionado na 10 ^a hora de cultivo o ácido acrílico 2,5mM.	123

Figura 37: Cultivo da linhagem <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 em meio mineral durante 48 horas a 30 °C e 300 rpm adicionado de óleo de soja 5g/L e ácido acrílico 2,5mM.	124
Figura 38: Média dos polímeros contidos nas células de <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 dos processos iniciado com 5 g/L de óleo de soja e adicionado na 10ª hora de cultivo o ácido acrílico 2,5mM.	125
Figura 39: Percentual molar médio dos polímeros contidos nas células de <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 dos processos iniciado com 5 g/L de óleo de soja e adicionado na 10ª hora de cultivo o ácido acrílico 2,5mM.	125
Figura 40: Média do resultados dos polímeros extraídos com clorofórmio produzidos por <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 dos processos iniciado com 5 g/L de óleo de soja e adicionado na 10ª hora de cultivo o ácido acrílico 2,5 mM.	127
Figura 41: Percentual molar médio de polímeros extraídos com clorofórmio produzidos por <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 dos processos iniciado com 5 g/L de óleo de soja e adicionado na 10ª hora de cultivo o ácido acrílico 2,5 mM.	127
Figura 42: Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 nos processos iniciados com 5 g/L de óleo de soja e adicionados na 10ª hora de cultivo o 5 g/L de ácido capróico (C6).	129
Figura 43: Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 dos processos iniciados com 5 g/L de óleo de soja e adicionados na 10ª hora de cultivo o 5 g/L de ácido capróico (C6).	130
Figura 44: Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 dos processos iniciados com 5 g/L de óleo de soja e adicionados na 10ª hora de cultivo o 5 g/L de ácido capróico (C6).	130
Figura 45: Cultivo da linhagem <i>B. cepacia</i> IPT-048 em meio mineral durante 48 horas a 30 °C e 400 rpm adicionado de óleo de soja e ácido capróico (5g/L).	131
Figura 46: Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 nos processos iniciados com 5 g/L de óleo de soja e adicionados na 10ª hora de cultivo 5 g/L de ácido capróico (C6) e ácido acrílico 2,5 mM.	133
Figura 47: Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 nos processos iniciados com 5 g/L de óleo de soja e adicionados na 10ª hora de cultivo 5 g/L de ácido capróico (C6) e ácido acrílico 2,5 mM.	134

Figura 48: Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 nos processos iniciados com 5 g/L de óleo de soja e adicionados na 10 ^a hora de cultivo 5 g/L de ácido capróico (C6) e ácido acrílico 2,5 mM.	135
Figura 49: Proposta de vias metabólicas envolvidas na síntese de P3HB/3HAMcl <i>phaG</i> : 3-hidroxiacil-ACP transferase; <i>phaJ</i> : enoil –CoA hidratase adaptado de Fukui <i>et al.</i> ,1998 e Sudesh <i>et al.</i> , 2000.	137
Figura 50: Plasmídeos pJM9131 e pJM9131Δ <i>phaA</i>	139
Figura 51: Fase 1: Eletroforese de DNA plasmidial extraído de clones bacterianos nos quais foram inseridos os produtos da ligação de pJM9131Δ <i>phaA</i> ; pJM9131Δ <i>phaCA</i> digeridos com <i>StuI</i> , <i>EcoRV</i> e <i>HindIII</i> .	141
Figura 52: Fase 2: Eletroforese de DNA plasmidial extraído de clones bacterianos nos quais foram transferidos o produto da ligação de pJM9131Δ <i>phaCA</i> digeridos com <i>HindIII</i> para o vetor pBBR1MC-2 e, posteriormente, para a linhagem <i>Cupriavidus necator</i> DSM545 IPT-026.	143
Figura 53A: Consumo de nitrogênio, concentração de biomassa total (Xt) e biomassa residual (Xr) para os ensaios utilizando as linhagens <i>C. necator</i> tipo IPT026 (A) e <i>C. necator</i> IPT026:: <i>phaB</i> (B) em biorreator.	145
Figura 53B: Consumo de nitrogênio, concentração de biomassa total (Xt) e biomassa residual (Xr) para os ensaios utilizando as linhagens <i>C. necator</i> tipo IPT026 (A) e <i>C. necator</i> IPT026:: <i>phaB</i> (B) em biorreator.	146
Figura 54: Consumo de óleo vegetal e produção da PHA para os ensaios utilizando as linhagens <i>C. necator</i> tipo IPT026 e <i>C. necator</i> IPT026:: <i>phaB</i> em biorreator.	148
Figura 55: Produção de 3HB, 3HHx e PHA total para os ensaios utilizando as linhagens <i>C. necator</i> tipo IPT026 (A) e <i>C. necator</i> IPT026:: <i>phaB</i> (B) em biorreator.	149
Figura 56: Percentual molar de 3HB, 3HHx e PHA total para os ensaios utilizando as linhagens <i>C. necator</i> tipo IPT026 (A) e <i>C. necator</i> IPT026:: <i>phaB</i> (B) em biorreator.	150
Figura 57: Eletroforese confirmatória de DNA plasmidial extraído de clones bacterianos <i>Cupriavidus necator</i> DSM545 controle e <i>Cupriavidus necator</i> DSM545 IPT-026:: <i>phaB</i> antes e depois do período de incubação em frascos agitados por 96 horas.	152

Figura 58A: Análise comparativa da multiplicação das linhagens <i>Cupriavidus necator</i> e <i>Cupriavidus necator::phaB</i> durante o período de incubação de 48 horas a 30 °C/ 200 rpm em ácido caprílico 5g/L.	154
Figura 58B: Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{x_{m\acute{a}x}}$).	155
Figura 59: Análise comparativa da multiplicação das linhagens <i>Cupriavidus necator</i> e <i>Cupriavidus necator::phaB</i> durante o período de incubação de 48 horas a 30 °C/ 200 rpm em ácido caprílico 5g/L e ácido acrílico 2,5mM.	155
Figura 60A: Análise comparativa das linhagens <i>Cupriavidus necator</i> IPT-026 controle e <i>Cupriavidus necator::phaB</i> durante o período de incubação de 48 horas a 30 °C/ 200 rpm em óleo de soja 5g/L.	156
Figura 60B: Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{x_{m\acute{a}x}}$).	157
Figura 61A: Análise comparativa das linhagens <i>Cupriavidus necator</i> IPT-026 controle e <i>Cupriavidus necator::phaB</i> durante o período de incubação de 48 horas a 30 °C/ 200 rpm em óleo de soja 5g/L adicionado de ácido acrílico 2,5mM.	160
Figura 61B: Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{x_{m\acute{a}x}}$).	160

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físicas e térmicas de alguns polímeros comuns (Doi, 1990)	50
Tabela 2 - Ágar nutriente (AN)	60
Tabela 3 - Caldo nutriente (CN)	60
Tabela 4 - Composição dos meios de cultura utilizados	60
Tabela 5 - Solução de Elementos Traços	61
Tabela 6 – Plano para o cultivo em frascos agitados a 200 rpm/ 30°C contendo 2,0 g/L de substrato com ou sem ácido acrílico	62
Tabela 7 – Fonte de carbono (ácido graxo e/ óleo de soja) utilizados nos ensaios em frascos agitados e/ou biorreator	63
Tabela 8 - Concentrações de ácido acrílico utilizado nos diferentes ensaios	63
Tabela 9 - Composição de óleos vegetais	64
Tabela 10 - Meio Luria Bertani	66
Tabela 11 - Plano para o cultivo de <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048 em biorreator contendo 5,0 g/L de substrato(s) com ou sem ácido acrílico	75
Tabela 12 - Plano para o cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> IPT-026 e <i>C. necator</i> IPT-026:: <i>phaB</i> em biorreator contendo 5,0 g/L de substrato	76
Tabela 13 - Plano para o cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> IPT-026 e <i>C. necator</i> IPT-026:: <i>phaB</i> para a confirmação da presença do plasmídeo construído em frascos agitados contendo 5,0 g/L de substrato	76
Tabela 14 – Médias dos resultados obtidos do cultivo de <i>Pseudomonas</i> IPT-066 em meio mineral contendo, respectivamente, 2 g/L de diferentes ácidos graxos livres e óleo de soja	84
Tabela 15 – Médias dos resultados obtidos do cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> H16 IPT-027 em meio mineral contendo, respectivamente, 2 g/L de diferentes ácidos graxos livres e óleo de soja	88
Tabela 16 – Variáveis testadas para o cultivo em frascos agitados à 30°/ 200 rpm de <i>Cupriavidus necator</i> DSM545 IPT-026 em meio mineral contendo, respectivamente, 2 g/L de diferentes ácidos graxos livres e óleo de soja	93

Tabela 17 – Médias dos resultados obtidos do cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> DSM545 IPT-026 em meio mineral contendo, respectivamente, 2 g/L de diferentes ácidos graxos livres e óleo de soja	96
Tabela 18 – Variáveis testadas para o cultivo em frascos agitados à 30°/ 200 rpm de <i>Burkholderia cepacia</i> (IPT-048) em meio mineral contendo 2 g/L de diferentes ácidos graxos livres e óleo de soja.	100
Tabela 19 – Variáveis testadas para o cultivo em frascos agitados à 30°/ 200 rpm de <i>Burkholderia sachari</i> IPT-189 em meio mineral contendo 2 g/L de diferentes ácidos graxos livres e óleo de soja.	107
Tabela 20 – Médias dos resultados obtidos do cultivo de <i>Burkholderia sachari</i> IPT-189 em meio mineral contendo 2 g/L de diferentes ácidos graxos livres e óleo de soja.	108
Tabela 21 - Plano para o cultivo em frascos agitados contendo 5,0 g/L de substratos com ou sem ácido acrílico	153
Tabela 22 - Médias dos resultados obtidos no cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> IPT-026 e <i>C. necator</i> IPT-026:: <i>phaB</i> em meio mineral contendo 5 g/L de óleo de soja por 48h a 30°/ 200rpm	158
Tabela 23 - Médias dos resultados obtidos no cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> IPT-026 e <i>C. necator</i> IPT-026:: <i>phaB</i> em meio mineral contendo 5 g/L de óleo de soja adicionado de ácido acrílico 2,5mM por 48h a 30°/ 200rpm	159

LISTA ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μ PHA - velocidade específica da formação do produto PHA (g/L)

μ S - velocidade específica do consumo de substrato (g/L)

μ Xr - velocidade específica de crescimento da biomassa residual (h⁻¹)

μ PHB - Velocidade específica de formação de PHB (h⁻¹)

AC4 - área de 3HB

AFM – análise de fluxo metabólico

AN - agar nutriente

C16 - ácido palmítico ou ácido decahexanóico

C6 – ácido capróico ou ácido hexanóico

C8 – ácido caprílico ou ácido octanóico

CN - meio caldo nutriente

CoA - coenzima A

DO – densidade óptica

E. coli S17-1 - Used for mating experiments (ATCC 47055)

EcoRV – *Escherichia coli* (seqüência 5'-...G A T[^]A T C...-3')

Escherichia coli XLI Blue – cepa com deficiência de um gene *lacZ* Δ M15, que codifica uma β -galactosidase defectiva útil para o teste de α -complementação.

h - hora

HindIII – *Haemophilus influenzae* R_d (seqüência 5'-A[^]A G C T T-3')

HPLC - Cromatografia líquida de alta performance

IPTG/X-Gal – IPTG (isopropil-tio- β -D-galactosídeo) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -Dgalactosídeo)

L - litro

MB2 - massa do ácido benzóico

MC4 - massa de P3HB

min - minutos

mL - mililitro

MM - meio mineral

MMFK - meio mineral adicionado de frutose e canamicina

MMS - metil-metano sulfonato

MSC- massa seca celular

NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo – forma oxidada
NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo – forma reduzida
NADP⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – forma oxidada
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – forma reduzida
OS – óleo de soja
P3H4PE - Poli-3-Hidroxi-4-Pentenoato
P3HB - Poli-3-Hidroxibutirato (3HB)
P3HB-co-3HHx - Poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato
P3HB-co-HV - Poli-3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato
P3HHep – poli-3-hidroxiheptanóico (3HHep)
P3HHx – poli-3-hidroxihexanóico (3HHx)
P3HO - poli-3-hidroxi octanoato (3HO)
P3HV – poli-3-hidroxivalérico (3HV)
pBBR1MCS-1 - Broad-host-range cloning vector
PET – Polietilenotereftalato
PGA - Poligliconato
PHA - Polihidroxialcanoato
phaA - β-cetotiolase (acetil-CoA acetiltransferase),
phaB - acetoacetil-CoA redutase
phaC - PHA sintase
phaG - 3-hidroxiacil-ACP transferase
phaJ - enoil –CoA hidratase
PHA_{mcl} - Polihidroxialcanoato de cadeia média
PHA_{scl} - Polihidroxialcanoato de cadeia curta
pJM9131 - Contains the pha pathway from *R. eutropha*
PLA - Polilactato
PLA - Polilactato
PM - peso molecular do polímero
PP - Polipropileno
R. eutropha H16 - PHB-4 *phaC* negative mutant (DSM 541)
RMN - Ressonância magnética nuclear
rpm - rotações por minuto
seg/s - segundos

Stul (Eco147I) – *Escherichia coli* (seqüência 5'-A G G[^]C C T-3')

UFC - Unidade Formadora de Colônia

X_r - Concentração de biomassa total (g/L)

X_t - Concentração de biomassa residual (g/L)

Y_{HA/S} – fator de conversão de substrato em PHA

Y_{P3HB|S} – fator de conversão de substrato em P3HB

Y_{X/S} - fator de conversão de substrato em biomassa

Y_{Xr|S} – Fator de conversão de substrato em biomassa residual (g/g)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	27
2.1	Polihidroxialcanoatos (PHAs).....	27
2.2	Características dos PHAs	28
2.2.1	O mercado para os plímeros biodegradáveis	31
2.3	Aplicações do polímero biodegradável	31
2.4	Biossíntese de PHAs	35
2.4.1	Biossíntese de polihidroxialcanoatos de cadeia curta (PHAscl)	35
2.4.2	Biossíntese de polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHAmcl)	36
2.5	Polihidroxialcanoatos a partir de substratos não-relacionados	37
2.6	Características das enzimas envolvidas na biossíntese de polihidrobutilatos	38
2.6.1	<i>phaA</i> (β -Cetotiolase)	38
2.6.2	<i>phaB</i> (Cetoacetil-CoA redutase NADPH dependente)	40
2.6.3	<i>phaC</i> (PHA sintase).....	40
2.7	Substratos relacionados e não relacionados	42
2.7.1	Ácidos graxos	42
2.7.2	Ácidos graxos insaturados	46
2.8	Produção industrial de PHA	48
2.9	Engenharia metabólica no processo de produção de PHA.....	56
3	OBJETIVOS	58
3.1	Geral	58
3.2	Específicos.....	58
4	MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1	Microrganismo.....	59
4.2	Preparação do inóculo	59
4.3	Seleção de linhagens.....	61
4.4	Meios de cultivo	63
4.5	Inibidor da beta-oxidação	64
4.6	Manipulações de DNA	65
4.6.1	Recuperação dos operons <i>phaCAB</i> , <i>phaCB</i> e <i>phaB</i>	65
4.6.2	Isolamento de DNA plasmidial.....	65
4.6.3	Digestão com enzimas de restrição.....	66
4.6.4	Ligação dos fragmentos de DNA.....	67
4.6.5	Análise em géis de agarose	67
4.6.6	Recuperação de fragmentos de DNA a partir de géis de agarose	67
4.6.7	Preparo de células competentes	68
4.6.8	Transferência de plasmídeos por transformação	68
4.6.9	Construção de plasmídeos e linhagens bacterianas recombinantes.....	69
4.7	Ensaio em biorreatores	73
4.7.1	Pré-Inóculo e Inóculo.....	73
4.7.2	Descrição dos ensaios em frascos agitados e em biorreatores	73
4.7.3	Produção de PHAmcl em biorreator	74
4.7.4	Influência da alimentação de substratos e de ácido acrílico.....	74
4.7.5	Condições de cultivo em biorreatores	75
4.7.6	Concentração celular.....	77
4.8	Amostragem de óleo de soja	77
4.9	Teor e composição do PHA	78
4.10	Nitrogênio amoniacal	78
4.11	Análise dos Resultados.....	79
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.1	Etapa I - Seleção de microrganismos em frascos agitados	81
5.1.1	<i>Pseudomonas</i> sp. (IPT-066).....	83
5.1.2	<i>Cupriavidus necator</i> H16 (IPT-027).....	87

5.1.3	<i>Cupriavidus necator</i> DSM545 (IPT-026).....	93
5.1.4	<i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048	100
5.1.5	<i>Burkholderia sachari</i> (IPT-189).....	107
5.2	Etapa II - Ensaios em biorreator utilizando a linhagem <i>Burkholderia cepacia</i> IPT-048.....	114
5.2.1	Cultivo de <i>Burkholderia cepacia</i> adicionado de óleo de soja.....	114
5.2.2	Cultivo de <i>Burkholderia cepacia</i> adicionado de óleo de soja e ácido acrílico.....	119
5.2.3	Cultivo de <i>Burkholderia cepacia</i> adicionado de óleo de soja e ácido capróico	128
5.2.4	Cultivo de <i>Burkholderia cepacia</i> adicionando de óleo de soja, ácido capróico e ácido acrílico.....	133
5.3	Etapa III - Obtenção de linhagens recombinantes produtoras de polihidroxialcanoatos: influência do gene <i>phaB</i> (acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente).	135
5.3.1	Proposta da via metabólica envolvida na síntese de P3HB/3HAMcl.....	136
5.3.2	Obtenção de <i>Cupriavidus necator</i> pBBR:: <i>phaB</i>	139
5.3.2.1	Construção do vetor pJM9131:: <i>phaB</i>	139
5.3.2.2	Transferência do vetor pJM9131:: <i>phaB</i> para o vetor pBBR1MCS-2	141
5.4	Etapa IV - Produção PHAmcl em biorreator utilizando as linhagens <i>Cupriavidus necator</i> IPT-026 e <i>C. necator</i> recombinante IPT-026:: <i>phaB</i>	144
5.5	Etapa V - Manutenção do gene <i>phaB</i> na linhagem IPT-026:: <i>phaB</i> em ensaios em frascos agitados	152
6	CONCLUSÕES	162
	REFERÊNCIAS	168
	ANEXOS.....	187

1 INTRODUÇÃO

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são fonte de reserva de carbono e energia sintetizados por muitos organismos (Steinbüchel, 1991). Estes polímeros têm atraído a atenção de pesquisadores e indústrias por possuírem propriedades tais como: fabricação a partir de matérias-primas renováveis, biodegradabilidade e biocompatibilidade. Sua estrutura química geral está apresentada na figura 1A.

Figura 1A: Estrutura geral de poli-3-hidroxialcanoatos (Ojumo *et al.*, 2004; Steinbüchel e Valentin, 1995).

O poli-3-hidroxibutirato (P3HB) e um copolímero poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (P3HB-co-3-HV) são certamente os mais conhecidos dos PHAs e iniciativas para a sua produção industrial tem sido realizadas em diversos países (Rocha *et al.*, 2007). No Brasil, este polímero vem sendo produzido pela empresa PHB industrial utilizando tecnologia desenvolvida em conjunto pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), pelo Centro de Tecnologia da (CTC) e pela Universidade de São Paulo (USP). Entretanto, P3HB e P3HB-co-3-HV possuem propriedades física e mecânicas específicas, as propriedades do homopolímero PHB fazem com que seja quebradiço, o que limita suas aplicações. A inserção de unidades de 3-hidroxivalerato (HV), compostas por cinco átomos de carbono dá origem ao copolímero PHB-co-HV, com propriedades tais que lhe conferem maior maleabilidade (Gómez *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2007)

Por outro lado, cerca de 150 monômeros já foram identificados como constituintes de PHAs produzidos por bactérias (Rehm e Steinbüchel, 1999; Rehm, 2003, 2006 e 2007). Assim, a composição de PHAs pode ser altamente variável e sua síntese depende: (I) da natureza do substrato fornecido, (II) das vias metabólicas que levam à formação dos monômeros e (III) da especificidade do sistema de polimerização (Eggink *et al.*, 1995). A grande variabilidade da composição monomérica dos PHAs dão origem a uma ampla variação de propriedades físicas e mecânicas destes polímeros, tornando-os potenciais candidatos como substituinte na grande maioria dos plásticos convencionais advindos do petróleo.

A partir dos avanços na produção de PHA com monômeros de cadeia curta (PHAscl), como PHB, PHB-co-HV e PHB-b-HPE ficou evidente a importância da necessidade de diversificação da composição monomérica dos PHA, já que as propriedades destes materiais dependem em grande parte desta característica. Uma vez que se consiga, por meio de diversas ferramentas, controlar a composição monomérica, espera-se produzir PHA sob medida para diferentes aplicações. Recentemente uma das classes de PHA, tem surgido com promissora do ponto de vista de propriedades física e mecânica. Esta classe é constituída de copolímeros de P3HB com unidades de cadeia média e são denominadas geralmente de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxialcanoatos de cadeia média (P3HB-co-3HAMcl). Neste cenário, PHA compostos de monômeros de cadeia média, ou seja, contendo 6 ou mais átomos de carbono que apresentam propriedades distintas dos PHAscl. Enquanto os de cadeia curta se assemelham aos plásticos, como o polietileno, os PHAMcl apresentam propriedades elastoméricas, assemelhando-se à borracha, bem distintos do P3HB e P3HB-co-3HV. Podem ser produzidos tanto a partir de carboidratos como de diversos compostos alifáticos por microrganismos, especialmente bactérias do gênero *Pseudomonas* pertencentes ao grupo I de homologia do RNA ribossomal (Brandl *et al.*, 1988; Haywood *et al.*, 1990).

A bactéria *Cupriavidus necator* anteriormente denominada *Alcaligenes eutrophus* (Lafferty *et al.*, 1988), *Ralstonia eutropha* (Yabuuchi *et al.*, 1995) ou *Waltersia eutropha*, (Vaneechoutte *et al.*, 2004) é a mais estudada na área de

produção de PHA, pela sua capacidade de sintetizar e acumular altos teores de P(3HB), (Anderson e Dawes, 1990). Vale ressaltar que ao longo dos anos esta linhagem já recebeu inúmeras denominações, sendo a última, *Cupriavidus necator*, por Vandamme e Coenye (2004). Quando cultivada sob condições limitantes de crescimento, como a falta de um ou mais nutrientes essenciais e excesso de fonte de carbono, pode produzir grande quantidade de PHA, chegando a 80% do conteúdo celular seco (Dawes, 1973, Doi *et al.*, 1990b). Entretanto, outras bactérias também foram citadas como capazes de produzir grandes quantidades de PHA, como linhagens de *Burkholderia* que chegam a acumular mais de 60% de PHA (Gomez *et al.*, 1996).

O interesse em avaliar a produção de PHA's a partir de ácidos graxos livres e óleo vegetal tiveram como fundamento o potencial das linhagens *Cupriavidus necator* DSM 545 IPT-026 e *Burkholderia cepacia* IPT-048 em utilizá-los como substratos para a produção de polímeros. Os ácidos graxos presentes nos óleos vegetais contituem-se uma excelente opção para se obter polímeros biodegradáveis. Um dos motivos refere-se ao baixo custo e também muitos dos ácidos graxos constituintes dos óleos vegetais são insaturados, o que é considerado essencial para algumas modificações químicas (De Koning, 1996). O PHA alvo deverá conter em sua composição 3HB e HAMcl. Linhagem recombinante abrigando uma seqüência gênica da biossíntese de PHA foi construída, com o objetivo de avaliar seu potencial na produção de P3HB-co-HAMcl.

2 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

2.1 Polihidroxicanoatos (PHAs)

Esse grupo de polímeros foi descoberto em 1923, quando o microbiologista francês Maurice Lemoigne do Instituto Pasteur observou a presença de poli-3-hidroxi-3-oxobutanoato (PHB) em bactérias do gênero *Bacillus* (Lemoigne, 1926). O PHB, porém foi apenas uma curiosidade acadêmica durante décadas e em 1962 foram obtidas as primeiras patentes para sua produção empregando bactérias (Brandl *et al.*, 1990).

Por muitos anos, o ácido-3-hidroxi-3-oxobutanoico (3HB) foi o único constituinte conhecido dos polihidroxicanoatos, até que em 1964, identificou-se o ácido-3-hidroxi-2-oxobutanoico produzido por uma bactéria do gênero *Nocardia* (Anderson e Dawes, 1990). Em 1972, a partir de estudos com lodo de esgoto, foi verificada a presença de outros constituintes, como os ácidos 3-hidroxi-3-oxovalérico (3HV), 3-hidroxi-3-oxohexanoico (3HHx) e 3-hidroxi-3-oxoheptanoico (3HHep). Em 1976, a empresa inglesa Imperial Chemical Industries (ICI) iniciou estudos para a produção de poli-3-hidroxi-3-oxobutanoato, a partir da linhagem *Cupriavidus necator*, como uma alternativa aos plásticos obtidos do petróleo e constatou que a incorporação de unidades 3-hidroxi-3-oxovalerato à cadeia polimérica permitia modular as propriedades físicas e mecânicas do polímero produzido, ampliando suas possíveis aplicações. Registrada a patente, em 1981, a ICI a produção industrial de PHA, de P3HB e de P3HB-co-3HV, que receberam comercialmente o nome de Biopol® (Byrom, 1992; Silva *et al.*, 2001).

Em 2004, a Procter e Gamble (P&G) tem desenvolvido e comercializado um polímero de PHA denominado Nodax, o qual consiste num copolímero de PHA contendo 3HB e outras unidades de 3HA tendo grupos laterais maiores do que três átomos de carbono, utilizando para o processo espécies modificadas geneticamente para a produção deste polímero (Noda *et al.*, 2004; Tokiwa e Calabia, 2004).

Uma das características mais importantes dos poliésteres microbianos, além de serem um atrativo comercial, é que são termoplásticos biodegradáveis. Os produtos destes poliésteres tais como películas e fibras, podem ser degradados no solo, lodo ou água de mar. Sob condições ótimas, a razão de degradação é extremamente rápida. Alguns microrganismos (como bactérias e fungos) excretam PHB despolimerase extracelular para degradar e absorver o resultado da decomposição como nutriente (Doi, 1990).

2.2 Características dos PHAs

Os PHAs (polihidroxialcanoatos) são poliésteres biodegradáveis que podem ser produzidos a partir de matérias-primas renováveis, como o açúcar de cana, materiais amiláceos e óleos vegetais (Cox, 1994). São poliésteres acumulados na forma de grânulos por inúmeras bactérias (figura 1B), como material de reserva de carbono e energia, quando uma fonte de carbono é fornecida em excesso e o crescimento celular é limitado pela falta de um nutriente essencial, por exemplo, o nitrogênio, o fósforo, o magnésio, o ferro, entre outros (Anderson e Dawes, 1990; Brandl *et al.*, 1990; Steinbüchel e Valentin, 1995; Madison e Huisman, 1999; Park *et al.*, 2005, Khanna e Srivastava, 2005b).

Figura 1B: Célula bacteriana contendo grânulos de PHA (Rita C. Paro Alli - IPT)

Os monômeros constituintes de PHA são classificados em dois grandes grupos: (i) aqueles de cadeia curta (HAScl – “HydroxyAcids of Short-Chain-Length”),

contendo de 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal, e (ii) aqueles de cadeia média (HAMcl – “HydroxyAcids of Médium-Chain-Length”), contendo de 6 a 16 átomos de carbono na cadeia principal, portanto os PHA podem ser classificados como (i) PHAscl, compostos por HAscl e (ii) PHAmcl, formados por HAMcl (Steinbuchel e Valentin, 1995). PHAmcl são produzidos por diferentes espécies do gênero *Pseudomonas* e PHAscl (principalmente P3HB) são produzidos por espécies pertencentes aos mais diversos grupos bacterianos (Steinbüchel, 1991). A capacidade de acumular PHA contendo HAMcl e HAscl em uma mesma cadeia polimérica também foi observada (Kobayashi et al., 1994; Liebergesell *et al.*, 1993). Há ainda um outro grupo que possuem monômeros constituintes de unidades 3-hidroxibutirato copolimerizadas com unidades 3-hidroxiacil onde as unidades acil contendo 6 a 16 átomos de carbono denominados aqui de P3HB/3HAMcl. A Figura 1A mostra a representação esquemática da estrutura dos poli-3-hidroxiacanoatos.

Uma vez que estão sendo registradas constantes crises políticas nos países possuidores das grandes reservas de petróleo, conseqüentemente o custo internacional do barril avança rapidamente, está sendo investido na exploração de matérias-primas renováveis para a produção destes materiais poliméricos (Silva *et al.*, 2007) e assim a produção de um, possível, substituto que é o caso dos polihidroxiacanoatos. Dentre os diversos tipos de PHA's destacam-se os poli-3-hidroxibutirato (P3HB) que é o mais estudado, e os monômeros hidroxivalerato (HV), hidroxihexanoato (HHx), entre outros de cadeia média e longa ou, ainda, a possibilidade de síntese de blendas poliméricas (P3HB-co-3HV, P3HB-co-3HHx, entre outras) (Pradella *et al.*, 2006).

O poli-3-hidroxibutirato (P3HB) é um termoplástico altamente cristalino com uma temperatura de fusão perto de 180°C. As propriedades físicas do PHB são freqüentemente comparadas ao PP (polipropileno) devido a suas temperaturas de fusão e cristalinidade (Doi, 1990; Steinbuchel, 1991; De Koning, 1995).

Os PHAs correspondem a um conjunto versátil de plásticos biodegradáveis cujo uso dependerá de sua composição monomérica (Witholt e Kessler, 1999).

Podem oferecer uma grande variedade de propriedades, desde plásticos rígidos altamente cristalinos a polímeros dúcteis (Chandra e Rustgi, 1998). A presença de monômeros aromáticos no PHA pode mudar significativamente suas propriedades físicas, levando à novas aplicações biomédicas e/ou biotecnológicas (Garcia *et al.*, 1999; Olivera *et al.*, 2001). As propriedades biocompatíveis identificadas em certos poliésteres possibilitam sua aplicação na área médica, principalmente na forma de fios de sutura e microcápsulas (Langer *et al.*, 1990; Re e Rodrigues, 2006).

O processo de obtenção do plástico biodegradável tem sido amplamente estudado (Khanna e Srivastava, 2005a). Altos rendimentos e produtividades podem ser alcançados através de otimizações nas diferentes formas de operação do cultivo e as possibilidades de programas de melhoramento genético das linhagens (Portilho, 1999). O custo da fonte de carbono contribui significativamente no custo da produção de PHAs (Choi e Lee, 1999, Pradella *et al.*, 2006), e o Brasil, por ser um dos maiores produtores de fontes de carbono renováveis do mundo, conseqüentemente, é um dos países com maior potencial para a produção desses biopolímeros com um custo aceitável (Pradella *et al.*, 2006).

Existe uma grande diversidade de PHAs produzidos por bactéria sendo que mais de 150 ácidos hidroxialcanóicos distintos já foram identificados como monômeros constituintes (Steinbüchel e Valentin, 1995; Rhem, 2003).

Uma alternativa viável para melhorar as características de processabilidade deste polímero é a utilização de copolímeros de 3HB e 3-hidroxialcanoatos de cadeia média (3HAMcl).

Os P3HB/3HAMcl são copolímeros de 3-hidroxibutirato e 3-hidroxiacil de 6 ou mais átomos de carbono o qual tem despertado interesse por apresentarem propriedades intermediárias entre P3HB e PHAmcl, atendendo a requisitos para diversas aplicações. P3HB/3HAMcl composto de 6 mol% de monômeros de cadeia média, por exemplo, possuem alongamento na ruptura de 680%, módulo de impacto de 17 Mpa e temperatura de fusão de 133°C, bastante semelhante a polietileno de

baixa densidade e, muito superior a P3HB, podendo ser utilizado para produção de filmes de cobertura (Sudesh *et al.*, 2000).

2.2.1 O mercado para os plímeros biodegradáveis

Bactérias podem armazenar polihidroxicanoatos a partir de qualquer fonte de carbono durante sua multiplicação. Para sua aplicação, o uso de fontes renováveis, o torna uma alternativa atrativa para a substituição dos plímeros advindos de fontes não renováveis como o petróleo e seus derivados.

Visando aprimoramentos, a produção de P3HB por microrganismos tem sido amplamente pesquisada através de cultivos conduzidos em batelada sob diferentes condições de fermentação e outras estão descritas na literatura (Braunegg *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999).

2.3 Aplicações do plímero biodegradável

É possível identificar dois mercados potenciais de aplicação do material desenvolvido. O de maior volume, na área de embalagens e materiais descartáveis produzidos por injeção em moldes e extrusão de filmes, dominado por “commodities” petroquímicos no qual o preço de venda da resina e sua boa processabilidade em escala industrial são os requisitos principais. O objetivo nesse mercado é atingir um nicho “verde”, onde o caráter de biodegradabilidade do produto justifica um diferencial de preço superior aos plímeros de origem petroquímica. O tamanho desse mercado é extremamente elevado, principalmente, se forem conseguidas as características de processabilidade compatíveis com as plantas industriais que hoje são utilizados no processamento dos plímeros convencionais. Dessa maneira, sua viabilidade requer a superação de gargalos relacionados às propriedades físico-químicas dos plímeros, quais sejam: (a) temperatura de processamento muito próxima da temperatura de degradação do produto, (b) alta cristalinidade (60 a 90%), (c) baixo alongamento e a (d) baixa resistência ao impacto (rigidez).

O polímero biodegradável pode ser utilizado em diversas áreas, sendo o enfoque central de sua aplicação para embalagens descartáveis (figura 2B). No entanto, em âmbito mundial, polímeros desta natureza tem sido foco de grande interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos métodos de administração de drogas através de sistemas de liberação controlada para constituintes ativos. O mercado farmacêutico-hospitalar, alimentício e cosmético que compreende aplicações como aparatos, implantes médicos e matrizes para liberação controlada de princípios ativos, cosméticos, medicamentos e suplementos alimentares. Nesse mercado, além da bioegradabilidade, a biocompatibilidade e alta pureza também são requeridas. O atual custo de produção de P3HB já seria competitivo, requerendo-se, entretanto, avanços relativos à garantia de pureza necessária e o desenvolvimento de técnicas de microencapsulação adaptadas a esse polímero.

Apesar do avanço das pesquisas da área farmacêutica e para outras aplicações biomédicas quanto ao desenvolvimento de sistemas de liberação gradativa de drogas, o uso de polímeros biodegradáveis para este fim, seja através de implantes ou de administração parenteral de microcápsulas (figura 2A) em tratamentos de longa duração (hormônios, antibióticos, drogas anti-cancerígenas, vacinas), ainda apresenta uma série de limitações tecnológicas devido à gama limitada de perfis de liberação, em termos de tempo e características cinéticas de degradação, disponíveis no mercado de polímeros biodegradáveis. O desenvolvimento de novos métodos de administração de drogas depende de uma maior diversidade de polímeros biodegradáveis de alta pureza, que possa ampliar a gama desses perfis de degradação e atender a demanda tecnológica crescente de administração controlada de novos fármacos.

Figura 2: A) Microcápsulas de PHA contendo ativo (Pereira *et al.*, 2002). B) Materiais produzidos com plástico biodegradável (COPERSUCAR).

O aparecimento de novos grupos de agentes terapêuticos tais como ácidos nucleicos e polipeptídeos (aplicações em saúde humana) ou hormônios de crescimento (aplicações veterinárias) vêm impulsionando as pesquisas em sistemas de liberação controlada por se tratarem de fármacos com alto valor agregado que podem ser aplicadas em baixas concentrações, mas com uma série de problemas associados a biodisponibilidade como a instabilidade no organismo ou meia-vida curta (Donbrow, 1992).

Os primeiros polímeros usados no desenvolvimento de sistemas microencapsulados para liberação de fármacos foram borrachas de silicone (Folkman e Long, 1964) e polietileno (Desai *et al.*, 1965), mas estes materiais, apesar de biocompatíveis, não eram biodegradáveis e as microcápsulas eram aplicadas mais freqüentemente como implantes. No final de sua vida terapêutica, elas deviam ser removidas cirurgicamente, podendo deixar resíduos tóxicos ao organismo.

Na área médica, os polímeros biodegradáveis mais utilizados são os homo e copolímeros de lactato (poliácido láctico - PLA) e glicolato (poliácido glicolático - PGA) desenvolvidos pela Du Pont e que têm sido empregados pela Johnson e Johnson na preparação de fios cirúrgicos para suturas, reabsorvíveis pelo organismo (Chulia *et al.*, 1994). Muitos estudos têm sido desenvolvidos com estes polímeros incorporando

hormônios, drogas controladores do câncer, antibióticos e vacinas (Jalil e Nixon, 1990; Takada *et al.*, 1994; Egilmez *et al.*, 2000). Os polímeros bacterianos (PHAs), têm surgido como candidatos alternativos para este tipo de aplicação (Williams e Martins, 2002; Khanna e Srivastava, 2005; Re e Rodrigues, 2006; Shishatskaya *et al.*, 2007). Dentre os PHAs, o homopoliéster polihidroxibutirato (P3HB) e o copolímero P(3HB-co-3HV) são os mais citados para uso farmacêutico, com as seguintes vantagens (Pouton e Akhtar, 1996): são polímeros biocompatíveis; não são sintetizados por via química, apresentando a vantagem de causarem menos problemas toxicológicos; devido à especificidade das enzimas microbianas, os polímeros resultantes são regulares do ponto de vista estereoquímico, apresentando, portanto propriedades físicas altamente reprodutíveis. No entanto, apresentam como principais desvantagens, menor degradabilidade que os homopolímeros de lactato (PLA) e glicolato (PGA) devido ao alto grau de cristalinidade que pode influenciar parâmetros farmacêuticos como mecanismos e extensão de degradação, biocompatibilidade, distribuição e mecanismo de liberação do fármaco e sua cinética. Outra finalidade é a utilização dos PHAs na bioengenharia e na nanotecnologia (Misha *et al.*, 2006).

Segundo Holland e Tighe (1992), os PHAs apresentam uma gama de aplicação muito interessante a ser desenvolvida, pois embora a sua velocidade de degradação abiótica seja relativamente lenta, sua hidrólise por ataque microbiano é muito mais rápida e pode ser manipulada por variações na composição, no peso molecular e no grau de cristalinidade destes polímeros, o que pode gerar novos copolímeros com novos perfis cinéticos de degradação. Assim, novas pesquisas sobre o uso de PHAs têm sido direcionadas a alternativas que possibilitem a variação da velocidade de degradação, dentre elas, a preparação de misturas ou blends de PHAs com outros polímeros (Scandola, 1998; Amass *et al.*, 1998).

2.4 Biossíntese de PHAs

A biossíntese de PHAs tem sido amplamente estudada em diversas bactérias. Quatro vias metabólicas diferentes já foram descritas para biossíntese de PHA: (i) de *Cupriavidus necator*, (ii) de *Rhodospirillum rubrum*, (iii) de *Pseudomonas oleovorans* e (iv) de *Pseudomonas aeruginosa* (Steinbüchel, 1996; Steinbüchel e Lütke-Eversloh, 2003). Alguns representantes da família Halobacteriaceae pertencentes ao domínio Archaeae também são apontados como produtores de polihidroxialcanoatos (Suriyamongkola *et al.*, 2007).

2.4.1 Biossíntese de polihidroxialcanoatos de cadeia curta (PHAscl)

PHAs contendo monômeros de cadeia curta (PHAscl), ou seja, cadeias de até 5 carbonos, podem ser formadas pelas vias biossintéticas de *Cupriavidus necator* e de *Rhodospirillum rubrum*. A síntese de P(3HB) em *Cupriavidus necator* (figura 3) ocorre em três etapas: (1) duas moléculas de acetil-CoA condensam-se sob a catálise da β -cetotiolase produzindo acetoacetil-CoA; (2) acetoacetil-CoA é reduzida a (R)-3-hidroxibutiril-CoA, numa reação catalisada pela enzima acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente; (3) a enzima PHA sintase catalisa a ligação éster da molécula de (R)-3-hidroxibutiril-CoA à molécula de poliéster já existente (Merrick e Doudoroff, 1961; Senior e Dawes, 1971; Oeding e Schlegel, 1973; Haywood *et al.*, 1988, 1989).

Em *Rhodospirillum rubrum*, a biossíntese de P(3HB) ocorre em cinco etapas: a primeira é idêntica à de *C. necator*; na segunda etapa, a molécula de acetoacetil-CoA é reduzida a (S)-3-hidroxibutiril-CoA pela ação da enzima acetoacetil-CoA redutase NADH-específica; na terceira e quarta etapas, o produto é transformado em (R)-3-hidroxibutiril-CoA, pela ação de duas enzimas enoil-CoA hidratases. O quinto e último passo se refere à polimerização pela ação da PHA sintase (Moskowitz e Merrick, 1969).

Figura 3: Vias de biossíntese de P(3HB) em *Cupriavidus necator* e *Rhodospirillum rubrum* (Steinbüchel, 1996).

2.4.2 Biossíntese de polihidroxicanoatos de cadeia média (PHAmcl)

PHAmcl são formados pelas vias biossintéticas de *Pseudomonas oleovorans* e *Pseudomonas aeruginosa*. A via de síntese de PHA em *P. oleovorans* está ligada ao ciclo da β -oxidação de ácidos graxos. *P. oleovorans*, quando cultivada com alcanos, álcoois ou ácidos alcanóicos, sob determinadas condições limitantes do crescimento, acumula PHAmcl (De Smet *et al.*, 1983; Brandl *et al.*, 1988; Preusting *et al.*, 1991). Neste caso, o tamanho das cadeias carbônicas dos substratos fornecidos determina a composição de ácidos 3-hidroxicanoicos constituintes do polímero, sendo que em geral o principal monômero constituinte possui o mesmo tamanho de cadeia carbônica do substrato fornecido, porém, no mesmo polímero encontram-se monômeros com número menor ou maior de carbonos, indicando a redução ou aumento de unidades de 2 carbonos da molécula do substrato. Com

base nisto, foi proposto que parte do substrato é degradado pelo ciclo da β -oxidação de ácidos graxos e que os intermediários desta reação (3-hidroxiacil-CoA) são desviados para a síntese de PHA (Brandl *et al.*, 1988; Lageveen *et al.*, 1988). A formação de unidades de 3HA com 2 átomos de carbono a mais do que o substrato pode ocorrer pela condensação de uma molécula de acetil-CoA com uma de acil-CoA catalisada pela β -cetotiolase (Doi *et al.*, 1990a).

Enquanto *P. oleovorans* precisa de alcanos ou ácidos alcanóicos de cadeia média como precursores para o acúmulo de PHA, outras linhagens do mesmo gênero, como *P. aeruginosa*, possuem uma via metabólica particular que possibilita a síntese de PHAmcl a partir de acetil-CoA, resultante do metabolismo de glicose, frutose, gliconato ou outras fontes de carbono. Neste caso, o principal constituinte do polímero produzido é o ácido 3-hidroxidecanóico (Haywood *et al.*, 1990; Timm e Steinbüchel, 1990). Esta via metabólica é chamada de via biossintética de PHA de *P. aeruginosa*, uma vez que a maioria dos estudos já realizados foi com esta bactéria (Steinbüchel, 1996). Neste caso, foi proposta uma relação da produção de PHAmcl com a biossíntese de ácidos graxos, devido à semelhança entre as duas vias (Haywood *et al.*, 1990; Timm e Steinbüchel, 1990; Eggink *et al.*, 1993).

2.5 Polihidroxicanoatos a partir de substratos não-relacionados

A incorporação das diversas unidades monoméricas de ácidos hidroxicanoicos depende principalmente das bactérias e dos substratos fornecidos. De modo geral, o substrato ou algum dos produtos do seu metabolismo, deve possuir estrutura química semelhante ao monômero do polímero. Em *C. necator*, substratos não relacionados, por exemplo açúcares, são metabolizados pela via de Entner Doudoroff a acetil-CoA, que entra na via de biossíntese de PHA, gerando unidades 3HB (figura 3). Por outro lado, ácidos carboxílicos podem gerar diferentes unidades monoméricas, dependendo da sua estrutura. Diversos trabalhos mostraram-se eficazes na conversão de ácidos (por exemplo, o ácido propiônico e o valérico) na formação de monômeros de 3HV (Ramsay, 1990; Doi, 1990a; Pereira, 1996; Du *et al.*, 2001; Rocha *et al.*, 2007). Tomando como exemplo a biossíntese e incorporação de unidades 3HV, os precursores de 3HV possuem número ímpar de

átomos de carbono na cadeia. Em *C. necator*, a molécula de ácido propiônico (3 carbonos) é metabolizada a propionil-CoA, que é condensada com acetil-CoA, formando uma molécula de cinco carbonos. Trabalhos anteriores mostram que insaturações e outros grupos funcionais, quando presentes na fonte de carbono, podem ser encontrados nos polímeros acumulados (Steinbüchel e Valentin, 1995; Fächtenbusch *et al.*, 1996; Fächtenbusch *et al.*, 1998). Estes casos são classificados como biossíntese de PHA a partir de substratos relacionados.

Nos últimos anos observou-se um aumento significativo no emprego de fontes simples e de baixo custo para a produção de biopolímeros com estrutura como é o caso de ácidos graxos livres e outras com composição complexa que é o caso dos óleos vegetais brutos e refinados. A utilização de óleos vegetais e especificamente óleo de soja em nosso país, pode ser uma alternativa bastante interessante na produção de PHA a partir de uma matéria prima renovável, disponível a baixo custo e com alto fator de conversão a produto. Dentre as matérias primas renováveis para síntese de PHA, o uso de carboidratos têm sido bastante explorado, mas, os óleos vegetais e gorduras animais aparecem como matérias primas promissoras para biossíntese desta classe de polímeros (Rehm e Steinbüchel, 1999).

2.6 Características das enzimas envolvidas na biossíntese de polihidrobutilatos

As principais enzimas envolvidas na biossíntese de PHB em bactérias são a β -cetotiolase, a acetoacetil-CoA redutase e a PHA sintase. Estas enzimas, de *Cupriavidus necator*, foram isoladas e caracterizadas quanto à sua estrutura e especificidade de substrato (Haywood *et al.*, 1988ab; Rehm e Steinbüchel, 1999).

2.6.1 *phaA* (β -Cetotiolase)

A enzima β -cetotiolase (acetil-CoA acetiltransferase), cujo gene codificador é denominado *phaA*, catalisa a condensação reversível de duas moléculas de acetil-CoA a acetoacetil-CoA e CoASH livre. Esta enzima atua tanto na biossíntese como na degradação de P(3HB). A regulação da reação de condensação ocorre pela

concentração celular de coenzima A. Assim, altas concentrações de CoA fazem com que a reação ocorra no sentido contrário ao da biossíntese de PHA (Oeding e Schlegel, 1973; Lafferty *et al.*, 1988).

Cupriavidus necator possui pelo menos três enzimas β -cetotiolases diferentes, cujos genes codificadores são designados: *phBA*, *BktB* e *BktC*. Quando avaliadas quanto à sua atividade na reação reversa (tiólise), estas enzimas apresentaram especificidades de substrato distintas (Haywood *et al.*, 1988). Estudos posteriores (Slater *et al.*, 1998) mostraram que a enzima codificada pelo gene *BktB* exerce um papel importante para a polimerização de unidades monoméricas diferentes de P3HB, por exemplo, P3HV. A enzima codificada por *phBA* é a mais ativa, e exerce um papel importante na biossíntese de P(3HB), limitando-se à produção de acetoacetyl-CoA. Enquanto que a enzima B apresenta atividade com 3-cetoacetyl-CoAs de cadeia de 4 a 10 carbonos. Em estudos anteriores Haywood *et al.* (1988) haviam isolado estas duas enzimas, classificando-as como A e B. Existem indicações que *phBA* e/ou *BktC* formam oligômeros mistos com *BktB*, resultando num amplo espectro de especificidade de substrato (Steinbüchel, 1996; Slater *et al.*, 1998).

As enzimas subseqüentes requeridas para a β -oxidação estarão associadas a um complexo multienzimático (*FadBA*) formado por dois genes polipeptídeos codificados pelos genes *fadA* e *fadB*. Todas as enzimas do complexo possuirão atividade para um amplo espectro de substrato, com exceção da enoil-CoA hidratase que é ativa para substratos de cadeia curta. A hidratase específica para ácido graxo de cadeia média é uma proteína distinta que não está associada ao complexo enzimático multifuncional.

Em função desta inespecificidade, a β -cetotiolase pode catalisar a condensação de uma molécula de acetyl-CoA com outra molécula de propionil-CoA, gerando uma molécula de 3-cetovaleryl-CoA, que resulta na incorporação de 3HV, produzindo o copolímero P(3HB-co-3HV). Da mesma forma, outros monômeros

podem ser incorporados num mesmo poliéster, originando diferentes copoliésteres (Steinbüchel, 1996).

2.6.2 *phaB* (Cetoacetil-CoA redutase NADPH dependente)

Foram detectadas duas enzimas acetoacetil-CoA redutases em *C. necator*: uma NADPH dependente e outra NADH dependente. Ambas foram estudadas quanto à sua atividade na reação reversa (oxidação), onde foi demonstrado que a enzima NADPH-dependente catalisa a oxidação de *D*(-)-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 (C4 e C10); no entanto, na reação de redução, esta enzima forma apenas moléculas de (*S*)-3-hidroxiacil-CoA, portanto, não participa da via de biossíntese de PHA, uma vez que não forma o substrato da enzima seguinte. Assim, na biossíntese de P(3HB), a enzima acetoacetil-CoA redutase é a responsável pela redução estereoespecífica da molécula de 3-acetoacetil-CoA a (*R*)-3-hidroxiacil-CoA. O gene codificador desta enzima é denominado *phaB*. Nenhuma das duas redutases detectadas parece ser regulada por nenhum outro metabólito (Haywood *et al.*, 1988ab).

2.6.3 *phaC* (PHA sintase)

A PHA sintase é considerada a enzima chave para o acúmulo de PHA, pois catalisa o passo decisivo da via: a polimerização de unidades (*R*)-3-hidroxiacil-CoA, formando o polímero de PHA (Steinbüchel, 1996; Solaiman e Ashby, 2005). É absolutamente estereoespecífica para os estereoisômeros (*R*). Esta enzima foi encontrada associada aos grânulos de PHA durante o acúmulo do polímero (Haywood *et al.*, 1989a). Os estudos sobre esta enzima estão em evidência nos últimos anos. Foram clonados e caracterizados os genes codificadores de pelo menos 38 PHA sintases, de um total de 31 microrganismos (Schembri *et al.*, 1994; Rehm e Steinbüchel, 1999).

Foi observado que existe similaridade entre as estruturas primárias das PHA sintases de diferentes microrganismos. As PHA sintases foram classificadas em 4 tipos, com relação à especificidade pelo substrato e à estrutura primária (Steinbüchel *et al.*, 1992; Rehm e Steinbüchel, 1999; Rehm 2003, 2006 e 2007).

As PHA sintases do tipo I são específicas para monômeros de ácido hidroxialcanóico de cadeia curta (C3 a C5) como substrato (Haywood *et al.*, 1989a; Steinbüchel *et al.*, 1992). Como representantes deste grupo incluem-se as PHA sintases de *C. necator* (Peoples e Sinskey, 1989), *Methylobacterium extorquens* (Valentin e Steinbüchel, 1993), *Rhodobacter sphaeroides* (Huestede e Steinbüchel, 1993) e *Rhodococcus ruber* (Pieper e Steinbüchel, 1992).

Enzimas PHA sintases do tipo II são encontradas em espécies de *Pseudomonas* e catalisam principalmente a polimerização de monômeros de ácidos hidroxialcanóicos de comprimento médio (C6 a C14). Como exemplo, existem as PHAs sintases de *P. aeruginosa* e de *P. oleovorans* (Huisman *et al.*, 1991; Timm e Steinbüchel, 1992).

O terceiro tipo de PHA sintases (tipo III), encontrado em *Allochromatium vinosum*, possui a mesma especificidade para substratos que a enzima do tipo I, apesar de se diferenciar em sua estrutura primária. Neste caso, a enzima possui duas subunidades, ao contrário das enzimas do tipo I e II, que são constituídas por uma só unidade (Liebergesell *et al.*, 1994; Liebergesell e Steinbüchel, 1993).

As PHA sintase de classe IV compreendem enzimas que consistem de dois tipos de subunidades, a subunidade PhaC e PhaR. As subunidades PhaC das PHA sintases de classe IV, por exemplo a de *Bacillus megaterium*, mostram grande similaridade às subunidades PhaC das PHA sintases de classe III, tanto em tamanho (60 KDa) quanto em seqüência. Nas PHA sintases de classe IV, a subunidade PhaE (40KDa), presente na classe III, é substituída pela subunidade PhaR (20 KDa), a qual não apresenta grande similaridade com PhaE. As

subunidades PhaE e PhaR apresentam somente 18% de identidade entre a sequência de seus aminoácidos (McCool e Cannon, 2001; Satoh *et al.*, 2002).

No que se refere a especificidade de substrato, existem duas exceções a esses grupos: a PHA sintase de *Thiocapsia pfennigii*, com duas subunidades altamente homólogas (85%) às PHA sintases do tipo III, apresentando entretanto, uma ampla variação de substratos compreendendo tioésteres de coenzima A de 3HA_{SCL} e 3HA_{MCL} (Liebergessell e Steinbüchel, 1993) e, 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).

2.7 Substratos relacionados e não relacionados

Os substratos intitulados não relacionados são aqueles onde o microrganismo é capaz de produzir unidades monoméricas de polihidroxialcanoatos, diferentes de 3HB, a partir de substratos simples como glicose, frutose ou gluconato de sódio que são metabolizados a acetil-CoA, dispensando o fornecimento de outros sustratos relacionados aos monômeros sintetizados (Steinbüchel, 1996; Holtwick *et al.*, 1997). Comparado a síntese de substratos relacionados, não existem muitos trabalhos que utilizem substratos não relacionados para a produção de polihidroxialcanoatos. Entretanto, nos últimos anos observou-se um aumento significativo na utilização no emprego de fontes de carbono simples e de baixo custo para a produção de polímeros biodegradáveis.

2.7.1 Ácidos graxos

Os triacilgliceróis são lipídios formados pela ligação de três moléculas de ácidos graxos com o glicerol através de ligações tipo éster. Os ácidos graxos que participam da estrutura de um triacilglicerol são geralmente diferentes entre si. O óleo é um triacilglicerol que por ação de lipases é hidrolisado a ácidos graxos e glicerol (figura 4).

Figura 4: Reação de hidrólise de triacilglicerol.

Muitas bactérias podem multiplicar-se em ácidos graxos de cadeia longa que são oxidados a acetil-CoA por uma via denominada de β -oxidação (White, 2000). A via da β -oxidação consiste de uma série cíclica de quatro reações, ao final das quais a Acil-CoA será reduzido em dois carbonos, liberados sob a forma de acetil-CoA. A figura 5 apresenta a via de degradação dos ácidos graxos em *E. coli* (Di Russo *et al.*, 1999). Os ácidos graxos de cadeia longa entram na célula por um sistema de transporte auxiliado por proteínas, produtos *fadL* e *fadD*. A proteína codificada pelo gene *fadL* localiza-se na membrana externa, onde atua como um receptor dos ácidos graxos de cadeia longa e auxilia sua passagem através da membrana externa. O gene *fadD* codifica a acil-CoA sintetase, que será responsável pela ativação do ácido graxo e sua passagem pela membrana interna. A molécula de ácido graxo ativada (acil-CoA) será oxidada pela enzima acil-CoA desidrogenase, sintetizada a partir dos genes *fadF* e *fadG*. O produto do gene *fadF* possui especificidade pela acil-CoA com cadeia média ou longa, enquanto o produto *fadG* apresenta especificidade para acil-CoA de cadeia curta. O produto formado será uma enoil-CoA (acil-CoA insaturada na posição 2). O gene *fadE* codifica uma flavoproteína responsável pela transferência de elétrons requeridos pelas acil-CoA desidrogenases (*fadG* e *fadF*).

Em *E. coli*, acil-CoA desidrogenase (figura 5) é codificada por *yafH* que atualmente acredita-se que corresponda a *fadE* (Campbell e Cronan Jr., 2002). Lu *et al.* (2003) analisaram o gene acil-CoA desidrogenase (*yafH*) de *E. coli* quando

expresso juntamente com $phaC_{Ac}$ e $phaJ_{Ac}$. Em *E. coli* recombinante contendo $yafH$, $phaC_{Ac}$ e $phaJ_{Ac}$ foram avaliados que a expressão do gene acil-CoA desidrogenase ($yafH$) poderia promover um aumento de enoil-CoA, resultando deste modo em um melhoramento da produção de PHA por *E. coli* recombinante.

Pseudomonas putida, também é conhecida por produzir PHAmcl a partir de ácidos orgânicos e carboidratos (Gomez, 2000), contendo os genes que codificam PHA sintase de *Thiocapsa pfennigii* e de *Chromatium vinosum* produzem copolímero de 3HB e 3HHx metabolizando ácido octanóico como fonte de carbono (Liebergesell *et al.*, 1994; Liebergesell *et al.*, 2004; Herbert *et al.*, 2005)

Cupriavidus necator é bem conhecida como sendo microrganismo produtor de PHA possuindo várias vantagens quanto sua eficiência na produção, bem como, a possibilidade da obtenção de linhagens recombinantes. Matsusaki *et al.* (2000) e Matsumoto *et al.* (2002) descreveram que a inserção do gene PHA sintase ($phaC$) de *Pseudomonas* sp. 61-3 possibilita a estabilização de *Cupriavidus necator* recombinantes que sintetiza copoliésteres consistindo de unidades de 3HB e 3HAMcl, no qual a composição de 3HB foi muito maior (acima de 94 mol%) a partir de glicose. Descreveram ainda que, a expressão do gene $phaG_{Ps}$ em *E. coli* recombinante inibiu fortemente multiplicação celular, o que sugere que a expressão da proteína $phaG$ inibe a biossíntese de ácidos graxos em *E. coli*.

Porém, no caso de *Cupriavidus necator*, a expressão dos genes da biossíntese de PHA, inclusive $phaG_{Ps}$, não influenciou significativamente na quantidade de biomassa celular. Foram obtidos níveis de polímeros até cerca de 40% com teor de HA_{MCL} de até 8% no polímero produzido. Taguchi *et al.* (2003) sugerem que a atividade de $phaC_{Re}$ não seja um fator determinante para o acúmulo de poliésteres em *Cupriavidus necator* recombinantes. Em estudos prévios Kichise *et al.* (1999), observaram que a elevada atividade da PHA sintase nas células não resultavam no aumento de acúmulo de PHA, quando expressões heterogêneas de PHA sintase de *A. caviae* foi inserido em *Cupriavidus necator*. O caminho determinante parece estar na formação de monômeros antes da polimerização,

hipótese sustentada, segundo os autores, pela análise cinética da biossíntese de P(3HB-co-3HV) com *Cupriavidus necator* alimentada com uma mistura de butirato e pentanoato como fontes de carbono (Doi *et al.*, 1990).

Qi *et al.* (1998) relataram que quando se adicionou ácido acrílico para promover a inibição da β -oxidação de ácido graxo ocorreu um aumento da produção de PHA. Lu *et al.* (2003) durante o estudo incorporaram ácido acrílico observando que as linhagens recombinantes contendo os genes *yafH*, *phaC_{Ac}* e *phaJ_{Ac}* reduziu a população de células assim como a produção de P3HB/3HHx. Quando as linhagens recombinantes continham *phaC_{Ac}* e *phaJ_{Ac}*, a adição de ácido acrílico, não apresentou efeito na multiplicação celular, mas um aumento da produção de P3HB/3HHx de 2,07 para 5,37% foi observado.

Figura 5: Esquema da oxidação de ácidos graxos (Di Russo *et al.*, 1999)

O ácido acrílico promove a inibição da 3-cetoacil-CoA tiolase que catalisa a clivagem de 3-cetoacil-CoA liberando acetil-CoA e um acil-CoA com dois carbonos a menos (Thijsse, 1964). A inibição da 3-cetoacil-CoA tiolase resulta no acúmulo de intermediários de ácidos graxos da β -oxidação, o qual poderá servir como precursor da síntese de PHA (Thijsse, 1964, Qi *et al.*, 1998). Lu *et al.* (2003) avaliaram que com a adição de ácido acrílico houve um aumento do acúmulo de P3HB/3HHx em *E. coli* recombinante contendo os genes $phaC_{Ac}$ e $phaJ_{Ac}$.

Quando os genes $yafH$, $phaC_{Ac}$ e $phaJ_{Ac}$ foram inseridos nas linhagens recombinantes houve redução da produção de P3HB/3HHx na presença do ácido acrílico, sugerindo desta forma que o ácido acrílico pode também promover a redução da expressão de $yafH$ e deste modo reduzir os suplementos precursores para a síntese de PHA.

2.7.2 Ácidos graxos insaturados

Mais que 70% dos ácidos graxos, presentes na maioria dos nos óleos de origem vegetal mais importante comercialmente, correspondem aos ácidos oléico e linoléico. Ambos são ácidos graxos insaturados, o ácido oléico com apenas uma insaturação ($C18:1\Delta^9$) e o ácido linoléico com duas ($C18:2\Delta^{9,12}$). Além disso, o ácido linolênico, que possui três insaturações ($C18:3\Delta^{9,12,15}$), é encontrado em quantidades consideráveis em alguns óleos (canola e soja). Assim, os óleos vegetais são substratos com grande potencial para a produção de polímeros contendo monômeros com insaturações.

A oxidação de ácidos graxos insaturados requer enzimas adicionais àquelas requeridas para a oxidação dos ácidos graxos saturados. O envolvimento de enzimas auxiliares foi primeiramente enfatizado por Stoffel e Caesar (1965) (citado em Schulz e Kunau, 1987), que propôs a existência de duas enzimas auxiliares na oxidação dos ácidos graxos insaturados: a Δ^3 - Δ^2 -enoil-CoA isomerase e a 3-hidroxiacil-CoA epimerase. Enoil-CoA isomerase é responsável pela conversão dos compostos 3-enoil-CoA para *trans*-2-enoil-CoA. Por exemplo, no caso do ácido

oléico, que possui uma dupla ligação no carbono 9, este seria oxidado pelo ciclo de β -oxidação e, após remoção de algumas unidades de dois carbonos, seria obtido 3-*cis*-dodecenoil-CoA. A enoil-CoA hidratase envolvida no ciclo β -oxidação não reconhece este composto e então uma enoil-CoA isomerase converte-o em 2-*trans*-dodecenoil-CoA, que pode retornar ao ciclo e ser totalmente oxidado.

Apesar do trabalho de Stoffel e Caesar ter sido o pioneiro, a via proposta por esses pesquisadores foi revista (Schulz e Kunau, 1987); a nova via continua indicando a enoil-CoA isomerase como responsável pela isomerização (de *cis* para *trans*) das duplas ligações estendendo-se a partir de carbonos ímpares, permitindo a oxidação deste substrato. Na primeira via proposta por Stoffel e Caesar, os ácidos graxos insaturados com dupla ligação a partir de carbonos pares eram igualmente oxidados pelo ciclo β -oxidação, no entanto resultavam num composto de conformação (*R*), sendo necessária uma 3-hidroxiacil-CoA epimerase para dar a este composto a conformação (*S*), que poderia ser totalmente degradado pela via de β -oxidação. Schulz e Kunau (1987) comprovaram que esta via não era significativamente operante nos sistemas de β -oxidação estudados, porém, demonstraram ainda que ácidos graxos insaturados, com dupla ligação estendendo-se a partir de carbonos pares requerem, em ambos os sistemas (procariótico e eucariótico), o envolvimento de 2,4-dienoil-CoA redutase NADPH dependente (produto do gene *fadH*) (figura 5). Assim, o ácido oléico que possui apenas uma dupla ligação, estendendo-se a partir de um carbono ímpar, é degradado pelo Ciclo da β -oxidação até 3-*cis*-dodecenoil-CoA, então uma enoil-CoA isomerase converte este composto a 2-*trans*-dodecenoil-CoA, que é então totalmente degradado pelo ciclo da β -oxidação. O ácido linoléico, que possui duas insaturações, uma estendendo-se a partir de carbono ímpar (Δ^9) e outra de carbono par (Δ^{12}), é igualmente oxidado como o ácido oléico até sua primeira dupla ligação. Após a ação da enoil-CoA isomerase, o composto obtido é o 2-*trans*-6-*cis*-dodecadienoil-CoA que retorna ao ciclo de β -oxidação até a formação de 2-*trans*-4-*cis*-decadienoil-CoA, quando é necessária uma 2,4-dienoil-CoA redutase para a redução deste composto a 3-*trans*-decenoil-CoA em organismos eucarióticos, que é convertido a 2-*trans*-decenoil-CoA, pela ação da enoil-CoA isomerase, e então completamente oxidado pelo Ciclo de Lynen, levando à formação de 5 moléculas de acetil-CoA. Em *E. coli*, a

2-*trans*-4-*cis*-decadienoil-CoA já é diretamente convertida a 2-*trans*-decenoil-CoA pela 2,4-dienoil-CoA redutase (Schulz e Kunau, 1987).

Em estudos realizados de produção de PHA em *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida* e *P. resinovorans*, avaliando-se os produtos formados a partir dos substratos fornecidos, chegou-se a conclusão que a 2,4-dienoil-CoA redutase também é operante nesta espécie (Iamamura *et al.*, 1990, De Waard *et al.*, 1993; Ashby e Foglia, 1998).

2.8 Produção industrial de PHA

Os estudos sobre PHAs no Brasil começaram em 1991, com a realização de um projeto conjunto entre o Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), a Universidade de São Paulo (USP) e o Centro de Tecnologia da Copersucar (CTC), financiado através do convênio com Finep/PADCT. Este projeto visou a produção de plásticos biodegradáveis a partir da cana-de-açúcar por via biotecnológica (Bueno Netto, 1991; Silva *et al.*, 2001).

Pode-se observar a evolução ocorrida no país no desenvolvimento de tecnologia e de conhecimento científico relativos à produção de poli-hidroxialcanoatos e sua utilização como polímero biodegradável e biocompatível. Uma análise deste conhecimento acumulado no país permite apontar, como alvo atual, o controle de diferentes aspectos da produção de PHA para assim, uma vez determinada uma propriedade necessária a uma dada aplicação, modular a sua composição monomérica, de modo a se produzirem polímeros sob medida para aplicações estratégicas, a partir do controle dos fluxos metabólicos do microrganismo produtor, do uso das estratégias de produção em biorreator, em um trabalho intrinsecamente multidisciplinar. As perspectivas para este desenvolvimento foram apresentadas em trabalho recente divulgado pelo Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE) do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio sobre polímeros e intermediários químicos, com o objetivo de fornecer subsídios para a política de biotecnologia industrial no Brasil. Em suas conclusões, o trabalho indica

que nosso país tem posição mundial privilegiada, por dispor de matérias-primas renováveis a baixo custo (fontes de carbono e energia) e por, potencialmente, possuir mão-de-obra qualificada formada pelos diversos grupos de pesquisa já estabelecidos oferece oportunidades para o estabelecimento de uma plataforma mundial produtora e exportadora de biopolímeros, desde que ações concretas de financiamento e de organização das atividades de pesquisa e desenvolvimento sejam estabelecidas pelos órgãos públicos, em consonância com os setores produtivos do país (Pradella, 2006; Silva *et al.*, 2007).

O PHB obtido por produção biotecnológica, num sistema que emprega a produção de álcool, açúcar e PHB (Nonato *et al.*, 2001) é mais competitivo comercialmente, pois a produção da matéria-prima, a cana-de-açúcar, está associada às etapas de síntese, extração e purificação do polímero com solventes naturais, possibilitando a obtenção de um produto com menor custo final. No mesmo projeto, realizou-se no IPT um trabalho de isolamento e seleção de diversas bactérias de solo, produtoras de PHAs (Rodrigues, 1995). Foram isoladas e identificadas novas linhagens de *Burkholderia* capazes de acumular poliésteres contendo unidades do ácido hidroxibutírico (3HB) e do ácido-3-hidroxi-4-pentenóico (3H4PE), quando supridas com sacarose como única fonte de carbono (Rodrigues *et al.*, 1995). Dentre estas, encontra-se a linhagem identificada como *Burkholderia cepacia* IPT-064. Recentemente constatou-se que estas bactérias produzem uma mistura (“blend”) de dois homopolímeros: o poli-3-hidroxibutirato (P3HB), como principal constituinte e o poli-3-hidroxi-4-pentenoato (P3H4PE) (Valentin *et al.*, 1999). Além das linhagens isoladas no Brasil (Rodrigues, 1995), a literatura não mostra nenhuma outra bactéria capaz de acumular P(3H4PE) a partir de sacarose ou gliconato (Rodrigues, 2000; Rodrigues *et al.*, 2000; Sudesh *et al.*, 2000).

É de grande interesse industrial a substituição de polímeros de origem petroquímica como o PE (polietileno) por estes materiais termoplásticos biodegradáveis para a produção de embalagens (Byrom, 1990). Estima-se que cerca de 140 milhões de toneladas de lixo plástico são produzidos no mundo por ano, estes plásticos são provenientes do processamento de 150.000.000 de toneladas de combustível fóssil (Suriamongkol *et al.*, 2007). O crescente uso do plástico de

origem petroquímica desencadeou alguns problemas como, por exemplo, (1) volumes crescentes em aterros sanitários devido a sua não biodegradabilidade, (2) liberação de grande quantidade de gases tóxicos nocivos quando incinerados, (3) sérios problemas de logística durante seu processo de reciclagem (IPT e CEMPRE, 2000; Pradella *et al.*, 2006).

O processo de produção de P3HB a partir de sacarose já se encontra estabelecido sendo permitido haver uma exploração comercial deste polímero (Bueno Netto *et al.*, 2000, Nonato *et al.*, 2001). No entanto, o P3HB suas propriedades físicas e mecânicas que restringem seu espectro de aplicação na área de embalagens, sendo um material muito rígido e quebradiço, caracterizado pela baixa deformação (6% no P3HB, enquanto no PP é de 400%), conseqüentemente, dificultando seu processamento e aplicação (Pereira, 1996).

As propriedades físicas e mecânicas desses materiais (tabela 1) dependem da composição monomérica, da distribuição dos diferentes monômeros e do peso molecular do polímero. Isso permite prever que no futuro, eles poderão ser produzidos sob medida para diferentes aplicações (Doi, 1990).

Tabela 1: Propriedades físicas e térmicas de alguns polímeros comuns (Doi, 1990)

Propriedades	PHB	PP	PET	Nylon –6,6
Temperatura de fusão	180	176	267	265
Cristalinidade (%)	60-80	50-70	30-50	40-60
Densidade (g/cm ³)	1,250	0,905	1,385	1,14
Resistência Tensil (MPa)	40	338	70	83
Elongação (%)	6	400	100	60

PHB – polihidroxibutirato; PP – polipropileno; PET – Polietilenotereftalato

A produção industrial de PHA's tem utilizado *C. necator*, por sua capacidade de acumular grande quantidade de polímero com alto peso molecular (Ramsay *et*

al., 1990; Hänggi, 1995). Dentre os principais PHA's produzidos industrialmente estão o P(3HB) e o copolímero P(3HB-co-3HV). O homopolímero P(3HB) tem baixa estabilidade na fusão, pois se decompõe a aproximadamente 200 °C, que é uma temperatura muito próxima à sua temperatura de fusão; é altamente cristalino e relativamente frágil. A incorporação de unidades 3HV torna o copolímero P(3HB-co-3HV) mais flexível e com maior resistência à ruptura, à medida que aumenta a fração 3-hidroxivalerato. Com o aumento desta fração, ocorre o decréscimo da temperatura de fusão, sem afetar a temperatura de degradação, permitindo melhor processamento térmico do copolímero, o que o torna mais atrativo para produção industrial (Lee, 1996).

A produção técnica de PHA se dá, em sua grande maioria, através de um processo fermentativo em duas fases: na primeira utiliza-se meio de cultura balanceado e condições ótimas de cultivo para produzir biomassa bacteriana com baixo teor de polímero intracelular (PHA); na segunda, através da imposição da limitação de um ou mais nutriente necessário para a multiplicação celular e excesso da fonte de carbono há a indução da biossíntese e acúmulo do polímero no citoplasma em forma de grânulos (figura 1B). Cultivos a altas densidades celulares e elevados rendimentos de conversão de substratos ao produto de interesse são desejáveis para minimizar os custos de produção (Lee *et al.*, 2000).

Byrom (1987) descrevem o processo de produção industrial de P(3HB) da ICI, hoje adquirido pela Metabolix, Inc., que utiliza cultura em batelada alimentada, realizada em duas etapas. Durante a primeira fase, não limitada, *R. eutropha* cresce em um meio mineral contendo glicose, como única fonte de carbono, e fosfato suficiente para o crescimento celular, até se atingir uma determinada biomassa desejada. Quando ocorre a limitação por fosfato, inicia-se a segunda fase, na qual os microorganismos começam a produzir e estocar P(3HB). O processo prossegue com adições de glicose, até que se obtenha a quantidade desejada de polímero. O tempo total de cultura é de aproximadamente 110 a 120 h, com o acúmulo de mais de 75% do peso seco celular total em polímero.

O copolímero P(3HB-co-3HV) é produzido de forma semelhante, em duas fases, sendo que, a partir do início da fase de acúmulo, são adicionados glicose e ácido propiônico. P(3HB-co-3HV) com 0 - 30 mol% de unidades 3HV é produzido e essa fração pode ser controlada pela razão glicose/ácido propiônico adicionada. Como o ácido propiônico, em níveis acima de 0,1% no meio, é tóxico ao microorganismo e inibe a síntese de polímero, sua taxa de alimentação precisa ser bem controlada (Byrom, 1987).

Caracterizando-se pelo baixo custo, elevada disponibilidade e valores de rendimento máximo teórico de 1,0g de PHA/g de fonte de carbono consumida (Akiyana *et al.*, 2003), acima, portanto, dos encontrados em carboidratos que é da ordem de 0,4 g de PHA/g de fonte de carbono consumida. Devido a estas características, tem despertado o interesse de vários grupos de pesquisa destacando-se algumas linhagens as quais podem utilizar óleos vegetais com fonte de carbono para produção de PHA (Eggink *et al.*, 1995), tendo sido relatadas as linhagens *Pseudomonas* sp. (Kato *et al.*, 1996), *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas resinovorans* (Cromwick *et al.*, 1996, Ashby e Foglia, 1998), *Aeromonas caviae* (Shimamura *et al.*, 1994, Doi *et al.*, 1995), *Cupriavidus necator* e linhagens recombinantes de *Escherichia coli* (Fukui e Doi, 1998).

Como qualquer *commodity*, PHA deve ser produzido em processo de alto desempenho. Assim, no seu desenvolvimento, objetivos bem claros devem ser perseguidos.

Devido ao alto investimento de capital representado pelos biorreatores, há necessidade de se obter elevada produtividade, vale dizer, altos valores de massa de PHA/volume de biorreator hora (Braunegg *et al.*, 1998; Pradella *et al.*, 2000; Choi e Lee, 1999). Biorreatores alternativos, como os de tipo *airlift* que, em geral, caracterizam-se pelo baixo custo em comparação aos biorreatores convencionais agitados e aerados, além de consumirem menos energia também devem ser mais bem estudados e desenvolvidos (Tavares *et al.*, 2004; Pataquiva, 2003).

A matéria prima também possui um papel fundamental no custo de produção de PHA. Assim, é fundamental maximizar o rendimento de conversão de substrato a produto. PHAs são geralmente produzidos em duas fases. Na fase I, produz-se biomassa na maior concentração possível com baixo teor de PHA. Na fase II, haverá limitação do crescimento desencadeada pelo esgotamento ou por aporte limitado de nitrogênio, fósforo ou oxigênio, ou uma combinação destes fatores, induzindo a biossíntese de PHA (Ramsay *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1997). Para compensar os custos de teor de PHA na biomassa ao final do processo e o fator de conversão devem ser, então, maximizados (Gomez *et al.*, 1996).

A produção de P3HB/3HAMcl em biorreator de alto desempenho ainda é pouco estudada. Foi descrito um protocolo de produção de poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) (P3HB/3HHx) por um isolado selvagem de *Aeromonas hydrophila* a partir de ácido oléico, utilizando limitação por fósforo e processo descontínuo-alimentado operado pelo controle de pH (pH stat). Obtiveram-se, após 43 h, 97,5 g/L de biomassa total, 45,2% de teor de PHA com 17 mol% de 3HHx no copolímero produzido, alcançando produtividade de 1,0 g PHA/L.h (Lee *et al.*, 2000).

Akiyama *et al.* (2003) relataram que os óleos vegetais são nutrientes desejáveis à aplicação industrial em razão do seu baixo custo. Em comparação as outras fontes de carbono, os rendimentos teóricos da produção de PHA por óleos vegetais são maiores do que 1,0g por grama de óleo utilizado, por possuírem um elevado número de carbono por massa. Kahar *et al.* (2005) e Fukui *et al.* (1998) comentam da possibilidade de P3HB poder ser produzido a partir de óleos vegetais com linhagens de *Cupriavidus necator* H16, assim como por linhagens recombinantes contendo o gene da PHA sintase de *Aeromonas caviae* (phaC_{Ac}) para a produção o copolímero P(3HB-co-3HHx). Linhagens tipo selvagem ou recombinantes têm sido indicadas por acumular o homopolímero P3HB e copolímero P(3HB-co-3HHx) com frações de 4-5mol% de 3HHx, respectivamente, com uma porcentagem celular de cerca de 80% (w/w).

Com a intenção de produzir homopolímeros e copolímeros, Tsuge (2002)

utilizaram linhagens selvagens de H16 e recombinantes disponibilizando óleo de soja como fonte de carbono no fermentador. Os autores relatam que a redução da taxa de multiplicação pode ser considerado o maior problema quando utilizados ácidos graxos ou óleos vegetais como fonte de carbono. Independentemente de o microrganismo possuir de uma elevada taxa de multiplicação, quando aplicados em óleos vegetais ou ácidos graxos a quantidade de PHA e massa seca tende a ser, relativamente, menor.

Kahar *et al.* (2005) comentam que ao contrário dos açúcares, que podem ser diretamente metabolizados pelas células bacterianas, ácidos graxos também podem ser aplicados uma vez que os microrganismos poderão produzir as enzimas necessárias para a sua degradação. O óleo de soja possui em sua composição diferentes ácidos graxos correspondendo em cerca de 10% de ácido palmítico (C16:0), 22% ácido oléico (18:1), 54% ácido linoléico (18:2) e 8% de ácido linolênico (18:3). Durante a hidrólise, estes ácidos graxos serão transferidos à membrana e metabolizado via β -oxidação. De acordo com a composição química do óleo foi verificado que *Cupriavidus necator* tem sua capacidade de multiplicação comprometida pela presença de ácido linolênico.

A utilização de ácido acrílico tem se mostrado uma ferramenta bastante interessante para bloqueio da via de β -oxidação de ácidos graxos provendo assim intermediários para síntese dos monômeros 3HAMcl (Green *et al.*, 2002).

Steinbüchel *et al.* (1997) relataram que a composição de PHAs bacterianos é determinado pela combinação da PHA sintase, tendo sido demonstrado em vários sistemas que a composição de PHA pode ser modificada pelo tipo de fonte de carbono disponibilizada (carboidratos vs ácidos graxos de diferentes cadeias) e pela expressão de genes da PHA sintase em bactérias recombinantes as quais produzem diferentes 3HA-CoAs em relação à linhagem inicial.

Dennis *et al.* (1998) citam que quando *Cupriavidus necator* foi cultivada com ácidos graxos como fonte de carbono, somente o homopolíéster P3HB foi detectado.

No entanto, alguns monômeros traços de 3HAMcl (3HHx e 3HO) foram observados em quantidades de cerca de 0,1 a 0,2%. Green *et al.* (2002) analisaram o efeito do octanoato de sódio como fonte de carbono para *Cupriavidus necator* juntamente com o acrilato de sódio (inibidor da β -oxidação) na produção de PHA. Verificaram que o microrganismo foi capaz de sintetizar PHAs composto por 3HB, 3HP, 3HHx e 3HO, no entanto, a maior fração molar polimérica correspondeu a 3HB e ainda a presença de acrilato favoreceu o aumento de 3HAMcl em *Cupriavidus necator*.

Fonseca e Antônio (2006) avaliaram a produção de PHAs com linhagens recombinantes de *E. coli* JM101, contendo gene de *Pseudomonas aeruginosa* para a produção de PHAmcl. Citam que a PHA sintase de *P. aeruginosa* não possibilitou o acúmulo de polímeros de cadeia curta, entretanto durante a análise puderam observar a presença de 3HB em algumas amostras. Foi fornecido como fonte de carbono diferentes tipos de óleos vegetais (algodão, arroz, canola, dendê, girassol, milho, oliva e soja) assim como o soro de leite como suplemento. Os ácidos graxos saturados foram mais susceptíveis aos caminhos metabólico da β -oxidação e síntese do polímero, e ainda, os óleos de dendê e algodão os quais respectivamente apresentam 51% e 27% de ácidos graxos saturados acumularam 11,65% e 11,46% de PHA, enquanto que com o óleo de soja possibilitou um acúmulo de 10,31% de PHA.

Bosetti *et al.* (1992) Preusting *et al.* (1993) comentam que *Pseudomonas oleovorans* possuem a capacidade de multiplicar-se e sintetizar PHAmcl a partir de uma ampla variedade de matéria prima incluindo alcanos, álcoois e ácidos alcanóicos com cadeias de 6 a 14 carbonos. Segundo Du e Yu (2002) estes tipos de substratos interferem na multiplicação celular, na formação de PHA e na composição do polímero.

Em nosso laboratório, ensaios preliminares em frascos agitados com bactérias dos gêneros *Cupriavidus* sp. e *Burkholderia* sp. utilizando como substrato ácidos graxos livres e óleos vegetais, têm conduzido a resultados promissores. Nossos experimentos têm mostrado valores de teor de PHA até cerca de 70% na

biomassa total com cerca de até 5% de monômeros de cadeia média (Vanzin *et al.*, 2006a; 2006b).

2.9 Engenharia metabólica no processo de produção de PHA

A engenharia metabólica é um campo multidisciplinar da ciência cujo objetivo corresponde a otimização da produtividade. Os fatores de conversão de substrato aos produtos de interesse podem ser analisados através da análise do fluxo metabólico (AFM). Os avanços em estudos de engenharia metabólica permitirão incrementos de produtividade de metabólitos secundários nos cultivos *in vitro*, contribuindo para a redução dos custos de produção, ou mesmo viabilizando a produção de novos compostos (Associação brasileira das empresas de biotecnologia, 2005). Diferente da modelagem matemática tradicional não estruturada, a engenharia metabólica se preocupa em modelar os sistemas biológicos de forma estruturada, realizando balanços de massa envolvendo os metabólitos intracelulares. Para calcular os fluxos destes metabólitos através de toda a rede metabólica (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

Estes fluxos podem ser calculados através das medidas de algumas velocidades específicas de produção e consumo de metabólitos intracelulares e das velocidades específicas de consumo de substratos e formação de produtos medidos fora do envelope celular. Através do balanço de massa e considerando a estequiometria das diversas reações que ocorrem nas vias de metabolismo é possível o estabelecimento do denominado modelo estequiométrico de um processo biológico, utilizando-se para tanto ferramentas de álgebra linear e otimização linear para resolução do modelo.

Recentemente têm sido utilizados isótopos marcados para a estimativa das velocidades específicas relativas dos metabólitos intracelulares, ou seja, para a determinação da partição dos fluxos nas diversas ramificações das vias metabólicas (Gombert e Nielsen, 2000).

O produto final deste cálculo de fluxos é o mapa metabólico que apresenta um diagrama das principais reações bioquímicas envolvidas e a estimativa das velocidades de cada passo metabólico no estado estacionário.

O valor dos mapas metabólicos estabelecidos está na possibilidade de comparação dos fluxos metabólicos, estabelecidos em diferentes situações de cultivo ou na comparação dos fluxos para linhagens de células modificadas geneticamente em diferentes pontos da via metabólica. Além disso, podem ser utilizados para a identificação de pontos de ramificação “chaves”, para a proposição de vias metabólicas alternativas, estimativa de fluxos extracelulares não considerados durante a elaboração do modelo e o cálculo dos fatores de conversão máximos teóricos a partir de um dado substrato (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

A AFM (análise de fluxo metabólico) tem sido utilizada na produção de PHA, segundo Gombert e Nielsen (2000) e Leaf e Srienc (1997) que modelaram as vias de síntese de P3HB por *Alcaligenes eutrophus* utilizando cinética enzimática de Michaelis-Menten por dados e medidas da atividade enzimática *in vitro*. Embora o modelo não tenha descrito apropriadamente o sistema, sua simulação mostrou que as relações acetil CoA:CoA e NADPH:NAD⁺ exerceram regulação, respectivamente, nas enzimas tiolase e redutase. Estudo de produção de P3HB em culturas mistas de *Lactobacillus delbrueckii* e de *Alcaligenes eutrophus* (Kato *et al.*, 1999) demonstraram que NADPH formado no ciclo de Krebs é utilizado na síntese de PHA quando a concentração de NH₃ decrescia no meio de cultura. Análise de fluxo metabólico realizado por Shi *et al.* (1999) apontaram que a maximização do rendimento de P3HB poderia ser obtido através do aumento da disponibilidade de acetil-CoA e NADPH.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a produção de PHA a partir de ácidos graxos livres e óleos vegetais utilizando linhagens bacterianas da coleção de cultura e isoladas de solo de canavial.

3.2 Específicos

- Selecionar microrganismo(s), em frascos agitados, do banco de cepas do Centro de Tecnologia de Processos e Produtos, analisando inicialmente as linhagens: *Cupriavidus necator* DSM545 IPT-026, *Cupriavidus necator* H16 IPT-027, *Pseudomonas* sp. IPT-066, *Burkholderia cepacia* IPT-048 e *Burkholderia sacchari* IPT-189.
- Aprimorar a produção de unidades de poli-3-hidroxibutirato (P3HB) e poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxialcanoatos de cadeia média (P3HB-co-3HAMcl) no polímero biodegradável através de técnicas de microbiologia e de engenharia bioquímica.
- Estudar o processo de obtenção de copolímeros de polihidroxialcanoatos bacterianos produzidos a partir de ácidos graxos livres e óleo de soja comercial como fonte de carbono.
- Obtenção de linhagem(s) recombinante(s) a partir do(s) microrganismo(s) selecionado(s) através do aumento do número de cópias do gene *phaB* (acetoacetil-CoA redutase) no direcionamento de intermediários da β -oxidação de ácidos graxos para a biossíntese de PHA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

Foram utilizadas as linhagens *Cupriavidus necator* DSM545 IPT-026, *Cupriavidus necator* H16 IPT-027, *Pseudomonas* sp. IPT-066, *Burkholderia cepacia* IPT-048 e *Burkholderia sacchari* IPT-189 pertencentes à coleção de cultura do Centro de Tecnologia de Processos e Produtos, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (CTPP/ IPT), as quais estavam mantidas por liofilização e/ou criopreservação em “freezer” à -80 °C.

Estas linhagens foram escolhidas pelo fato de algumas já terem sido descritas como eficientes produtoras como, por exemplo, a linhagem *Cupriavidus* permitindo ser utilizada como cepa comparativa às demais linhagens.

4.2 Preparação do inóculo

As linhagens foram inicialmente cultivadas em placas contendo ágar nutriente (AN - tabela 2) 30 °C por um período de 24 – 36 horas. A partir de colônias isoladas foram transferidas para caldo nutriente (CN - tabela 3) e novamente incubadas em agitador rotativo (New Brunswick Scientific. Mod. 6-25) sendo posteriormente transferidas para o meio mineral (MM - tabelas 4 e 5) sendo incubadas a 30 °C a 200 rpm por 24 a 36 horas. O controle de contaminações foi realizado pela observação macroscópica de colônias em meios sólidos e por microscopia óptica.

As bactérias utilizadas encontravam-se preservadas por liofilização (aparelho Labconco, modelo 5-75050), segundo metodologia pré-estabelecida no Laboratório (Silva *et al.*, 1992). Para uso de rotina as mesmas foram preservadas por congelamento como descrito por Sambrook *et al.* (1989). Neste método, cultivou-se a bactéria em CN e após a incubação e multiplicação, a cultura foi misturada a uma solução de glicerol, de modo que a concentração final fosse de 10% (v/v). A

suspensão obtida foi distribuída em alíquotas de 1 mL em microtubos, os quais foram armazenados em “freezer” a -80°C. Para reativação, um microtubo foi retirado do “freezer” e 0,5 mL de cultura foi inoculado em CN, o qual foi incubado em condições adequadas.

Tabela 2 - Ágar nutriente (AN)

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de carne	3,0
Peptona	5,0
Agar bacteriológico	15,0
H ₂ O destilada	q.s.p. 1000 mL

Tabela 3 - Caldo nutriente (CN)

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de carne	3,0
Peptona	5,0
H ₂ O destilada	q.s.p. 1000 mL

Tabela 4 - Composição dos meios de cultura utilizados

Componente	Concentração (g/L)
KH ₂ PO ₄	1,50
Na ₂ HPO ₄	3,54
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,50
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,20
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,01
Citrato Férrico Amoniacal	0,06
Solução de Elementos Traços *	1,0 ml/L

***Tabela 5** - Solução de Elementos Traços

Componente	Concentração (g/L)
H ₃ BO ₃	0,3
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,03
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01
H ₂ O destilada	q.s.p. 1000 mL

4.3 Seleção de linhagens

Foram realizados ensaios de acúmulo de P3HB/3HAMcl em frascos agitados a 30 °C, 200 rpm (tabela 6) a fim de identificar a influência da relação das concentrações iniciais dos ácidos graxos livres e óleo de soja para as diferentes linhagens bacterianas (tabela 7). Durante a seleção, também foi analisado a capacidade de síntese quando adicionado diferentes concentrações (tabela 8) de ácido acrílico para a inibição da β -oxidação.

Tabela 6 – Plano para o cultivo em frascos agitados a 200 rpm/ 30°C contendo 2,0 g/L de substrato usando o ácido acrílico como inibidor da β -oxidação de ácidos graxos.

		Substrato				Acido Acrílico (mM)						Análises	Linhagens				
Ensaio		C6	C8	C16	OS	0,0	2,5	5,0	10,0	20,0	30,0	(h)	026	027	048	066	189
Ordem cronológica para a realização dos diferentes ensaios	1	C6	C8	C16	-	-	-	-	-	-	-	96	+	+	+	+	+
	2	C6	C8	C16	OS	-	-	-	-	-	-	48 e 96	+	+	+	+	+
	3	C6	C8	C16	OS	0,0	-	-	Ac	Ac	Ac	96	+	+	+	-	+
	4	C6	C8	C16	OS	0,0	Ac	Ac	-	-	-	a cada 12	+	+	+	-	+
	5	C6	-	-	OS	0,0	Ac	-	-	-	-	72 e 96	+	-	+	-	-
	6	C6	-	-	OS	0,0	Ac	-	-	-	-	72 e 96	+	-	+	-	-
	7	C6	-	-	OS	0,0	Ac	-	-	-	-	a cada 12	+	-	+	-	-

(C6) – ensaios utilizando o ácido caprílico; (C8) – ensaios utilizando o caprílico; (C16) – ensaios utilizando o ácido palmítico; (OS) ensaios utilizando o óleo de soja; adição (Ac) ou não (-) do ácido acrílico como inibidor da β -oxidação aos ensaios; (026) *Cupriavidus necator* DSM 545 IPT-026; (027) *Cupriavidus necator* H16 IPT-027; (048) *Burkholderia cepacia* IPT-048; (066) *Pseudomonas* sp. IPT-066; (189) *Burkholderia cepacia* IPT-189; (+) linhagens utilizadas com os diferentes substratos com a adição ou não do ácido acrílico; (+) de acordo com os resultados obtidos previamente, a partir daquele ensaio a linhagem não seria mais testada.

Tabela 7 – Fonte de carbono (ácido graxo e/ óleo de soja) utilizados nos ensaios em frascos agitados e/ou biorreator

Fonte de carbono	Números de carbono	Frascos agitados (g/L)	Biorreator (g/L)
Ácido capróico	C6:0	2,0 e 5,0	5,0
Ácido caprílico	C8:0	2,0 e 5,0	-
Ácido palmítico	C16:0	2,0	-
Óleo de soja	Tabela 9	2,0	5,0

Tabela 8 - Concentrações de ácido acrílico utilizado nos diferentes ensaios

Concentração (mM)	Concentração (g/L)
0,0	-
2,5	0,1802
5,0	0,3603
10,0	0,7206
30,0	2,1618

4.4 Meios de cultivo

A fim de selecionar um substrato comparativo ao óleo de soja, cuja composição encontra-se na tabela 9, foram testados diferentes ácidos graxos livres os quais, quando possível, foram neutralizados com Hidróxido de Sódio 1M até que atingisse pH $7,0 \pm 0,1$. As concentrações iniciais escolhidas foram de 2 g/L dos respectivos ácidos graxos: C6:0 (ácido capróico), C8:0 (ácido caprílico) e C16:0 (ácido palmítico) e, posteriormente 5 g/L, para os ensaios em frascos agitados e somente C6:0 (ácido capróico) e o óleo de soja para o biorreator em

uma concentração de 5g/L. Dos ácidos graxos escolhidos somente o C6 e o C8 foram utilizados na forma de caprolato e caprilato de sódio sendo, respectivamente, esterilizados em filtros com porosidade de 0,22 μm . O ácido palmítico foi suspenso em álcool absoluto e transferido diretamente ao meio de cultivo, enquanto que, o óleo de soja foi esterilizado a 180°C durante 1 hora e adicionados diretamente ao meio mineral (modificado a partir de RAMSAY *et al.*, 1990).

Tabela 9 - Composição de óleos vegetais.

Óleos Vegetais	Composição de ácidos graxos (% m/m)									
	8:0	10:0	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Arroz					17,5		1,3	39,9	39,1	0,3
Canola					5,4		1,6	56,3	25,0	8,4
Girassol				0,1	4,0	0,1	1,3	17,4	12,7	5,3
Milho					11,5		2,2	26,6	58,7	0,8
Palma	1,4	2,9	50,9	18,4	8,7		1,9	14,6	1,2	
Soja					10,5		3,2	22,3	54,5	8,3

C8:0 – ácido caprílico (octanóico), C10:0 – ácido cáprico (decanóico), C12:0 – ácido láurico (dodecanóico), C14:0 – ácido mirístico (tetradecanóico), C16:0 – ácido palmítico (hexadecanóico), C16:1 – ácido 9-hexadecenóico, C18 – ácido esteárico (octadecanóico), C18:1 – ácido oléico (octadecenóico), C18:2 – ácido linoléico (octadecadienóico), C18:3 – ácido linolênico (octadecatrienóico). Fonte: Ashland Chemical Company.

4.5 Inibidor da beta-oxidação

Foi preparado uma solução de ácido acrílico 1M e ajustado o pH para 7,0 $\pm 0,2$ com NaOH 1M. Posteriormente a solução de acrilato de sódio foi esterilizada através de filtros com porosidade de 0,22 μm .

As concentrações de ácido acrílico que foram utilizadas nos diferentes ensaios encontram-se na tabela 8.

4.6 Manipulações de DNA

4.6.1 Recuperação dos operons *phaCAB*, *phaCB* e *phaB*

Os plasmídeos pJM9131, pJM9131 Δ *phaA* e pJM9131 Δ *phaCA* foram digeridos com as enzimas *Stu*I, *Eco*RV e *Hind*III e os produtos, obtidos nas diferentes etapas, contendo os operons *phaCAB*, *phaCB* e *phaB* gerados a partir destas digestões foram utilizados posteriormente para subclonagem em novo vetor de expressão.

4.6.2 Isolamento de DNA plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial foi utilizado o método de Birnaborn e Dolly (1979), modificado. A linhagem *Escherichia coli* contendo o plasmídeo de interesse foi cultivada “overnight” em 50 mL de meio Luria Bertani (LB – Tabela 10) contendo o antibiótico adequado. A cultura foi centrifugada, em alíquotas de 1,5 mL, por 5 minutos a 13000 rpm (Heraeus Instruments Biofuge 15R). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 μ L de solução de GETL gelada (lisozima 4mg/mL; glicose 50 mM; Tris-HCl (pH 8.0) 25 mM; EDTA (pH 8.0) 10 mM), agitadas vigorosamente e incubado em banho de gelo por 5 minutos. Adicionaram-se 200 μ L de uma solução de SDS em NaOH (SDS - Dodecil Sulfato de Sódio 0,5 g; NaOH 0,4 g; H₂O 50 mL), misturando-se por inversão e incubado por 5 min em banho de gelo. Para precipitação do DNA cromossomal e proteínas foram adicionados 150 μ L de solução de acetato de potássio (acetato de Potássio 5 M: 60,0 mL; ácido acético glacial 11,5 mL; H₂O destilada 28,5 mL) previamente gelado e, após nova incubação em banho de gelo por 5 min, centrifugou-se por 10 min, 13000 rpm, 4°C. O sobrenadante, contendo

o DNA plasmidial foi transferido para um novo tubo, no qual procedeu-se a extração de proteínas com fenol/clorofórmio (v/v) (fenol saturado com Tris 0,1 M, pH 8,0, o qual foi misturado em partes iguais com uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), centrifugou-se por 10 min, 10.000 rpm, 4°C. Após isto, foi realizada a precipitação em etanol absoluto (2 vezes o volume do sobrenadante), incubou-se por 15 - 30 min em banho de gelo e posteriormente centrifugou-se por 60 min, 13.000 rpm, 4°C, lavou-se com etanol 70%, centrifugou-se por 30 min, 13.000 rpm, 4°C e o “pellet” seco foi ressuscitado em água bidestilada estéril com 0,01% do volume de solução RNase (Tris/HCl 10mM; NaCl 15mM; RNase a 10mg/mL. A mistura foi incubada por 1 hora à 37°C e mantida a -20°C.

Tabela 10 - Meio Luria Bertani

Componente	Concentração (g/L)
Triptona	10,0
Extrato de Levedura	5,0
NaCl	10,0
H ₂ O destilada	q.s.p. 1000 mL

4.6.3 Digestão com enzimas de restrição

Para a digestão de DNA, foram adicionadas as enzimas de restrição segundo instruções do fabricante (GIBCO BRL Life Technologies, Inc ou Invitrogen Life Technologies). Para cada 1µL de DNA utilizaram-se 1-2 unidades da enzima, de forma que esta represente no máximo 10% do volume. A digestão do DNA foi realizada a 37 °C, por 16 horas.

4.6.4 Ligação dos fragmentos de DNA

Para ligação das moléculas lineares de DNA, utilizou-se a enzima DNA ligase do bacteriófago T4 com seu respectivo tampão de acordo com a indicação do fabricante (GIBCO BRL Life Technologies, Inc ou New England-Biolabs).

4.6.5 Análise em géis de agarose

Para análise do DNA, foi utilizado gel de agarose na concentração 0,8% (m/v). Utilizou-se uma solução TBE como tampão de corrida segundo Sambrook *et al.* (1989). As amostras de DNA foram aplicadas nos géis com 1/10 do volume de corante de corrida (Stop Mix - EDTA 5M (pH 8,0) 2,0 mL; azul bromofenol 0,5g; glicerol 5,0g; H₂O q.s.p. 100 mL). As corridas eletroforéticas em mini-géis foram realizadas a 120V, 80mA, 80W por 1hora. Os fragmentos foram observados após coloração do gel com brometo de etídio (0,1mg/100mL de TBE segundo Sambrook *et al.* (1989) por 20 minutos, sendo em seguida lavados no mesmo tampão e visualizados sob luz UV (254nm) em transluminador (Utralum 100).

4.6.6 Recuperação de fragmentos de DNA a partir de géis de agarose

Pequenos fragmentos de DNA foram isolados do gel de agarose, recortando-se a banda correspondente ao fragmento de interesse, os quais foram purificados utilizando o “kit” de purificação Glass Max (GIBCO BRL Life Technologies, Inc). A banda recortada do gel foi pesada e após isto, adicionou-se solução de ligação (iodeto de sódio 6M) fornecida pelo “kit” (para cada 1 grama de gel foram adicionados 3 mL de solução de ligação), incubando-se a 50 °C até o gel estar totalmente dissolvido. A matriz de sílica (Glass Max fornecida pelo “kit”) foi ressuspensa com agitação vigorosa e 10 µL foram adicionados na mistura solução de ligação e DNA e agitando-se por inversão por 2 horas na presença de iodeto de sódio, de forma que o DNA ligou-se à matriz de sílica. A mistura foi

centrifugada por 20 segundos e o sobrenadante descartado, o “pellet” contendo o complexo DNA-sílica, foi lavado com 500 µL de tampão de lavagem (fornecido com o “kit”) e centrifugado a 13.000 rpm, por 20 segundos. Esta lavagem foi repetida por mais duas vezes para a remoção de impurezas e do iodeto de sódio. O “pellet” foi mantido em dessecador até secar totalmente, o DNA foi então eluído utilizando água destilada autoclavada (20 µL). Para eluição do DNA, o complexo DNA-sílica após ser ressuspenso em água destilada, foi aquecido por 30 minutos a 50 °C. Após centrifugação a 13.000 rpm por 20 segundos o DNA de interesse foi então recuperado cuidadosamente.

4.6.7 Preparo de células competentes

As linhagens de *Escherichia coli* XLI Blue e/ou *Escherichia coli* S17-1 foram inoculadas em 25mL de meio LB, contendo MgCl₂ 10 mM e MgSO₄ 10 mM e sempre que necessário, o antibiótico apropriado. Foram incubadas em agitador rotativo a 37°C até uma DO₆₅₀ = 0,3-0,5. Em tubos estéreis, centrifugaram-se 8mL da cultura por 15 min, 4.000 rpm/ 4°C. O “pellet” foi ressuspenso com 4mL de tampão de transformação (Tris-base 10 mM; CaCl₂ 50 mM; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM), as células foram então mantidas por 15 minutos em banho de gelo e novamente centrifugadas. Para obtenção de células competentes, o “pellet” foi ressuspenso em 0,8 mL de tampão de transformação, dividido em alíquotas de 200µL e mantidas em banho de gelo. As células foram utilizadas imediatamente ou estocadas até o dia seguinte sob refrigeração de 5 a 8 °C.

4.6.8 Transferência de plasmídeos por transformação

Para cada 200µL de células competentes, adicionaram-se 5µL de DNA, incubou-se a mistura em banho de gelo por 30 minutos submentendo a um choque térmico a 42 °C por 90 segundos e resfriando-se imediatamente em banho de gelo. Foram adicionados 600µL de meio LB e então incubadas por 1 hora à 37 °C. Clones transformantes foram selecionados em meio de cultura

contendo antibióticos apropriados. IPTG (isopropil-tio- β -D-galactosídeo) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -Dgalactosídeo) foram adicionados, quando necessário, para diferenciar clones recombinantes contendo ou não o inserto de DNA.

4.6.9 Construção de plasmídeos e linhagens bacterianas recombinantes

O operon de biossíntese de P3HB em *C. necator* consiste de três genes (*phaCAB*) que codificam, respectivamente, para PHA sintase, β -cetotiolase e 3-cetoacil-CoA redutase (Schubert *et al.*, 1988).

O plasmídeo pJM9131 (figura 6 - Kidwell *et al.*, 1995) abriga o operon *phaCAB*. Entretanto, esse plasmídeo apresenta origem de replicação que permite sua manutenção em *E. coli*, mas não em *Cupriavidus*. Assim, para construção de linhagens recombinantes de *C. necator* abrigando genes de biossíntese de PHA foi necessário a transferência desses genes para uma vetor de amplo espectro de hospedeiros. O vetor escolhido para essa finalidade foi o pBBR1MCS-2 (figura 7 – Kovach *et al.*, 1995).

A partir de pJM9131, foi construído o plasmídeo pJM9131 Δ *phaA*, ou seja, após digestão com a enzima de restrição *StuI* ligação do fragmento maior obtido, foi gerado um plasmídeo no qual a maior parte do gene *phaA* havia sido removido, resultando em uma nova construção na qual os genes *phaC* e *phaB* estão sob o controle do promotor σ^{70} original do operon *phaCAB* (Schubert *et al.*, 1988), conforme apresentado na figura 8.

Para obtenção apenas do gene *phaB*, o plasmídeo pJM9131 Δ *phaA* foi digerido com as enzimas de restrição *StuI* e *EcoRV* e religado. Esse plasmídeo foi denominado pJM9131 Δ *phaCA* (figura 9). Desta forma, eliminou-se boa parte do

gene *phaC* e o gene *phaB* permaneceu sob o controle do promotor σ^{70} original do operon *phaCAB*.

Para a clonagem do gene *phaB* no vetor de amplo espectro de hospedeiros, o plasmídeo pJM9131 Δ *phaCA* foi digerido com a enzima de restrição *Hind*III e os fragmentos resultantes dessa digestão foram ligados ao vetor pBBR1MCS-2 também digerido com *Hind*III (figura 9).

Figura 6: Plasmídeo pJM9131 abriga o operon *phaCAB* (Kidwell et al., 1995)

Figura 7: Vetor pBBR1MCS-2 (Kovach *et al.*, 1995)

Todos os produtos de reação de ligação na construção de plasmídeos foram transferidos por transformação para *E. coli* XL1Blue pNPTs::E2ΔS1, após seleção de clones brancos em meio LBK (Luria Bertani contendo canamicina – 50 mg/mL) contendo IPTG/Xgal (isopropil tio-β-D-galactosídeo/ 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo). A análise dos plasmídeos recuperados destes clones confirmou o sucesso da clonagem.

O plasmídeo construído (pBBR1MCS-2::*phaB*), assim como o vetor de amplo espectro de hospedeiros (pBBR1MCS-2), foram transferidos por transformação para *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) e, em seguida, por conjugação, para *C. necator* IPT-026 sendo utilizado para os ensaios em biorreator pois o que se pretende é um aumento do fluxo de 3-cetoacil-CoA da β-oxidação para a síntese de PHA decorrente da atividade aumentada da enzima 3-cetoacil-CoA redutase (*phaB*).

Figura 8: Construções dos plasmídeos pJM9131Δ*phaA* e pJM9131Δ*phaCA*

Figura 9: Construção e transferência do plasmídeo pJM9131Δ*phaCA* para pBBR1MCS-2

4.7 Ensaios em biorreatores

4.7.1 Pré-Inóculo e Inóculo

Pré-inóculo: para os ensaios em biorreator, foi aliquoteado 1 mL da cultura estoque em 50 mL de meio CN e mantido em agitador rotativo a 200 rpm/ 30 °C por 24 horas.

Inóculo: o volume obtido da incubação anterior foi transferido para 450 mL de meio mineral (MM) e mantido em agitador rotativo a 200 rpm/ 30 °C por 24 horas.

4.7.2 Descrição dos ensaios em frascos agitados e em biorreatores

Os ensaios de acúmulo de P3HB/3HA foram realizados em duas fases: na primeira procedeu-se o crescimento celular em meio de cultura sintético balanceado modificado a partir de Ramsay *et al.*, (1990), contendo respectivamente em g/L: óleo de soja 5,0; KH_2PO_4 0,35; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,28; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01; Citrato Férrico Amoniacal 0,06 e 1 mL/L de solução de elementos traços (H_3BO_3 0,3 g/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 30,0 mg/L; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30,0 mg/L; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20,0 mg/L e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10,0 mg/L). Após esgotamento da fonte de nitrogênio foi adicionado ou não no biorreator o caprolato de sódio e/ou acrilato de sódio. Foram adotados valores já previamente estabelecidos em nossos laboratórios de temperatura de 30°C; pH 7,0 (Pereira, 2002). Valores de aporte de óleo vegetal, ácidos graxos e acrílico foram estimados conforme os ensaios realizados em frascos agitados. Valores de aporte de aeração foram estabelecidos entre situação de suficiência de oxigênio dissolvido (acima de 20% da saturação de ar) e valores limitantes (abaixo de 10% da saturação de ar).

4.7.3 Produção de PHAmcl em biorreator

Duas são as estratégias para a produção em biorreator de PHAmcl. Na mais comumente empregada, o processo é operado de modo descontínuo, aplicando-se um desbalanceamento nutricional do meio de cultura para promover o acúmulo do polímero. Após a fase de crescimento celular em meio desbalanceado, impõe-se a limitação de um nutriente (Nx) imprescindível para a multiplicação celular, ou seja, a fonte de carbono. A outra estratégia consiste na operação do biorreator de modo contínuo, buscando modular a relação fonte de carbono/Nx e, em decorrência, o crescimento celular e acúmulo de PHA.

Uma vez que a fonte de carbono representa um importante item nos custos de produção de PHA, processos para a produção comercial em grande escala deverão considerar substratos a serem utilizados de baixo custo (Gomez, 2000). Assim, mais uma vez, fica evidente que o uso de óleos vegetais, bem como ácidos graxos derivados são uma excelente fonte de substratos a serem utilizados para a produção de PHAmcl.

4.7.4 Influência da alimentação de substratos e de ácido acrílico

Ensaio em biorreatores foram realizados em equipamentos B. Braun modelos Q (1 L de volume útil) e ED (10 L), e NBS modelo MF114 (10 L) conseguido através da limitação de nitrogênio, utilizando processo descontínuo durante a fase de acúmulo. Os biorreatores foram acoplados ao analisador de gases de saída Hartmann Braun para a análise de CO₂ (mod. URAS 10P) e O₂ (mod. MAGNOS 6G). Os biorreatores possuem controles automáticos de temperatura, pH e oxigênio dissolvido e são munidos de bombas e balanças para introdução de soluções para controle do pH. O objetivo foi o estabelecimento da influência das alimentações de óleo vegetal, ácidos graxos e de ácido acrílico como modulador da β -oxidação nas velocidades relativas e fatores de conversão

na síntese de unidades 3HB e 3HAMcl, levando assim à formação de polímeros de diferentes composições e no teor do PHA obtido.

4.7.5 Condições de cultivo em biorreatores

As condições de cultivos para os ensaios em biorreator com *Burkholderia cepacia* IPT-048 estão apresentadas nas tabelas 11 e 12, enquanto que, na tabela 13 foi apresentado o plano de cultivo das linhagens *Cupriavidus necator* IPT-026 e *C. necator* IPT-026::*phaB* para a confirmação da presença do plasmídeo construído.

Tabela 11 - Plano para o cultivo de *Burkholderia cepacia* IPT-048 em biorreator contendo 5,0 g/L de substrato(s) com ou sem ácido acrílico

Ensaio	Fonte de carbono (5,0 g/L)		Ácido acrílico (2,5mM)
	Óleo de soja	Caprolato de sódio	
1	OS	-	-
2	OS	-	Ac
3	OS	C6	-
4	OS	C6	-
5	OS	-	Ac
6	OS	C6	Ac
7	OS	-	Ac
8	OS	-	-

(OS) adição de 5,0 g/L de óleo de soja como fonte de carbono; (C6) – adição de 5,0 g/L de ácido capróico como co-substrato e adição (Ac) ou não (-) do ácido acrílico como inibir de beta-oxidação.

Tabela 12 - Plano para o cultivo de *Cupriavidus necator* IPT-026 e *C. necator* IPT-026::*phaB* em biorreator contendo 5,0 g/L de substrato

Ensaio	Óleo de soja (5,0 g/L)	
	IPT-026*	IPT-026:: <i>phaB</i> **
1	+	-
2	-	+
3	-	+

(*) – Ensaio realizado com *Cupriavidus necator* IPT-026; (**) - Ensaio realizado com *Cupriavidus necator* IPT-026::*phaB*

Tabela 13 - Plano para o cultivo de *Cupriavidus necator* IPT-026 e *C. necator* IPT-026::*phaB* para a confirmação da presença do plasmídeo construído em frascos agitados contendo 5,0 g/L de substrato

Ensaio	IPT-026*	IPT-026:: <i>phaB</i> **	Óleo de Soja	Ácido caprílico	Ácido acrílico
1	+	-	(OS)	-	-
2	+	-	(OS)	-	-
3	-	+	(OS)	-	Ac
4	-	+	(OS)	-	Ac
5	+	-	-	(C8)	-
6	+	-	-	(C8)	-
7	-	+	-	(C8)	Ac
8	-	+	-	(C8)	Ac

(OS) adição de 5g/L de óleo de soja; (C8) – adição de 5g/L de ácido caprílico, adição (Ac) ou não (-) do ácido acrílico como inibidor de beta-oxidação. (+) linhagens utilizadas com os diferentes substratos com a adição; (*) – ensaio realizado com *Cupriavidus necator* IPT-026; (**) - ensaios realizados com *Cupriavidus necator* IPT-026::*phaB*.

4.7.6 Concentração celular

A concentração da biomassa total foi determinada centrifugando-se alíquotas de 10 mL do cultivo (10.000 rpm, 10 min, 4°C). As células foram ressuspensas em solução salina 0,85% + TWEEN 80 (0,1%) juntamente com 2 mL de *n*-hexano sendo agitadas vigorosamente e novamente centrifugadas. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células resultantes foram suspensas em água e filtradas em membranas de poro 0,45 µm (Millipore). A membrana com as células foi seca a 105 °C até massa constante, resfriadas em dessecador por cerca de 20 min e pesadas em balança analítica, obtendo-se, assim, a massa seca presente no volume amostrado.

A partir dos resultados obtidos da biomassa total (X_t) foi calculada a biomassa residual (X_r). A concentração de biomassa residual foi definida como:

$$X_r = \frac{(100 - \% \text{ PHA})}{100} \cdot X_t \quad (1)$$

Onde:

X_t : concentração da biomassa total (g/L)

%PHA: percentual de PHA em relação à massa seca celular

4.8 Amostragem de óleo de soja

A estimativa da concentração do óleo de soja foi realizada por procedimento modificado a partir de Kahar *et al.*, (2004), que consiste na extração de solúveis de uma amostra do meio de cultivo em hexano. Alíquotas de cerca de 30 mL foram retiradas sendo vigorosamente agitada durante 1 minuto juntamente com *n*-hexano (1:1). Posteriormente, a separação das fases, 20 mL da fração orgânica foi transferida para um tubo previamente dessecado e pesado. O

excesso de *n*-hexano foi evaporado em atmosfera de nitrogênio e armazenado em dessecador a vácuo até a completa evaporação. Posteriormente a evaporação do solvente o óleo residual expressou o valor em massa de óleo de soja/volume da amostra.

Os fatores de conversão de substrato a polímero e a células foram definidos respectivamente, como sendo:

4.9 Teor e composição do PHA

A determinação de P3HB foi realizada por cromatografia gasosa (Gomez *et al.*, 1996) utilizando-se uma coluna capilar HP5, operando na faixa de 100 a 210°C, utilizando gás Hélio como gás de arraste a uma vazão de 0,8 mL/min.

A amostra, cerca de 20 mg de célula liofilizada, foi previamente submetida a propanólise. A propanólise consiste no tratamento de células liofilizadas com 0,2 mL de uma solução de ácido benzóico (40 g/L), 2,0 mL de solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v) e 0,2 de 1,2-dicloroetano. Os tubos foram fechados, agitados vigorosamente e mantidos em banho-maria por 3 horas a 100°C. Após o resfriamento, foram adicionados 4,0 mL de água destilada, agitando-se novamente e a fase orgânica contendo os propil-ésteres foi injetada no cromatógrafo para a determinação da composição dos polihidroxialcanoatos (Riis e Mai, 1988). O mesmo procedimento foi feito para determinar as curvas padrões, utilizando desta vez padrões conhecidos contendo 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg.

4.10 Nitrogênio amoniacal

As concentrações de nitrogênio foram determinadas pela análise do sobrenadante filtrado proveniente das amostras da cultura sendo realizada em

potenciômetro (Procyon – mod. SA720) com eletrodo específico para a detecção de amônia (Orion – mod. 95-12) após a alcalinização da amostra com NaOH 10M, onde o íon NH_4^+ proveniente do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ existente no meio de cultura é deslocado sob a forma de NH_3 . A calibração deste foi realizada com o uso de soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ contendo aproximadamente 10, 25, 50, 100, 250 e 500 ppm de nitrogênio.

4.11 Análise dos Resultados

A velocidade de crescimento celular (μ_{Xr}) foi analisada pela correlação entre o Ln da concentração de biomassa residual (Ln Xr) e o tempo de cultivo. A correlação linear entre estas grandezas identifica uma fase de multiplicação exponencial e o coeficiente angular desta correlação é a velocidade específica de multiplicação que é uma constante durante a fase exponencial. Esta correlação está representada pela equação a seguir:

$$\text{Ln } \text{Xr} = \mu_{\text{Xr}} * t + \text{Ln } \text{X}_{\text{R0}} \quad (2)$$

Ao longo dos ensaios foram retiradas amostras periódicas e analisadas as concentrações de biomassa total, P3HB/3HAMcl, teor de oxigênio e CO_2 nos gases de saída dos biorreatores. De posse desses dados, foram avaliadas as velocidades específicas de consumo dos substratos óleo e oxigênio, as velocidades específicas de produção dos copolímeros, a produção de CO_2 bem como os fatores de conversão dos substratos aos monômeros 3HB e 3HAMcl.

A concentração do polímero 3HA é dada por: $3\text{HA} = 3\text{HB}$

Os fatores de conversão de substratos a polímero e as células foram definidos respectivamente, como sendo:

$$Y_{HA/S} = \frac{3H_A - 3H_{A_0}}{S_{cons}} \quad (3)$$

$$Y_{X/S} = \frac{3H_{Xr} - 3H_{Xr_0}}{S_{cons}} \quad (4)$$

Onde: H_{A_0} e X_{r0} foram respectivamente, as concentrações iniciais de polímero e de células residuais e S_{cons} , a quantidade de substrato consumido.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de facilitar a discussão do referido estudo, os resultados estão divididos em 5 etapas.

- (I) Seleção de microrganismos em frascos agitados
- (II) Ensaio em biorreator utilizando a linhagem *Burkholderia cepacia* IPT-048
- (III) Obtenção de linhagens recombinantes produtoras de polihidroxialcanoatos: influência do gene acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente (*phaB*)
- (IV) Ensaio utilizando as linhagens *Cupriavidus necator* IPT-026 e *C. necator* recombinante IPT-026::*phaB*
- (V) identificação do gene *phaB* na linhagem IPT-026::*phaB* em ensaios em frascos agitados

5.1 Etapa I - Seleção de microrganismos em frascos agitados

Um dos fatores impeditivos para o uso de polihidroxialcanoatos em grande escala está associado à redução dos custos de produção. Três fatores são importantes na determinação do custo de produção de PHA: fonte de carbono, investimento depende da planta de produção e o custo do processo de extração e purificação (Choi e Lee, 1997; Nonato *et al.*, 2001). Diversos trabalhos têm buscado fontes de carbono alternativas como: resíduos da produção agrícola (Page, 1997; Silva *et al.*, 2004; Tsuge, 2002) ou da indústria alimentícia (Wong e Lee, 1998; Ahn *et al.*, 2000; Nikel *et al.*, 2006).

Outra estratégia importante no desenvolvimento tecnológico da produção de PHA está associada à exploração do potencial tecnológico de diferentes

polímeros dessa família, através da utilização de fontes de carbono que funcionam como precursores para a síntese de PHA com composição variável e, dessa forma, promoveriam variações nas propriedades físicas e mecânicas e, conseqüentemente, nas possíveis aplicações (Tsuge, 2002). Além disso, para atingir esse objetivo, a engenharia metabólica também tem contribuído de maneira expressiva (Rehm *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2004).

A fim de escolher uma linhagem que atendesse às expectativas foram utilizadas, em princípio, as seguintes linhagens: *Cupriavidus necator* DSM545 (IPT-026), *Cupriavidus necator* H16 (IPT-027), *Pseudomonas* sp. (IPT-066), *Burkholderia cepacia* (IPT-048) e *Burkholderia sacchari* (IPT-189) mantidas no banco de cepas do Agrupamento de Biotecnologia.

Os ensaios de acúmulo de PHA foram realizados em duas fases: na primeira procedeu-se o crescimento celular em meio de cultura sintético balanceado, segundo Ramsay *et al.* (1990). Para a multiplicação celular foi disponibilizado às linhagens como fonte de carbono os seguintes ácidos graxos livres: ácido capróico, ácido caprílico e/ou ácido palmítico, bem como, óleo de soja comercial. Após esgotamento da fonte de nitrogênio, em algumas variáveis, foram adicionadas um inibidor da beta-oxidação (ácido acrílico). Os procedimentos e quantidades foram previamente determinados, induzindo-se assim, o acúmulo intracelular do polímero.

Valores da concentração de óleo de soja, ácidos graxos e/ou ácido acrílico foram estimados nos ensaios realizados em frascos agitados (parte I) e dados recolhidos da literatura.

5.1.1 *Pseudomonas* sp. (IPT-066)

De acordo com a tabela 14 foram utilizados os ácidos capróico (C6), caprílico (C8), palmítico (C16) e o óleo de soja (OS) para a avaliação do comportamento de *Pseudomonas* spp IPT-066 na produção de PHAs. Através dos ensaios realizados foi verificado que a linhagem apresentava a capacidade de síntese e acúmulo somente de P3HB.

A tabela 14 mostra que, durante o período de incubação de 48 horas, quando fornecido ácido caprílico, o rendimento máximo observado de PHA foi de 25,7% sendo que este total correspondia a 3HB (figura 11). O mesmo foi observado para ácido capróico, entretanto, a quantidade média de 3HB foi de 29,2% (figura 10).

Figura 10: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Pseudomonas* spp. IPT-066 durante 48h e 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de ácido capróico (C6)

Figura 11: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Pseudomonas* spp. IPT-066 durante 48h e 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de ácido caprílico (C8).

Tabela 14 – Médias dos resultados obtidos do cultivo de *Pseudomonas* IPT-066 em meio mineral contendo, respectivamente, 2 g/L de diferentes ácidos graxos livres e óleo de soja

Substrato	Acrilato	Tempo	MSC	PHA						
				3HB		3HV		3HHx		% PHA
				%	mol%	%	mol%	%	mol%	
Ácido caprílico	0	48	2,04	29,2	100	-	-	-	-	29,2
(C6)	0	96	-	28,1	100	-	-	-	-	28,1
Ácido caprílico	0	48	2,27	25,7	100	-	-	-	-	25,7
(C8)	0	96	-	31,3	100	-	-	-	-	31,3
Ácido Palmítico	0	48	2,07	30,5	100	-	-	-	-	30,5
(C16)	0	96	-	38,3	100	-	-	-	-	38,3
Óleo de Soja	0	48	1,7	18,1	100	-	-	-	-	18,1
(OS)	0	96	-	12,7	100	-	-	-	-	12,7

MSC – massa seca celular, PHA – polihidroxicanoatos, 3HB – 3-hidroxiobutirato, 3HV - 3-hidroxi valerato, 3HHx - 3-hidroxi hexanoato, %PHA – porcentagem total de polihidroxicanoatos.

Não foi verificado a dificuldade desta linhagem multiplicar-se nos diferentes substratos alcançando um Xt médio de 2,0 g/L após 48 horas, com exceção dos ensaios disponibilizando óleo de soja no qual a população alcançada foi de 1,7 g/L na 48ª hora de incubação. Durante o período de incubação foi verificado que *Pseudomonas* spp. em óleo de soja (OS) atingiu 18,1% correspondente a 3-hidroxibutirato (figura 13). Apesar da maior população microbiana (2,27 g/L) ter sido na presença de ácido caprílico a quantidade de 3HB foi de 25,7%, enquanto que, na presença de ácido palmítico, cujo Xt foi de 2,07 g/L o total de 3HB foi de 30,5%. Devemos enfatizar que, os resultados de 3HB obtidos, quando disponibilizado ácido palmítico, estão superestimados devido às dificuldades da solubilização do substrato e, conseqüentemente, a presença de resíduos nas células utilizadas nas análises cromatográficas (figura 12).

Na segunda etapa do ensaio, o qual permaneceu em agitação constante até a 96ª hora, observou-se um aumento pouco significativo na quantidade de 3HB, ou seja, 31,3% para o ácido caprílico e 38,3% para o ácido palmítico. Para o ácido caprílico e óleo de soja foi observado uma redução na quantidade do polímero.

O comportamento de *Pseudomonas* sp. observado e a quantidade de polímeros obtidos com a linhagem julgou-se, em princípio, inviável a continuidade em ensaios posteriores uma vez que, outras linhagens possibilitaram a obtenção de melhores resultados superiores na presença de óleo de soja.

Figura 12: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Pseudomonas* spp. IPT-066 durante 48h e 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de ácido palmítico (C16).

Figura 13: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Pseudomonas* spp. IPT-066 durante 48h e 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de óleo de soja (OS).

5.1.2 *Cupriavidus necator* H16 (IPT-027)

Foram utilizados diferentes substratos para a avaliação do comportamento de *Cupriavidus necator* H16 IPT-027 e produção de PHAs a partir de ácidos graxos livres e óleo de soja na presença do inibidor da beta oxidação, o ácido acrílico (tabela 15).

Figura 14: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Cupriavidus necator* H16 IPT-027 durante 48h e 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de ácido capróico (C6) e ácido acrílico nas concentrações de 0, 10 e 30 mM.

Na presença do ácido capróico não foi observado a síntese de PHA nas primeiras 48 horas de incubação, entretanto, após 96 horas detectou-se 47,83% de PHA sendo 47,75% de 3HB e 0,08% de 3HHx (0,12 mol%). Notou-se que, com a adição do acrilato nas concentrações de 10 e 30 mM não atuou significativamente na produção de outros PHAs (figura 14) assim como interferiu na capacidade de multiplicação e consequentemente acúmulo.

Na presença de ácido capróico a linhagem multiplicou-se na diferentes concentrações. O maior rendimento de células (Xt) observado foi na ausência de ácido acrílico, ou seja, 1,35 g/L, correspondendo a 47,75% de 3HB e 0,08% de 3HHx (equivalendo a 0,12%mol). Com este substrato, ou seja, o ácido capróico, a quantidade de células quando adicionados ácido acrílico 10 ou 30 mM foi de 0,41 e 0,55 g/L após 96 horas de incubação com um rendimento de 3HB 0,94 e 0,60% na 96ª hora, respectivamente. De acordo com estes resultados, percebeu-se a redução da capacidade de multiplicação e síntese de PHAs conforme a quantidade ácido acrílico adicionado (tabela 15).

Tabela 15 – Médias dos resultados obtidos do cultivo de *Cupriavidus necator* H16 IPT-027 em meio mineral contendo, respectivamente, 2 g/L de diferentes ácidos graxos livres e óleo de soja

Substrato	Acrilato	Tempo	MSC	PHA						
				3HB		3HV		3HHx		% PHA
				%	mol%	%	mol%	%	mol%	
Ácido capróico (C6)	0	48	0,26	-	-	-	-	-	-	-
	0	96	1,35	47,75	99,88	-	-	0,08	0,12	47,83
	10	96	0,41	0,94	100,0	-	-	-	-	0,94
	30	96	0,55	0,60	100,0	-	-	-	-	0,6
Ácido caprílico (C8)	0	48	1,58	35,69	100,0	-	-	-	-	35,69
	0	96	1,67	66,19	100,0	-	-	-	-	66,19
	10	96	0,47	2,57	100,0	-	-	-	-	2,57
Ácido Palmítico (C16)	0	48	2,02	40,90	100,0	-	-	-	-	40,9
	0	96	1,65	66,46	100,0	-	-	-	-	66,46
	10	96	1,09	9,77	98,97	-	-	0,13	1,03	9,91
Óleo de Soja (OS)	0	48	0,79	5,25	100,0	-	-	-	-	5,25
	0	96	1,76	65,32	100,0	-	-	-	-	65,32
	10	96	1,07	40,76	99,17	-	-	0,45	0,83	41,21
	30	96	0,99	1,49	100,0	-	-	-	-	1,49

MSC – massa celular seca, PHA – polihidroxialcanoatos, 3HB – 3-hidroxi butirato, 3HV - 3-hidroxi valerato, 3HHx - 3-hidroxi hexanoato, %PHA – porcentagem de polihidroxialcanoatos.

Figura 15: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Cupriavidus necator* spp. H16 IPT-027 durante 48h e 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de ácido caprílico (C8) e ácido acrílico nas concentrações de 0, 10 e 30 mM.

Nos ensaios contendo o ácido caprílico a quantidade de 3HB na 48ª hora de incubação foi de 35,69%, com um Xt de 1,58g/L (figura 15).

A maior quantidade de células (Xt) observada se deu com a ausência de ácido acrílico e após um período de 96 horas de incubação, ou seja, 1,67 g/L, correspondendo a 66,19% de 3HB. Diferentemente do ensaio anterior, ou seja disponibilizando o ácido capróico, não foi detectado a presença de 3HHx, porém, a quantidade de 3HB foi superior. A maior quantidade de 3HB se deve, provavelmente ao fato, da linhagem utilizar parte desta cadeia para a formação de acetil-CoA e com a redução da fonte de nitrogênio aumento do acúmulo de cadeias com quatro carbonos. Nesta condição, diferentemente do ensaio adicionando-se ácido capróico não foi observado multiplicação microbiana quando adicionado o ácido acrílico à 30 mM.

Figura 16: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Cupriavidus necator* spp. H16 IPT-027 durante 48h e 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de ácido palmítico (C16) e ácido acrílico nas concentrações de 0, 10 e 30 mM.

Com a disponibilização do ácido palmítico durante o período de 48 horas, a quantidade máxima de PHA alcançada foi de 40,90% e um X_t de cerca de 2,0 g/L sendo este total correspondente a 3HB (figura 16).

Após 96 horas de incubação a concentração de 3HB foi semelhante ao observado no ensaio adicionando ácido caprílico. Quando incubado com 10 mM de ácido acrílico verificou-se que 3HHx alcançou numa concentração de 0,13% (correspondente a 1,03%mol), porém menor quantidade de PHA total, ou seja, 9,91% da massa seca celular.

Figura 17: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Cupriavidus necator* spp. H16 IPT-027 durante 48h e 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de óleo de soja (OS) e ácido acrílico nas concentrações de 0, 10 e 30 mM.

A figura 17, a qual foi repetido a mesma condição dos ensaios anteriores, mostra o comportamento de *C. necator* H16 IPT-027 na presença de óleo de soja (OS), bem como, a população total (Xt g/L). Quando disponibilizado o óleo de soja observou-se, após a 48ª hora, que a quantidade de 3HB foi de 5,25%. Na 96ª hora de incubação o total de PHA detectado foi de 65,32% e, diferentemente do ensaio adicionado de ácido caprílico, não foi verificado a presença de 3HHx. Com a adição do ácido acrílico à 10 mM a quantidade de 3HB verificada na 96ª hora foi de 40,76% (correspondente a 99,17 mol%) e 0,45% de 3HHx (correspondente a 0,83 mol%), enquanto que, houve uma redução significativa da multiplicação celular e consequentemente a síntese de PHA quando adicionado 30 mM de ácido acrílico.

Conforme os resultados obtidos com a linhagem *C. necator* H16 IPT-027 com a disponibilização de ácido caprílico, palmítico e óleo de soja como fonte de carbono na presença de ácido acrílico 30 mM, a linhagem teve sua capacidade

metabólica comprometida e, ainda, a quantidade de 3HB foi inferior às demais condições (tabela 15).

A adição de acrilato 10 mM também causou a redução da capacidade de multiplicação e produção pela linhagem testada, principalmente quando disponibilizado os ácidos capróico e caprílico tendo sido detectado um teor 0,94% e 2,57% de 3HB. Com a disponibilização de ácido palmítico e óleo de soja juntamente com o ácido acrílico 10 mM o Xt foi de 1,09 e 1,07 g/L, com uma quantidade de 9,77% e 40,76% de 3HB, porém observou-se que do total de PHA verificado 0,13 e 0,45% correspondia a 3HHx (equivalente de 1,03 e 0,83 mol%, respectivamente).

Apesar dos dados obtidos, esta linhagem quando comparada com *Cupriavidus necator* DSM545 IPT-026 não foi considerada satisfatória para dar continuidade nos testes.

5.1.3 *Cupriavidus necator* DSM545 (IPT-026)

Para avaliar a linhagem *Cupriavidus necator* DSM545 (IPT-026) quanto a capacidade de síntese de PHA foram testadas diferentes condições conforme tabela 16.

Tabela 16 – Variáveis testadas para o cultivo em frascos agitados à 30°/ 200 rpm de *Cupriavidus necator* DSM545 IPT-026 em meio mineral contendo, respectivamente, 2 g/L de diferentes ácidos graxos livres e óleo de soja

Condição	Substrato (2g/L)	Tempo (h)	Ácido acrílico (mM)	Análises
1	C6; C8 e C16	48	0	MSC e PHAs
2	C6; C8 e C16	96	0	MSC e PHAs
3	C6; C8; C16 e OS	96	0; 10 e 30	MSC e PHAs
4	C6 e OS	96	0; 2,5 e 10	MSC e PHAs
5	C6 e OS	96	0 e 2,5	MSC e PHAs
6	C6 e OS	96	0 e 2,5	MSC e PHAs
7	OS	96	0 e 2,5	MSC e PHAs

C6 - ácido capróico; C8 - ácido caprílico; C16 - ácido palmítico; OS – óleo de soja; MSC- massa seca celular; PHAs – polihidroxialcanoatos.

Na tabela 17 foi apresentado a média dos resultados obtidos nos diferentes ensaios utilizando a linhagem *C. necator* DSM545 IPT-026.

Para esta linhagem, quando disponibilizado o ácido capróico tanto na ausência quanto em concentrações até 10 mM de ácido acrílico, foram obtidos cerca de 70% de PHA total (tabela 17 e figura 18).

Verificou-se um constante aumento no rendimento de PHA partindo de 2,40% (início da incubação) alcançando 61,30% na 96^a hora. Durante a multiplicação, na ausência de acrilato, foi observado que da 24^a a 96^a hora a presença de 3HHx totalizava um máximo de 0,25% (0,44 mol%) enquanto que na 36^a hora de incubação o X_t alcançou 1,61 g/L (figura 18).

Figura 18: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Cupriavidus necator* spp. DSM545 IPT-026 durante 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de ácido capróico (C6).

O máximo de PHA obtido, na ausência do ácido acrílico, foi de 61,30% sendo 61,21% de 3HB (99,7 mol%) e 0,90% de 3HHx (0,31 mol%). Na 72ª hora de incubação também foi detectado 3HV numa concentração de 0,36% (0,80 mol%) e 0,27 de 3HHx (0,35 mol%).

Quando adicionado o ácido acrílico 2,5 mM a quantidade máxima de PHA foi de 35,77% na 96ª hora de incubação sendo que 34,58% correspondia a 3HB (85,8 mol%) e 1,20% de 3HHx (14,19 mol%) (figura 19). Semelhante ao observado na ausência de acrilato, foi detectado 3HV na 72ª hora (0,69%) e a presença de 3HHx ocorreu entre a 36ª e 96ª horas de incubação em quantidades variando de 1,47% (8,78 mol%) a 1,20 % (14,19 mol%). Nesta condição, foi detectado um Xt 0,11 a 1,19 g/L, enquanto que, na ausência de acrilato o Xt foi de 0,13 a 1,75 g/L.

Figura 19: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Cupriavidus necator* spp. DSM545 IPT-026 durante 96h em meio mineral disponibilizando de 2g/L de ácido capróico (C6) e ácido acrílico nas concentrações de 2,5 mM.

Após a adição do ácido acrílico (10 mM) observou-se na 96^a hora uma quantidade de PHA em cerca de 70%, cujo valor era semelhante ao observado na ausência do inibidor. A medida que foi aumentado a quantidade do inibidor (30 mM) observou-se a redução significativa da quantidade de 3HB. Em ambas as concentrações os Xt obtidos foram de 0,48 e 0,37 g/L. Nesta condição, o qual era esperado maior acúmulo de PHAmcl, não foi observado a presença de 3HHx.

Tabela 17 – Médias dos resultados obtidos do cultivo de *Cupriavidus necator* DSM545 IPT-026 em meio mineral contendo, respectivamente, 2 g/L de diferentes ácidos graxos livres e óleo de soja

Substrato 2g/L	Acrilato mM	Tempo h	MSC g/L	PHA						
				3HB		3HV		3HHx		% PHA
				%	mol%	%	mol%	%	mol%	
Ácido capróico (C6)	10	96	0,48	70,85	100,0	-	-	-	-	70,85
	30	96	0,37	20,54	100,0	-	-	-	-	20,54
Ácido caprílico (C8)	0	48	1,08	26,02	100,0	-	-	-	-	26,02
	0	96	0,35	53,47	99,9	-	-	0,07	0,09	53,53
	10	96	0,25	4,55	99,3	-	-	0,05	0,75	4,60
Ácido palmítico (C16)	0	48	1,03	19,42	100,0	-	-	-	-	19,42
	0	96	1,71	60,33	100,0	-	-	-	-	60,33
	10	96	0,20	10,36	98,21	-	-	0,25	1,79	10,62
Óleo de Soja (OS)	5	48	0,85	5,35	100,0	-	-	-	-	5,35
	5	72	2,32	55,45	100,0	-	-	-	-	55,45
	5	96	2,70	77,44	100,0	-	-	-	-	77,44
	10	96	1,18	51,83	99,29	-	-	0,49	0,71	52,32
	30	96	0,55	1,94	100,0	-	-	-	-	1,94

MSC – massa celular seca, PHA – polihidroxicanoatos, 3HB – 3-hidroxiacetato, 3HV - 3-hidroxiacetato, 3HHx - 3-hidroxiheptanoato, %PHA – porcentagem total de polihidroxicanoatos.

Com a adição de ácido caprílico foi verificado que a linhagem *C. necator* DSM 545 IPT-026 também acumulava 3HHX, entretanto, em quantidades inferiores ao detectado com o ácido capróico. Após 48 horas de incubação o total de PHA detectado foi de 26,02%, enquanto que, na 96^a hora foi de 53,53%, sendo 53,48 de 3HB (99,9 mol%) e 0,07% de 3HHX (0,09 mol%). A medida que aumentou a concentração do inibidor não foi verificada multiplicação em uma concentração de 30 mM, porém, em ácido acrílico a 10 mM o Xt foi de 0,25 g/L com um total de 4,60% de PHA sendo 4,55 de 3HB (99,3 mol%) e 0,05% de 3HHx (0,75 mol%). Mesmo tendo sido observado o monômero HHx, quando disponibilizado o ácido caprílico, optou-se não dar continuidade com este substrato já que os resultados com ácido capróico mostraram-se superiores para a obtenção de PHAmcl.

Na presença de ácido palmítico e ausência de inibidor o Xt obtido foi de 1,03 g/L após 48 horas e 1,71 g/L na 96^a hora de incubação (tabela 17). Diferentemente ao observado com o ácido caprílico, foi obtido cerca de 60,0% de PHA, entretanto, sendo 100 mol% correspondia a 3HB. Na presença de acrilato 10,0 mM (96^a hora) a quantidade de PHA observada foi de 10,62% sendo 10,36% de 3HB (98,21 mol%) e 0,25 de 3HHx (1,79 mol%). Em razão da baixa quantidade de PHA considerou-se inviável a continuidade com ácido palmítico em ensaios posteriores, bem como, pela dificuldade de homogeneização do substrato em meio mineral.

Com a adição de óleo de soja os resultados mostraram-se promissores e semelhantes ao obtidos com o ácido caprílico e, diferentemente do observado, foi detectado a presença de 3HV apesar da reduzida concentração (figuras 20 e 21).

Figura 20: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Cupriavidus necator* spp. DSM545 IPT-026 durante 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de óleo de soja (OS).

Nesta condição e na ausência do ácido acrílico, o máximo de PHA em massa seca celular foi aproximadamente 80,0 % com cerca de 0,33% de 3HV (0,36 mol%). A quantidade de células durante o período de incubação variam de 1,11 a 5,29 g/L e a quantidade de PHA foi de cerca 60,0% entre a 36^a a 72^a hora de incubação, cuja totalidade molar foi de 3HB.

Ao analisar a condição juntamente com o inibidor a 2,5 mM, concentrações significativas de PHA foram detectadas na 96^a hora de incubação, ou seja, cerca de 85,0 % sendo 84,10 de 3HB (99,78 mol%) e 0,25 de 3HHx (0,22 mol%). Durante o período de incubação a variação média da multiplicação celular foi de 0,10 a 5,5 g/L. Entre a 36^a a 72^a hora de incubação verificou-se a presença de 3HV variando de 0,32 (0,50 mol%) a 0,28 % (0,41 mol%) e, ainda entre a 72^a e 96^a hora de incubação além de 3HV observou-se a presença de 3HHx (0,2 mol%) (figura 21).

Figura 21: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Cupriavidus necator* spp. DSM545 IPT-026 durante 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de óleo de soja (OS) e ácido acrílico na concentração de 2,5 mM.

Com a adição de ácido acrílico 5,0 mM foi verificado na 96^a hora de incubação quantidades significativas de PHA, ou seja, 77,40% sendo 100,0 mol% de 3HB. Com o aumento da concentração (10 mM), ocorreu uma redução da quantidade de PHA porém dos 52,32%, 51,83% correspondia a 3HB (99,29) e 0,49% (0,71 mol%) de 3HHx. Quando analisada com 30,0 mM observou uma redução significativa na capacidade de multiplicação celular, consequentemente na síntese de PHA (tabela 17).

Diversas condições são estudadas objetivando a síntese de PHA, quando o ácido propiônico é fornecido a *Cupriavidus necator* como única fonte de carbono, o polímero resultante possui cerca de 45 mol% em unidades de 3HV (Doi *et al.*, 1987; Anderson e Dawes, 1990). Supondo-se que em um polímero contendo 50 mol% de unidades de HV fosse formado, isto significaria que pelo menos 3/4 do ácido propiônico seria convertido a acetil-CoA (1/4 dos quais se condensaria com propionil-CoA para formar unidades de 3HV e 2/4 se condensaria na forma de acetil-CoA, aos pares, para formar unidade de 3HB. Esta observação assume uma grande importância industrial, já que o ácido propiônico é um substrato que apresenta um custo relativamente alto para a produção de PHAs (Silva *et al.*, 2000; Byrom, 1990; Satori, 1998). Em nossos ensaios, disponibilizamos ácidos graxos de cadeias pares, consequentemente tenderiam formar polímeros de cadeia pares. Este fato foi confirmado com a disponibilização dos ácidos caprílico e palmítico, no qual monômeros de HHx foram detectados na presença de ausência de ácido acrílico na 96^a hora de incubação. Como boa parte da composição do óleo de soja é formada por ácidos graxos pares de cadeia longa o mesmo foi observado. Um fato que chamou a atenção que, de acordo com a condição (presença do ácido acrílico) foi obtido polímeros de cadeia ímpares, ou seja, detecção de 3HV. Esta formação de 3HV, provavelmente, pode ser explicada pelo fato da linhagem *Cupriavidus necator* conseguir incorporar o inibidor com fonte de carbono e a consequente condensação de ácido acrílico com acetil-CoA resultou em cadeias de cinco carbonos.

A partir dos resultados obtidos considerou-se viável a continuidade de ensaios disponibilizando o ácido capróico e óleo de soja juntamente com o ácido acrílico em uma concentração máxima de 2,5 mM.

5.1.4 *Burkholderia cepacia* IPT-048

A fim de avaliar a linhagem *Burkholderia cepacia* IPT-048 quanto a capacidade de síntese de PHA foram testadas sete condições conforme apresentado na tabela 18.

Tabela 18 – Variáveis testadas para o cultivo em frascos agitados à 30°/ 200 rpm de *Burkholderia cepacia* (IPT-048) em meio mineral contendo 2 g/L de diferentes ácidos graxos livres e óleo de soja.

Condição	Substrato (2g/L)	Tempo (h)	Ácido acrílico (mM)	Análises
1	C6; C8 e C16	48	0	MSC e PHAs
2	C6; C8 e C16	96	0	MSC e PHAs
3	C6; C8; C16 e OS	96	0; 10 e 30	MSC e PHAs
4	C6 e OS	96	0; 2,5 e 10	MSC e PHAs
5	C6 e OS	96	0 e 2,5	MSC e PHAs
6	C6 e OS	96	0 e 2,5	MSC e PHAs
7	OS	96	0 e 2,5	MSC e PHAs

C6 - ácido capróico; C8 - ácido caprílico; C16 - ácido palmítico; OS – óleo de soja; MSC- massa seca celular; PHAs – polihidroxialcanoatos.

Nos ensaios com o ácido capróico e ausência de acrilato, após um período de 24 horas, o Xt foi de 0,85 g/L, tendo acumulado 25,6% de 3HB, a partir deste período ocorreu um aumento da massa seca celular atingindo na 48ª hora 2,22 g/L e uma quantidade de 3HB de 47,4% (100 mol%) (figura 22).

Analizando a figura a seguir observou-se um constante aumento na quantidade de PHA partindo de 6,97% (início da incubação) alcançando 64,35% na 96ª hora, porém, durante ensaio não foi detectado a presença de PHAmcl.

Figura 22: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Burkholderia cepacia* (IPT-048) durante 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de ácido capróico (C6).

Quando adicionado o ácido acrílico 2,5 mM o máximo de PHA foi de 49,78% na 72ª hora de incubação correspondendo a 99,27 mol% de 3HB (figura 23). Diferentemente ao observado na ausência de acrilato, esta condição possibilitou detectar 3HV na 72ª hora de incubação em quantidades de 0,42% (0,73 mol%). Durante os ensaios a quantidade de células variaram de 0,20 a 2,0 g/L, enquanto que, na ausência de acrilato a variação foi de Xt foi de 0,20 a 2,5 g/L.

Figura 23: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Burkholderia cepacia* (IPT-048) durante 96h em meio mineral disponibilizado 2g/L de ácido capróico (C6) juntamente com ácido acrílico na concentração de 2,5 mM.

Com a disponibilização de ácido capróico juntamente com o ácido acrílico (10 mM) observou-se na 96ª hora a quantidade de PHA correspondia a 42,19%, valor este semelhante ao observado quando privado do mesmo. Quando adicionado o inibidor a 30 mM a variação observou-se pouca variação da capacidade de acúmulo, entretanto, menor quantidade de 3HB (tabela 18). Em ambos os casos, a massa seca celular foi de 1,33 e 1,34 g/L, respectivamente. Nesta condição também foi verificada a presença de 3HV, o que, até então não havia sido observado com as outras linhagens. No momento que foi fornecido a linhagem *Burkholderia cepacia* IPT-048 ácido capróico juntamente com ácido acrílico foi obtido 3,45% de 3HV, correspondendo a 7,17 mol% e, ainda, mesmo com a adição do ácido acrílico 30 mM, pouca variação na massa seca celular e percentuais de 3HB e PHA.

Tabela 18 – Médias dos resultados obtidos do cultivo de *Burkholderia cepacia* IPT-048 em meio mineral contendo 2 g/L de diferentes ácidos graxos livres e óleo de soja.

Substrato 2g/L	Acrilato mM	Tempo h	MSC g/L	PHA						
				3HB		3HV		3HHx		% PHA
				%	mol%	%	mol%	%	mol%	
Ácido capróico (C6)	10	96	1,33	42,19	100,0	-	-	-	-	42,19
	30	96	1,34	38,50	92,83	3,45	7,17	-	-	41,95
Ácido caprílico (C8)	0	48	1,97	32,57	100,0	-	-	-	-	32,57
	0	96	1,20	36,86	100,0	-	-	-	-	36,86
	10	96	1,19	37,66	99,37	0,28	0,63	-	-	37,93
	30	96	-	32,57	89,21	4,58	10,79	-	-	37,15
Ácido palmítico (C16)	0	48	1,91	25,41	100,0	-	-	-	-	25,41
	0	96	0,89	35,15	100,0	-	-	-	-	35,15
	10	96	0,69	24,14	97,79	0,63	2,21	-	-	24,77
	30	96	0,65	6,06	89,49	0,83	10,51	-	-	6,89
Óleo de Soja (OS)	5	48	0,85	31,76	98,59	0,53	1,41	-	-	32,29
	5	72	0,59	27,27	98,64	0,37	1,15	-	-	27,63
	5	96	0,87	41,51	99,06	0,46	0,94	-	-	41,97
	10	72	0,57	tr	tr	0,85	100	-	-	0,85
	10	96	0,96	54,43	97,84	1,39	2,16	-	-	55,82
	30	96	0,71	30,45	98,59	0,51	1,41	-	-	30,96

MSC – massa celular seca, PHA – polihidroxialcanoatos, 3HB – 3-hidroxibutirato, 3HV - 3-hidroxivalerato, 3HHx - 3-hidroxihexanoato, %PHA – porcentagem de polihidroxialcanoatos.

Com a disponibilização do ácido caprílico com fonte de carbono foi verificado que a linhagem *B. cepacia* IPT-048 também acumulava 3HV. Na 48^a hora de incubação a quantidade de PHA foi de 32,57%, enquanto que, na 96^a hora foi de 36,86%, sendo 100 mol% de 3HB. Conforme fomos aumentando a concentração do inibidor verificamos a presença de 3HV sendo detectado 0,28% (0,63 mol%) quando adicionado o ácido acrílico a 10 mM e 4,58% (10,79 mol%) em uma concentração de 30 mM (tabela 18). Como a quantidade de 3HB e 3HV foram semelhantes ao obtido com o ácido capróico, considerou-se inviável a continuidade dos ensaios utilizando-se o ácido caprílico para a produção de PHA, porém, a presença de 3HV continuava sendo um resultado interessante toda vez que adicionava o inibidor ao meio mineral.

Na presença de ácido palmítico e ausência de inibidor o Xt obtido foi semelhante ao observado com o ácido caprílico foi obtido um total de 35,15% de

PHA, entretanto, correspondendo a 100 mol% de 3HB. Na 96^a hora e na presença de acrilato 10,0 mM o total de PHA foi de 24,77% sendo 24,14% de 3HB (97,79 mol%) e 0,63% de 3HV (2,21 mol%) (tabela 18). Ao ser adicionado o ácido acrílico a 30 mM o total de PHA foi de 6,89%, correspondendo a 6,06% de HB (97,79 mol%) e 0,84% de 3HV (10,51 mol%). Apesar destes resultados, principalmente a obtenção de 10,51 mol% de HV considerou-se inviável a continuidade com ácido palmítico em ensaios posteriores devido a dificuldade de solubilização em meio mineral conseqüentemente consideramos que os resultados estão superestimados.

A figura 24 mostra que a quantidade que PHA sintetizada durante o período de incubação, ou seja, 96 horas à 30°C/ 200 rpm disponibilizando óleo de soja como fonte de carbono. Nesta condição observou-se que, na ausência do ácido acrílico, a quantidade máxima de PHA em massa seca celular foi aproximadamente 65,0% sendo 100 mol% de 3HB. A quantidade de células durante o período de incubação variou de 1,66 a 3,23 g/L e a produção de PHA variou de 46,25 a 48,47% entre a 36^a a 72^a hora de incubação, cuja totalidade molar foi de 3HB.

Ao analisar a condição juntamente com o ácido acrílico 2,5 mM, concentrações inferiores de PHA foi detectada na 96^a hora de incubação, ou seja, 54,54 % sendo 53,13 de 3HB (97,78 mol%) e 1,40 de 3HV (2,22 mol%). Durante o período de incubação a variação da multiplicação celular foi de 1,30 a 3,5 g/L. Entre a 36^a a 96^a hora de incubação verificou-se a presença de 3HV com uma concentração média de 1,40% (cerca de 2,0 mol%) (figura 25).

Figura 24: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo *Burkholderia cepacia* (IPT-048) durante 96h em meio mineral acrescentado de 2g/L de óleo de soja (OS).

Figura 25: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Burkholderia cepacia* (IPT-048) durante 96h em meio mineral disponibilizando 2g/L de óleo de soja (OS) e ácido acrílico em concentração de 2,5 mM.

Com a adição do ácido acrílico a 5,0 mM foi verificado na 48^a e 96^a horas de incubação quantidades significativas de PHA variando entre 32,29 a 41,97%

sendo observado, expressivamente, uma quantidade de 3HV de cerca de 0,40% (variação entre 1,0 a 1,4 mol%). Com o aumento da concentração do inibidor para 10 mM, a quantidade de PHA alcançou cerca de 55,82% de PHA sendo 54,43% de 3HB (97,84 mol%) e 1,39% (2,16 mol%) de 3HV. Quando analisado com 30,0 mM ocorreu a redução na capacidade de acúmulo de PHA, porém, a quantidade de 3HV ficou próxima à condição no qual foi adicionado ácido acrílico a 5,0 mM (tabela 18).

Diante dos resultados aumentou o interesse pela linhagem *Burkholderia cepacia* IPT-048 pelo fato da quantidade de 3HV detectado, conseqüentemente aumentou a suspeita que a linhagem em alguns casos estaria sendo inibida metabolicamente, porém, em outros estaria utilizando do ácido acrílico como fonte de carbono. Baseado em alguns trabalhos descritos a seguir, no quais utilizaram outros substratos, a presença de HV torna a linhagem promissora para os ensaios em biorreator com a disponibilização de óleo de soja e ácido capróico e, conseqüentemente, melhor compreensão da presença do ácido acrílico na síntese de 3HV ou 3HHx. Para os ensaios em biorreator considerou-se viável a continuidade disponibilizando o ácido capróico e óleo de soja juntamente com o ácido acrílico em uma concentração máxima de 2,5 mM.

Outros trabalhos utilizaram a linhagem para a obtenção de PHA com outras fontes de carbono. Silva *et al.* (2002) e Michelin-Ramos (2003) avaliaram o uso do hidrolisado de bagaço de cana para a produção de P3HB e, tanto as linhagens *B. sacchari* IPT 101 como *B. cepacia* IPT 048, mostraram-se capazes de utilizar xilose e hidrolisado de bagaço para a produção de P3HB, com resultados promissores.

Em outro trabalho realizado por Buffoni *et al.* (2005), foram oferecidas 30 diferentes matérias-primas à bactéria *B. sacchari*, avaliando-se a composição do polímero produzido. O principal homopolímero produzido foi PHB. Ácidos valérico e propiônico, álcool isopropílico e ácido nonanóico permitiram o acúmulo de

unidades HV, além de HB, com possíveis traços de 3-hidroxihexanoato, 5-hidroxicaprioato, 4-hidroxicaprioato e 4-hidroxiacetato, a partir de substratos relacionados. Como os produtos obtidos se mostraram diferentes, em muitos casos, daqueles relatados na literatura para *C. necator*, os autores sugeriram que pode haver diferenças metabólicas entre as duas espécies e que há necessidade de identificar melhor a PHA sintase de *B. sacchari*, bem como vias geradoras de hidroxiacil-CoAs para a síntese de polímeros. Para isto, foram estudados mutantes de *B. sacchari* incapazes de acumular PHA, inserindo-lhes genes de *Wautersia eutropha* (phaCBwe), que restituíram a capacidade de acúmulo de PHA aos mutantes, indicando similaridade entre os genes das duas espécies (Nogueira *et al.*, 2005).

5.1.5 *Burkholderia sacchari* (IPT-189)

Para avaliar a linhagem *Burkholderia sacchari* IPT-189 quanto a capacidade de síntese de PHA foram testadas três condições conforme apresentados na tabela 19.

Tabela 19 – Variáveis testadas para o cultivo em frascos agitados à 30°/ 200 rpm de *Burkholderia sacchari* IPT-189 em meio mineral contendo 2 g/L de diferentes ácidos graxos livres e óleo de soja.

Condição	Substrato (2g/L)	Tempo (h)	Ácido acrílico (mM)	Análises
1	C6; C8 e C16	48	0	MSC e PHAs
2	C6; C8 e C16	96	0	MSC e PHAs
3	C6; C8; C16 e OS	96	0; 10 e 30	MSC e PHAs

C6 - ácido caprílico; C8 - ácido caprílico; C16 - ácido palmítico; OS – óleo de soja; MSC- massa seca celular; PHAs – polihidroxialcanoatos.

De acordo com a tabela 20 utilizando a linhagem *Burkholderia sacchari* IPT-189 foi utilizada a fim de obter resultados semelhantes ou superiores aos alcançados por *Burkholderia cepacia* IPT-048. Para isto os mesmos substratos

foram utilizados para a avaliação da capacidade de multiplicação e produção de PHAs.

Tabela 20 – Médias dos resultados obtidos do cultivo de *Burkholderia sacchari* IPT-189 em meio mineral contendo 2 g/L de diferentes ácidos graxos livres e óleo de soja.

Substrato 2g/L	Acrilato mM	Tempo h	MSC g/L	PHA						
				3HB		3HV		3HHx		% PHA
				%	mol%	%	mol%	%	mol%	
Ácido capróico (C6)	0	48	1,37	8,22	100,0	-	-	-	-	8,22
	30	96	0,72	23,97	98,75	-	-	0,40	1,66	24,37
Ácido caprílico (C8)	0	48	1,77	31,52	100,0	-	-	-	-	31,52
	0	96	0,90	15,66	100,0	-	-	-	-	15,66
	10	96	1,10	32,44	99,56	-	-	0,19	0,58	32,63
Ácido Palmítico (C16)	0	48	2,10	43,86	100,0	-	-	-	-	43,86
	0	96	1,82	35,27	100,0	-	-	-	-	35,27
	10	96	0,85	13,50	100,0	-	-	-	-	13,50
Óleo de Soja (OS)	0	96	-	44,10	100,0	-	-	-	-	44,1

MSC – massa celular seca, PHA – polihidroxialcanoatos, 3HB – 3-hidroxi butirato, 3HV - 3-hidroxi valerato, 3HHx - 3-hidroxi hexanoato, %PHA – porcentagem da massa seca acumulada na forma de PHA.

Avaliando o comportamento em ácido capróico (figura 26), notou-se reduzida quantidade de 3HB, ou seja, 8,22% com a ausência do ácido acrílico. Observou-se ainda que, com a adição de acrilato a 30 mM a quantidade de PHA foi de 24,37% correspondendo a 23,97% de 3HB (98,75 mol%) e 0,4% de 3HHx (1,66 mol%).

Figura 26: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Burkholderia sacchari* IPT-189 durante 96h em meio mineral acrescentado respectivamente de 2g/L de ácido capríico (C6) e ácido acrílico nas concentrações de 10,0 e 30,0 mM.

Com a disponibilização de ácido caprílico (figura 27) e ácido palmítico (figura 28) foi observado um comportamento semelhante, ou seja, na ausência de ácido acrílico a quantidade de PHA foi de 31,52 e 43,86%, respectivamente. Um diferencial entre os substratos foi o fato de ter sido detectado 3HHx quando disponibilizado ácido caprílico juntamente com 10 mM do inibidor.

Na figura 28, cujo período de incubação foi de 48 horas, a quantidade máxima de PHA alcançada foi de 43,86% quando fornecido ácido palmítico (C16) 2 g/L à linhagem, sendo este total correspondente a 3HB. Comparando a quantidade de HB quando fornecido o ácido caprílico a diferença foi considerada pequena em relação ao ácido palmítico, ou seja, 24,37%, sendo 23,97% de HB e 0,40 de HHx (1,66 mol%).

Figura 27: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Burkholderia sacchari* IPT-189 durante 96h em meio mineral acrescentado respectivamente de 2g/L de ácido caprílico (C8) e ácido acrílico nas concentrações de 10,0 e 30,0 mM.

Figura 28: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo de *Burkholderia sacchari* IPT-189 durante 96h em meio mineral acrescentado respectivamente de 2g/L de ácido palmítico (C16) e ácido acrílico nas concentrações de 10,0 e 30,0 mM.

Conforme os resultados obtidos, os quais foram considerados insatisfatórios, uma nova tentativa foi feita utilizando a linhagem *B. sacchari* adicionando ao meio mineral o ácido acrílico. Devido à reduzida quantidade de PHAs (tabela 20 e figura 29) conclui-se a não viabilidade da continuidade já que outras linhagens apresentaram maior eficiência na metabolização dos ácidos graxos livres e óleo de soja para a produção de polímeros. A literatura descreve que *Burkholderia sacchari* IPT-189, na qual é uma mutante da *B. sacchari* IPT-101, apresenta boa eficiência, porém, quando fornecido substratos não relacionados com fonte de carbono.

Figura 29: Percentual de polímeros obtidos a partir do cultivo *Burkholderia sacchari* IPT-189 durante 96h em meio mineral acrescentado respectivamente de 2g/L de óleo de soja (OS) e ácido acrílico nas concentrações de 10,0 e 30,0 mM.

De acordo com a literatura, constantemente são estudadas diferentes estratégias para obtenção de polihidroxialcanoatos, dentre elas o emprego de cepas geneticamente modificadas e diferentes regimes de operação (Du *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2000; Kanna e Srivastava 2005). Silva *et al.* (2007), descrevem que Mutantes foram obtidos a partir da linhagem de *B. sacchari* IPT 101

selecionada nos trabalhos iniciais de produção de PHA a partir de sacarose. Dois grandes grupos de mutantes foram identificados: aqueles deficientes na utilização de intermediários da α -oxidação e outros não afetados na utilização desses intermediários. Mutantes afetados na utilização de intermediários da α -oxidação consumiram todo ácido propiônico suprido, acumularam PHA contendo menos que 30 mol% de unidades HV e atingiram fatores de conversão de propionato em unidades HV ($Y_{3HV/prp}$) da ordem de 0,35 g/g. Mutantes do segundo grupo consumiram apenas parte do propionato suprido, acumularam PHA contendo mais que 50 mol% de unidades HV e atingiram valores de $Y_{HV/prp}$ da ordem de 0,80 g/g, observado no mutante IPT 189. Embora até 8 vezes mais eficientes na produção de HV, os valores de $Y_{HV/prp}$ ainda se mostravam inferiores ao máximo teórico. Estes resultados, associados ao fenótipo observado para os dois grupos de mutantes, bem como a estudos moleculares da linhagem, levaram à proposição da existência de duas vias de catabolismo de propionato em *B. sacchari*: a α -oxidação e o ciclo de 2-metilcitrato (2MCC) que, quando ativas, competiriam pelo substrato com a síntese de HV; ao serem deletadas, levaram ao melhoramento observado nos mutantes.

Segundo dados, as bactérias do gênero *Burkholderia*, no caso a *Burkholderia sacchari* IPT-101, quando comparada ao gênero *Cupriavidus necator* DSM 545 tem a vantagem de ser capaz de multiplicar-se em meio contendo sacarose acumulando até 80% da massa celular na forma de 3HB em condições não otimizadas (Gomez *et al.*, 1996). Rocha (2002) obteve um total de 10,70 mol% de unidades de 3HV no copolímero de P3HB-co-3HV formado, fornecendo na solução de alimentação de sacarose e ácido propiônico (30:1). Esta proporção possibilitaria aprimorar a processabilidade do copolímero, cujas propriedades se aproximam do plástico petroquímico.

Rocha *et al.* (2007) estudaram a influência do fluxo de substratos na síntese de biopolímeros com diferentes composições monoméricas (3HB, 3HV e 3HPE) utilizando as linhagens bacterianas *B. sacchari* IPT 189 e *B. cepacia* IPT

064. Para *B. sacchari* IPT 189, as velocidades de consumo de ácido propiônico e de síntese de unidades de 3HV foram diretamente proporcionais. A manutenção da proporcionalidade em um grande intervalo de variação de velocidades demonstra a rigidez do "nó" reacional entre a oxidação de propionil-CoA e a reação subsequente de condensação de acetil-CoA e propionil-CoA formando valeril-CoA, intermediário da síntese de unidades de 3HV em *B. sacchari*, com evidente predomínio para a reação de condensação. Segundo os autores o valor do fator de conversão de ácido propiônico a 3HV ($Y_{3HV/prop}$) e foi de cerca de 1,25 g/g, muito próximo ao valor máximo teórico (1,35 g/g) obtido por Gomez *et al.*, 1996. Baixas conversões de ácido propiônico em 3HV são apontadas como um dos fatores limitantes na produção de P3HB-co-3HV, elevando o custo do produto final (Silva *et al.*, 2000; Choi e Lee, 1999; Squio e Aragão, 2004. Neste sentido, o resultado obtido poderia ser importante para minimização dos custos de produção deste polímero, uma vez que foi possível modular a composição do copolímero P3HB-co-3HV oferecendo diferentes relações entre os substratos, sacarose/ácido propiônico, durante a fase de acúmulo.

5.2 Etapa II - Ensaios em biorreator utilizando a linhagem *Burkholderia cepacia* IPT-048

5.2.1 Cultivo de *Burkholderia cepacia* adicionado de óleo de soja

Após os ensaios realizados em frascos agitados decidiu-se utilizar primeiramente a linhagem *Burkholderia cepacia* IPT-048 no biorreator em virtude de sua capacidade de multiplicação e síntese de PHA quando fornecido o óleo de soja como fonte de carbono. Como esta linhagem apresentou eficiente capacidade de multiplicação, mesmo em concentrações de 5g/L de óleo de soja, adotou-se esta concentração intencionando a quantificação do óleo residual. A linhagem *Cupriavidus necator* DSM 545 IPT-026, após aprimoramento genético, foi posteriormente submetida à ensaios em biorreator. Estas linhagens tiveram como característica decisória a obtenção de PHA em torno 70% quando adicionado de ácido capróico (C6) e óleo de soja na presença ou não do ácido acrílico e, ainda, a detecção de 3HV e 3HHx. O crescimento celular foi realizado em meio de cultura sintético, à temperatura de 30 °C, pH 7,0 e oxigênio dissolvido acima de 20% da saturação. Para controle de pH utilizou-se uma solução de NaOH e uma solução de H₂SO₄ 4N.

As figuras 30 e 31 mostram o comportamento da linhagem *Burkholderia cepacia* IPT-048 durante o período de 48 horas. O inóculo inicial foi 0,11 g/L alcançando uma população máxima durante a fase exponencial de cerca de 2,5 g/L. Um resultado interessante observado nesta variável foi a presença de 3HHx cuja concentração detectada foi de 12,50% (48 mol%), entretanto a medida que houve a multiplicação da linhagem *B. cepacia* esta concentração foi reduzindo observando-se ao término de processo uma concentração de cerca de 3,0% (5 mol%). O inverso ocorreu com o teor de 3HB, inicialmente observou-se uma quantidade de 10,2% (52,0 mol%) alcançando 55,0% (95,2 mol%) na 36ª hora de fermentação.

Figura 30: Média dos resultados da linhagem *Burkholderia cepacia* IPT-048 em meio mineral durante 48 horas a 30 °C/ 300 rpm adicionado de 5 g/L de óleo de soja em biorreator.

Figura 31: Percentual molar médio dos polímeros obtidos por *Burkholderia cepacia* IPT-048 em meio mineral durante 48 horas a 30 °C/ 300 rpm iniciado com 5 g/L de óleo de soja em biorreator.

É interessante destacar que, aparentemente, o crescimento celular ocorreu nas primeiras 10 horas de cultivo, coincidindo com o período de esgotamento da fonte de nitrogênio. Com esta observação foi associado que a quantidade de polímeros produzidos esteve associada ao crescimento, contrariamente foram os resultados que obtidos na produção de PHAs por diversas linhagens a partir de carboidratos (Sánchez *et al.*, 2003; Du *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 1994).

Neste tratamento, objetivou-se avaliar a capacidade da linhagem em metabolizar óleo de soja 5g/L a fim de obter concentrações significativas de PHB e principalmente 3HHx semelhante ou superiores ao alcançados nos frascos agitados. A maior parte dos substratos fornecidos como fonte de carbono para a produção de PHA corresponde a alcanos, ácidos graxos ou carboidratos (Kim *et al.*, 1996; Asbhy *et al.*, 2002 e 2005). Substratos complexos, tais como os óleos, possibilitam a obtenção de PHAmcl (C6-C14) com *Pseudomonas aeruginosa* (Eggink *et al.*, 1995). Entretanto, o uso destes substratos ou resíduos têm sido dificilmente explorados devido a sua complexidade. Substratos não relacionados, resíduos de processos tais como melaço ou malte de cerveja, já foram convertidos em 3HB conforme publicações de Choi e Lee, 1999 e Purushothaman *et al.*, 2001.

A figura 32 mostra o comportamento da linhagem durante o período de fermentação. Conforme apresentado nas figuras 33, a velocidade específica de crescimento ($\mu_{Xr\text{ máx}}$) foi de $0,26\text{ h}^{-1}$ com um fator de conversão de nitrogênio em biomassa ($Y_{Xr/Nt}$) de $0,36\text{ g}_{Xr}/\text{g}_{Nt}$, segundo Ramsay *et al.* (1990) concentrações abaixo de $0,2\text{ g/L}$ de nitrogênio permitem o acúmulo de 3HB durante a fase de crescimento não limitado.

Figura 32: Cultivo da linhagem *Burkholderia cepacia* IPT-048 em meio mineral durante 48 horas a 30 °C e 300 rpm adicionado de óleo de soja 5g/L.

Figura 33: Média da multiplicação celular de *B. cepacia* IPT-048 em meio mineral durante 48 horas a 30 °C e 300 rpm adicionado de óleo de soja 5g/L:

Observaram-se também nos diferentes ensaios em biorreator que os valores de X_r continuaram aumentando após a limitação de nitrogênio, uma explicação para este aumento durante a fase de acúmulo pode ser atribuída ao acúmulo de material celular, particularmente os componentes da parede celular (Romero-Delgado, 2006). Yamane (1993) e Aragão (1996) constataram ao comparar as células cultivadas em limitação de nitrogênio (fase de produção de polímero) um aumento na quantidade de fosfolipídios, de peptideoglicanos e da camada de lipopolissacarídeos, com uma alta concentração de polissacarídeos. Isto pode explicar o fato nos ensaios realizados em biorreator ter ocorrido um aumento da biomassa residual após o esgotamento do nitrogênio.

Gomez (2000) relata que, o uso de ácidos graxos fosse a forma mais interessante de produzir e controlar a composição de PHAs pelo fato de que a composição do poliéster refletia o comprimento da cadeia carbônica da fonte oferecida, ou seja, quando a principal fonte é o ácido nonanóico; por exemplo, *P. oleovorans* produz PHAmcl composto predominantemente de 3-hidroxinonanoato. Entretanto, a partir da década de 90 descobriu-se que um grupo de *Pseudomonas* acumulava PHAmcl a partir de carboidratos. Quando produzidos a partir de carboidratos, PHAmcl apresentam o ácido 3-hidroxidecanóico (HD) como principal constituinte e outros monômeros podem ser detectados. Além disso, comparações do custo mínimo da fonte de carbono para produção de PHAmcl a partir de carboidratos e óleo de soja indicaram valores muito próximos. Para a *Burkholderia cepacia* IPT-048, a disponibilização de óleo de soja contribuiu para esta síntese, tanto é que, permitiu detectar durante boa parte do processo monômero de 3HHx em quantidades que variavam de em cerca de 3,5 a 40% (98,8 a 5,5 mol%) entre a 10^a e a 48^a hora. Apesar da quantidade ter sido pequena, o resultado foi muito interessante por estar acima de alguns já publicados.

Em um outro estudo, ensaios na busca de linhagens produtoras de PHAmcl a partir de óleos vegetais foram realizados com os óleos de soja, arroz, canola, milho e girassol como fonte de carbono em incubador rotativo, revelando

a presença de monômeros contendo insaturações (Silva *et al.*, 1999). A possibilidade de insaturações faz com haja a modificação do comportamento físico e mecânico do polímero. Já que, os óleos vegetais também têm sido testados como matérias-primas para a produção de PHAmcl. A presença de cadeias insaturadas nos ácidos graxos componentes do óleo vegetal podem gerar monômeros insaturados no PHAmcl obtido, cuja presença permite modificações químicas posteriores que incorrerão em propriedades diferentes. PHAmcl com distintas composições foi produzido a partir dos óleos de arroz, canola, girassol, milho e soja. Em todos os polímeros sintetizados foi possível verificar a presença de monômeros insaturados, alguns dos quais, após extração, purificação e armazenamento formavam ligações cruzadas (Silva, 2003).

Para estudar o uso de ácidos graxos na produção de PHAmcl com composição variada, genes de biossíntese de PHA de *Cupriavidus necator* foram introduzidos em linhagens de *Escherichia coli* afetadas no metabolismo de ácidos graxos, avaliando-se a especificidade da enzima PHA sintase (Antonio *et al.*, 2000). Observou-se a formação de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxi octanoato) (PHB-co-HO) e poli(HB-co-HO-co-hidro-xidodecanoato) (HDD), quando octanoato e decanoato ou dodecanoato foram fornecidos como fontes de carbono. A caracterização da PHA sintase de *C. necator* foi também realizada do ponto de vista molecular, empregando-se evolução *in vitro* e mutação sítio-dirigida, o que permitiu propor modelos para a proteína em questão (Rhem *et al.*, 2002).

5.2.2 Cultivo de *Burkholderia cepacia* adicionado de óleo de soja e ácido acrílico

Nas figuras 34 e 35 foram apresentados os resultados que tiveram como objetivo avaliar a capacidade da linhagem metabolizar óleo de soja 5g/L juntamente com a adição do ácido acrílico 2,5 mM. A adição do inibidor foi na 10^a hora de processo, pois a hipótese era que em razão da limitação de nitrogênio no

meio aumentar-se-ia a quantidade de polímeros intracelular, entre eles, concentrações significativas de 3HHx.

Figura 34: Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de *Burkholderia cepacia* IPT-048 dos processos iniciado com 5 g/L de óleo de soja e adicionado na 10ª hora de cultivo o ácido acrílico 2,5mM.

Figura 35: Percentual molar médio dos polímeros obtidos durante a multiplicação de *Burkholderia cepacia* IPT-048 dos processos iniciado com 5 g/L de óleo de soja e adicionado na 10ª hora de cultivo o ácido acrílico 2,5mM.

O ácido acrílico é reconhecido como um inibidor da β -oxidação de ácidos graxos (Thijsse, 1964), resultando em uma inibição da síntese de PHA a partir de ácidos graxos, mas não a partir de carboidratos (Huijberts *et al.*, 1994). O estudo do metabolismo do acrilato gerado pela clivagem enzimática de dimetilsulfonopropionato (DSMP) tem demonstrado que este substrato é convertido extracelularmente a β -hidroxipropionato, que é transportado ao citossol onde subsequentemente desaparece, indicando que foi descarboxilado (Ansede *et al.*, 1999; Ansede *et al.*, 2001).

Patel e Walt (1987) indicaram que a síntese de acrilil-CoA pode ser catalisada por acetil-CoA sintetase. Acrilil tem sido apontado como um intermediário no catabolismo de propionato (Fernandez-Briera e Garrido-Pertierra, 1988), na fermentação de propionato (Seeliger *et al.*, 2002) e da fixação de CO₂. Satoh *et al.*, (2002) determinaram o potencial de redução do par acrilil-CoA/propionil-CoA e verificaram que este valor indica uma reação termodinamicamente desfavorável que àquelas envolvendo acil-CoA com cadeias de carbonos mais longas. Estes dados indicariam uma dificuldade na utilização do ácido acrílico como precursor na síntese de PHA.

O ácido acrílico inibe a atividade de 3-cetoacil-CoA tiolase, cuja enzima catalisa o fase final da β -oxidação liberando acetil-CoA a partir da 3-cetoacil-CoA (Qi *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000). Tobin e O'Connor (2005), os quais estudaram o efeito de substratos aromáticos quanto a habilidade de espécies de *Pseudomonas* acumularem PHA assim como a composição do PHA acumulado, os autores observaram que um substrato não relacionado deveria envolver somente a síntese de ácidos graxos, entretanto o ácido acrílico não deveria afetar o acúmulo de PHA a partir do ácido fenilacético. Quando as células foram suplementadas com ácido fenilacético como única fonte de carbono e na presença de ácido acrílico, ocorreu uma notável redução da densidade óptica (DO) sendo observado a síntese de PHA. É relatado que o metabolismo microbiano de ácido fenilacético resulta da via fenilacetil-CoA ligase, pela ação de uma Acil-CoA sintase (*fadD*) e

que o produto de uma reação utilize a rota da β -oxidação (Olivera *et al.*, 2001; Luengo *et al.*, 2001). Durante a β -oxidação a enzima cetotiolase (*phaD*) que é essencial para o metabolismo do ácido fenilacético (Olivera *et al.*, 2001), desta forma o ácido acrílico poderia potencialmente inibir uma ou ambas enzimas (Qi *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000) e, conseqüentemente, o crescimento e acúmulo de PHA.

De acordo com as figura 34 foi observado que a quantidade de 3HHx durante todo o processo variou de 0,10% a 0,21% (cerca de 0,85 mol%) inferior ao observado quando adicionado somente de óleo de soja. Nestes ensaios, a preparação do inóculo procedeu-se da mesma forma que os ensaios anteriores, entretanto, não foi detectado o 3HHx nas mesmas concentrações. Em ambas as condições a concentração celular ao final da fase exponencial (10^a hora) foram de 1,5 g/L. Com relação ao comportamento celular, independente da adição ou não do inibidor da β -oxidação não foi observado variações na massa seca celular, muito pelo contrário, considerou vantajoso, pois o Xt máximo obtido ao final do processo em ensaios anteriores foi de cerca de 2,5 g/L e na presença de ácido acrílico observou-se cerca de 3,5 g/L no mesmo período.

Avaliando a presença de 3HB e PHA o mesmo ocorreu nos diferentes ensaios, as concentrações iniciais detectadas foram de cerca de 8,0% (100 mol%) alcançando um teor médio de 45,0 (97,65 mol%) a 50,0% (97,75 mol%) entre o período de 26 a 48 horas.

Conforme apresentado na figura 34 observou-se que na 8^a e 10^a hora de cultivo, o percentual total de PHA foi de 13,63% e 23,99%, respectivamente. Esperava-se que a partir da adição de acrilato de sódio, propriamente na 10^a hora, houvesse aumento na capacidade de acúmulo por *B. cepacia* o que, não foi observado. Com relação a presença de 3HB o máximo obtido foi a partir da 26^a hora, com cerca de 43,0% (97,65 mol%). Para 3HV observou-se uma concentração inicial de cerca de 0,5% (0,97 mol%) na 14^o hora de fermentação

aumentando gradativamente o teor até a 30ª hora, cujo teor médio observado foi de 1,5% (cerca de 2,5 mol%). Como observado nos ensaios em frasco agitados, a presença do ácido acrílico contribuiu para a síntese de 3HV pois a partir da 10ª hora foram detectados o monômero nas diferentes amostras coletadas do biorreator. Desta forma foi possível observar que, o acrilato não contribuiu no aumento da síntese de 3HHx, entretanto, a concentração de 3HV foi superior atingido um máximo de 1,60% (2,76 mol%) na 38ª hora. Para 3HB a quantidade obtida, a partir da adição de acrilato, variou de 23,71 (99,56) a 48,40% (97,24 mol%), enquanto que, o rendimento de 3HV variou de 0,43 (0,97) a 1,58% (3,05 mol%).

Concentração de LnX_t vs tempo

Figura 36: Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de *Burkholderia cepacia* IPT-048 dos processos iniciado com 5 g/L de óleo de soja e adicionado na 10ª hora de cultivo o ácido acrílico 2,5mM.

Conforme a figura 36, observou-se que a cultura apresentou uma fase lag de cerca de 2 horas, após este período encena a fase exponencial até a 10ª hora, período correspondente a finalização de nitrogênio.

Conforme apresentado na figura 37, a velocidade específica de celular observada a 30 °C e 300 rpm foi avaliada disponibilizando à linhagem *B. cepacia* óleo de soja o qual teve um $\mu_{Xr \text{ máx}} = 0,18\text{h}^{-1}$, enquanto que, o fator de conversão de nitrogênio em biomassa ($Y_{Xr/Nt}$) observado foi de 1,80 g_{Xr}/g_{Nt}.

A) Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{Xr \text{ máx}}$)

B) Fator de conversão de nitrogênio em biomassa descontada ($Y_{Xr/NT}$).

Figura 37: Cultivo da linhagem *Burkholderia cepacia* IPT-048 em meio mineral durante 48 horas a 30 °C e 300 rpm adicionado de óleo de soja 5g/L e ácido acrílico 2,5mM.

Um resultado interessante observado na figura 34 foi que, apesar da baixa quantidade, foi a presença de 3HV entre a 12^a a 48^a hora. De acordo com a observação considerou-se a possibilidade da linhagem estar acumulando o polímero a partir do acrilato, ou seja, a formação de acrilil-CoA que juntamente com acetil-CoA acumular cadeias com 5 carbonos. A fim de esclarecer esta possibilidade novos ensaios foram feitos o que viabilizou a hipótese levantada.

Para esta condição foram analisados através de propanólise os polímeros juntamente com as células (figuras 38 e 39), bem como, o polímero extraído com clorofórmio (figuras 40 e 41).

Figura 38: Média dos polímeros contidos nas células de *Burkholderia cepacia* IPT-048 dos processos iniciado com 5 g/L de óleo de soja e adicionado na 10^a hora de cultivo o ácido acrílico 2,5mM.

Figura 39: Percentual molar médio dos polímeros contidos nas células de *Burkholderia cepacia* IPT-048 dos processos iniciado com 5 g/L de óleo de soja e adicionado na 10^a hora de cultivo o ácido acrílico 2,5mM.

De acordo com a figura 38 o comportamento da linhagem não ocorreu conforme os ensaios anteriores, ou seja, a produção de PHA não ultrapassou os 3% na massa seca celular. Independente da quantidade de polímeros obtidos, o consumo de nitrogênio ocorreu até a 10^a hora de cultivo e a redução significativa de óleo de soja a partir da 20^a hora. De acordo com os resultados obtidos, os quais deveriam auxiliar na evidência da incorporação de acrilil-CoA, não permitiram a conclusão analisando, em princípio analisando as células.

A fim de evidenciar os polímeros produzidos foi realizada a extração dos polímeros com clorofórmio através do método de Soxhlet, permitindo analisar especificamente a quantidade de monômeros presentes nas diferentes fases do processo.

As figuras 40 e 41 mostram que, novamente, a maior quantidade de polímero produzido foi de 3HB variando de 37,68 (100 mol%) a 51,27 (98,25 mol%). Durante o período de incubação ocorreu o acúmulo de 3HV a partir da 16^a hora, ou seja, para um X_t equivalente a 0,90 g/L a quantidade de 3Hv foi de 0,92% (1,6 mol%) aumentando gradativamente até a 40^a hora. Neste período as quantidades de 3HB e 3HV detectadas foi, respectivamente, de 46,36 e 1,18% equivalendo a um percentual molar 97,86 e 2,14. Com estes resultados evidenciou que a linhagem utilizou do ácido acrílico como fonte de carbono voltou se confirmar, consequentemente, a afirmação baseada em nossos resultados tornou-se mais confiável.

Figura 40: Média do resultados dos polímeros extraídos com clorofórmio produzidos por *Burkholderia cepacia* IPT-048 dos processos iniciado com 5 g/L de óleo de soja e adicionado na 10^a hora de cultivo o ácido acrílico 2,5 mM.

Figura 41: Percentual molar médio de polímeros extraídos com clorofórmio produzidos por *Burkholderia cepacia* IPT-048 dos processos iniciado com 5 g/L de óleo de soja e adicionado na 10^a hora de cultivo o ácido acrílico 2,5 mM.

Em outras situações, Rodrigues *et al.* (1995) cultivaram a linhagem *B. cepacia* IPT-064 em gliconato, glicose e frutose, obtiveram um polímero com insaturações na sua estrutura (P3HB-b-3H4PE). Utilizando a mesma linhagem, Pereira (2003) disponibilizando sacarose como fonte de carbono obteve o mesmo polímero. Haywood *et al.* (1990) e Valentin e Dennis (1996), também estudaram a produção de P3HB-co-3HV utilizando fontes simples de carbono (sacarose, glicose frutose) sem a presença de um precursor de 3HV (ácido propiônico ou ácido valérico) e, ainda, recentemente, foi relatado em *Bacillus* sp. a possibilidade de produção do monômero 4HB e 3HV a partir de substrato não relacionado (gliconato, frutose e glicose) ou a síntese PHB-HV-HDd por *Bacillus cereus* ICB 2005-1 a partir de glicose e PHB-HDd-HOd em meio mineral com farinha de soja ou com amido (Valappil *et al.*, 2007; Freitas, 2007). Através destes resultados poderíamos, também, suspeitar que a linhagem *Burkholderia cepacia* IPT-048 possa acumular o copolímero P3HB-b-3H4PE, porém, análises futuras será feitas a fim de detalhar especificamente como o polímero de 5 carbonos está organizado.

5.2.3 Cultivo de *Burkholderia cepacia* adicionado de óleo de soja e ácido capróico

Para verificar se um co-substrato poderia auxiliar na síntese de PHA foi introduzido ácido capróico ao processo durante a fase de acúmulo. Acreditava-se que a linhagem utilizaria parte do óleo de soja para a multiplicação celular e a partir do momento que fosse privado de nitrogênio incorporaria o ácido capróico intracelularmente, conseqüentemente aumentaria a quantidade de 3HHx.

As figuras 42 e 43 mostram que, a produção de PHA total após a fase exponencial (10^a hora) foi equivalente a 24% na massa seca celular, enquanto que, na 18^a hora atingiu cerca de 40%. Posteriormente, a estas fases o rendimento médio de PHA variou entre 44 a 65%. Este comportamento poderia ser considerado normal em razão da disponibilização de cadeias carbônicas

curta, porém, devemos levar em consideração a não disponibilização de nitrogênio à síntese protéica para a linhagem utilizada. Do total de PHA observado, a maior proporção foi de 3HB, entretanto, durante o intervalo de multiplicação e acúmulo a quantidade de 3HHx foi entre 0,13% (1,03 mol%) a 0,19% (0,37 mol%) não concretizando a hipótese de utilização do caprolato na biossíntese de 3HHx. Em relação a produção de 3HV, não foi observado o mesmo comportamento, conforme os ensaios anteriores, o qual foi verificado somente em cultivo o óleo de soja e ácido acrílico. Quando disponibilizados outros substratos como metanol e ácidos graxos a quantidade de PHAs foram substancialmente menores, não excedendo 2,0 g/Lh. Foi verificado que a limitação por fósforo acaba sendo uma condição mais efetiva do que a de nitrogênio para acúmulo de poli-3-hidroxiocetanoato (P3HO) a partir de ácido oléico utilizando bactérias do gênero *Pseudomonas* (Lee *et al.*, 2000) ou para produção de 3HB a partir de xilose utilizando *B. cepacia* (Silva *et al.*, 2004), ou ainda, a forma de adição de substrato ao biorreator também influencia no valor deste parâmetro (Pataquiva, 2003; Kahar *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1997).

Figura 42: Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de *Burkholderia cepacia* IPT-048 nos processos iniciados com 5 g/L de óleo de soja e adicionados na 10ª hora de cultivo o 5 g/L de ácido capróico (C6).

Figura 43: Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de *Burkholderia cepacia* IPT-048 dos processos iniciados com 5 g/L de óleo de soja e adicionados na 10^a hora de cultivo o 5 g/L de ácido capróico (C6).

A linhagem depois de inoculada ao fermentador apresentou um período lag de 2 horas. Este comportamento foi semelhante aos demais ensaios realizados finalizando a fase log na 10^a hora de fermentação (figura 44).

Concentração de X_t vs tempo

Figura 44: Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de *Burkholderia cepacia* IPT-048 dos processos iniciados com 5 g/L de óleo de soja e adicionados na 10^a hora de cultivo o 5 g/L de ácido capróico (C6).

Foi avaliada velocidade específica de crescimento celular disponibilizando inicialmente à linhagem *B. cepacia* uma mistura de óleo de soja e, posteriormente a redução da concentração de nitrogênio, o ácido capróico. Após a fase lag, de cerca de 2 horas, o período exponencial teve um $\mu_{Xr \text{ máx}} = 0,26\text{h}^{-1}$, enquanto que, o fator de conversão de nitrogênio em biomassa ($Y_{Xr/Nt}$) observado foi de $1,86\text{g}_{Xr}/\text{g}_{Nt}$ (figuras 45A e B).

A) Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{Xr \text{ máx}}$).

B) Fator de conversão de nitrogênio em biomassa descontada ($Y_{Xr/NT}$).

Figura 45: Cultivo da linhagem *B. cepacia* IPT-048 em meio mineral durante 48 horas a 30 °C e 400 rpm adicionado de óleo de soja e ácido capróico (5g/L).

Para verificar se outros co-substratos poderiam substituir, por exemplo, o ácido propiônico na síntese de P3HV foram testados o uso de carboidratos combinados a ácidos e álcoois compostos de até 5 átomos de carbono. Linhagens isoladas de solo no Brasil converteram maior variedade de substratos

em HV que linhagens de referência e somente linhagens isoladas converteram isobutanol em HV (Rodrigues *et al.*, 1995). Entretanto, nenhuma destas fontes de carbono se mostrou mais adequada que os ácidos valérico ou propiônico. Duas das melhores linhagens isoladas, *B. cepacia* IPT 044 e *Burkholderia* sp IPT 101, foram cultivadas em biorreator, comparando-se sua capacidade de uso de sacarose e propionato para acúmulo de PHB-co-HV, utilizando-se o controle de pH e de oxigênio dissolvido como ferramentas de monitoramento e controle da produção. *Burkholderia* sp IPT 101 apresentou maior teor de polímero acumulado (66%), o dobro do fator de conversão de fonte de carbono em polímero (0,37 g/g), com a vantagem de não ser patogênica (Gomez *et al.*, 1996 e 1997). Entretanto, da mesma forma que bactérias obtidas em coleções de culturas, os dois isolados demonstraram eficiência na conversão de propionato em unidades HV correspondendo a menos de 10% do valor máximo teórico (Gomez *et al.*, 1996).

Um valor máximo teórico foi estimado considerando que, para a síntese do co-polímero, o propionato entraria na forma de propionil-CoA, a ser condensado com uma molécula de acetil-CoA, oriunda da degradação do carboidrato. Desta forma, cada molécula de propionato seria integralmente incorporada à unidade HV em formação, de modo que seriam gerados 1,35 g de HV por grama de propionato fornecido (Gomez *et al.*, 1993; Gomez *et al.*, 1996), valor correspondente ao fator de conversão máximo teórico de propionato a HV ($Y_{HV/prp}$). O baixo valor de $Y_{HV/prp}$ observado para todas as linhagens investigadas foi indicativo da presença de outras vias metabólicas que atuariam competitivamente com a via de síntese de HV (Silva, 1998), direcionando o propionato para gerar biomassa, energia e CO₂. Para aumentar esta eficiência, buscou-se o melhoramento genético de algumas linhagens e o emprego de estratégias de condução do processo de produção em biorreator (estratégias de alimentação, uso de indutores ou de diferentes proporções entre as matérias-primas oferecidas etc.). Em nossos estudos não evidenciamos que a adição do ácido capróico como co-substrato contribui à síntese de PHAmcl

5.2.4 Cultivo de *Burkholderia cepacia* adicionando de óleo de soja, ácido capróico e ácido acrílico.

Na figura 46 foi apresentado os resultados dos experimentos em que foi analisada a capacidade da linhagem metabolizar uma mistura de óleo de soja (5g/L) e ácido capróico (5g/L) juntamente com o ácido acrílico a 2,5 mM. Esta variável baseou-se na possibilidade da linhagem comporta-se conforme ao observado anteriormente, ou seja, a produção de 3HV e acumular 3HHx em razão da disponibilização do co-substrato. Como na variável anterior (óleo de soja + ácido capróico), não houve a incorporação do ácido capróico em 3HHx, acreditava-se que, na presença do ácido acrílico pudesse induzir tal comportamento. A disponibilização de óleo de soja poderia garantir a multiplicação da linhagem *B. cepacia* na presença de nitrogênio correspondente a primeira fase do processo, posteriormente, utilizar o ácido capróico para acumular na forma de PHAmcl. Com a adição do inibidor, provavelmente, haveria a formação do copolímero PHB-HV-HHx ou ainda, maior quantidade dos homopolímeros 3HV ou 3HHx por *B. cepacia* IPT-048.

Figura 46: Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de *Burkholderia cepacia* IPT-048 nos processos iniciados com 5 g/L de óleo de soja e adicionados na 10ª hora de cultivo 5 g/L de ácido capróico (C6) e ácido acrílico 2,5 mM.

Durante o ensaio observou-se que houve uma constante produção de PHA e 3HB alcançando cerca de 50,0% (100 mol%) ao término do processo fermentativo. Na 10^a hora, correspondente a redução de nitrogênio total, observou-se uma pequena redução da velocidade de multiplicação sendo observado também a redução da síntese de 3HB. A adição de ácido capróico não interferiu na multiplicação celular, no entanto, a segunda fase de crescimento se deu a partir da 12^o hora (figura 47). Conforme a seguir, o comportamento de *Burkholderia cepacia* IPT-048 foi semelhante aos demais ensaios, ou seja a fase exponencial se deu entre a 2^a e 10^a hora. A partir da 10^a hora, o aumento da massa celular foi gradativo estendendo-se até a 48^o hora caracterizando o acúmulo e P3HB/HA.

Concentração de X_t vs tempo.

Figura 47: Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de *Burkholderia cepacia* IPT-048 nos processos iniciados com 5 g/L de óleo de soja e adicionados na 10^a hora de cultivo 5 g/L de ácido capróico (C6) e ácido acrílico 2,5 mM.

A) Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{X_r \text{ máx}}$).

B) Fator de conversão de nitrogênio em biomassa descontada (Y_{X_r/N_t}).

Figura 48: Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de *Burkholderia cepacia* IPT-048 nos processos iniciados com 5 g/L de óleo de soja e adicionados na 10ª hora de cultivo 5 g/L de ácido capróico (C6) e ácido acrílico 2,5 mM.

Na figura 48 mostra que a velocidade específica máxima de crescimento celular, a 30°C e 300 rpm, foi de $\mu_{X_r \text{ máx}} = 0,43h^{-1}$, enquanto que, o fator de conversão de nitrogênio em biomassa (Y_{X_r/N_t}) observado foi de 2,72g X_r /g N_t .

5.3 Etapa III - Obtenção de linhagens recombinantes produtoras de polihidroxialcanoatos: influência do gene *phaB* (acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente).

Na tentativa de ampliar o uso de matérias-primas diversificadas e reduzir o custo de produção do polímero, alguns dos genes considerados chaves para a produção de PHAs foram introduzidos na linhagem de *Cupriavidus necator*,

bactéria bastante conhecida e de ampla capacidade de utilização de fontes de carbono. Os recombinantes assim construídos foram testados frente a fontes de carbono de baixo custo, tendo-se obtido os melhores resultados de acúmulo quando misturas de ácidos graxos e óleo de soja foram empregadas, sendo as condições em que os recombinantes acumularam até 70% da massa celular na forma de polímero, o qual apresentou propriedades físico-químicas e mecânicas similares às encontradas na literatura.

5.3.1 Proposta da via metabólica envolvida na síntese de P3HB/3HAMcl

Partindo do princípio que existe a possibilidade de síntese de PHA através da β -oxidação foi proposta a via apresentada na figura 49. De acordo com figura havendo um excedente de carbono estes seriam convertido em 3HHx e outros polímeros. Para que isto fosse favorecido o aumento do número de cópias do gene *phaB* (acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente) induziria o aumento do fluxo de carbono, consequentemente, aumento do acúmulo de 3HHx para a biossíntese de PHA.

A síntese de polímeros contendo 3HB e 3HAMcl é determinada pela especificidade da PHA sintase, bem como por vias metabólicas que forneçam estes monômeros em quantidades adequadas. Assim, os microrganismos podem ser utilizados para a produção de polímeros a partir de ácidos graxos ou óleos vegetais ou ainda, a partir de carboidratos. Um esquema da via metabólica de síntese de P3HB/3HAMcl pode ser representado pela figura 49, embora esta proposta de metabolismo não esteja completamente estabelecida.

Figura 49: Proposta de vias metabólicas envolvidas na síntese de P3HB/3HAMcl *phaG*: 3-hidroxiacil-ACP transferase; *phaJ*: enoil –CoA hidratase adaptado de Fukui *et al.*, 1998 e Sudesh *et al.*, 2000.

Fukui *et al.* (1998), propuseram que a síntese de PHA a partir de ácidos graxos envolveria o gene *phaJ* que codifica a enzima específica enoil-CoA hidratase, responsável pela produção do substrato *R*-3-hidroxiacil-CoA para a PHA sintase, codificada por *phaC*.

No caso da síntese a partir de carboidratos, os intermediários seriam supridos pela biossíntese *de novo* de ácidos graxos. Os intermediários seriam então gerados pela enzima 3-hidroxiacil-ACP transferase, codificada por *phaG*. A produção de unidades 3HB a partir de ácidos graxos pode ser realizada através da β-oxidação até acetil-CoA seguindo depois pela rota tradicional de condensação, ou seja, redução a 3-hidroxiacetil-CoA e polimerização a P3HB, respectivamente catalisado pelas enzimas β-cetotiolase (*phaA*), redutase NADPH dependente (*phaB*) e PHA polimerase (*phaC*) (Sudesh *et al.*, 2000).

Algumas linhagens de *Aeromonas* são capazes de acumular P3HB/3HHx a partir de óleos vegetais e ácidos alcanóicos (Kobayashi *et al.*, 1994, Lee *et al.*,

2000). Dado sua importância, os genes que sintetizavam PHAmcl em *A. caviae* têm sido clonados e heteroexpressado em *E. coli* recombinantes. Um destes genes, Enoil-CoA hidratase (*phaJ*) pode promover a formação de monômeros de 3-hidroxiálcanoatos para a síntese de PHA, o qual será essencial na produção pela via da β -oxidação em *E. coli*. Enoil-CoA é um intermediário para a ligação entre a β -oxidação de ácidos graxos e a síntese de PHA (Fukui *et al.*, 1997 e 1998). Durante a reação, acil-CoA desidrogenase catalisa a reação do acil-CoA para enoil-CoA, o qual tem sido relatado como sendo um fator limitante da β -oxidação de ácidos graxos (Qi e Rehm, 1998).

5.3.2 Obtenção de *Cupriavidus necator* pBBr::phaB

5.3.2.1 Construção do vetor pJM9131::phaB

Como os resultados apresentados pela linhagem *Burkholderia cepacia* IPT-048 não atingiram a quantidade e diversidade de polímeros pleiteados, tornou-se necessário a obtenção de linhagens recombinantes no qual o objetivo foi a realização de modificações do comportamento da PHA sintase visando aumentar sua afinidade por PHAmcl, o primeiro passo foi a analisar a seqüência de nucleotídeos do operon *phaCAB_{Re}*. Conforme trabalhos realizados, foram demonstrados que a possibilidade da retirada do gene *phaA* através da digestão com a enzima de restrição *StuI* e a religação do vetor pJM9131 (figura 50) construindo uma nova organização do operon consistindo apenas dos genes *phaCB* com a expressão ainda regulada pelo promotor original (Dennis *et al.*, 1998). Assim, a estratégia inicial proposta para a obtenção do gene *phaB_{re}* consistiu em digerir o vetor pJM9131 Δ *phaA* simultaneamente com a enzimas de restrição *StuI* e *EcoRV* seguido da ligação. Desta forma, obteve-se um plasmídeo contendo o gene *phaB* ainda sob o controle do promotor original. Posteriormente, este plasmídeo foi digerido com a enzima *HindIII*, seguida da ligação do fragmento contendo o gene *phaB* ao vetor pBBRMCS-2 (Kovacs *et al.*, 1995).

Figura 50 – Plasmídeos pJM9131 e pJM9131 Δ *phaA*

Garcia-Velandia e Garzon-Panesso (2002) confirmaram que o plasmídeo pJM9131 apresenta somente 2 sítios de restrição reconhecidos pela enzima *HindIII* e que, portanto, quando usada, produz somente 2 bandas em gel de agarose. Esse perfil de restrição implica que com a digestão do plasmídeo pJM9131 Δ *phaCA* com a enzima de restrição *HindIII* também devem ser obtidas duas bandas, uma com tamanho superior a 4,0 Kpb que deve conter os genes do operon *phaCAB*, mas cujo tamanho não pode ser determinado precisamente uma vez que, a sequência disponível não contempla a região dos sítios *HindIII*, e outro correspondendo ao restante do vetor. A digestão do vetor pJM9131 Δ *phaCA* confirmou esse perfil (figuras 51 e 52 – gel de eletroforese, amostras V e 4, respectivamente), ou seja, foram observados dois fragmentos, uma com o tamanho de cerca de 3 Kpb que deve conter o operon e uma com tamanho de aproximadamente 3 Kpb correspondente ao restante do vetor pJM9131.

Uma vez que o perfil esperado para o plasmídeo pJM9131 Δ *phaCA* foi confirmado, a etapa posterior foi a sua digestão com a enzimas *HindIII*. Após a digestão foram observadas 2 bandas no gel de eletroforese, uma com aproximadamente 5 Kpb e outra com cerca de 2,5 Kpb, sendo que, com base em resultados anteriores, uma das bandas deve corresponder ao vetor pJM9131. Analisando a figura 51 (bandas da amostra III), o fragmento contendo o gene *phaB* deve apresentar cerca de 2,3 Kpb.

A última etapa de isolamento do gene *phaB* consistiu de corte mecânico da banda de interesse e transferência para linhagem *Escherichia coli* S17-1 seguido de extração do DNA plasmidial e confirmação em gel de eletroforese (figura 51 - bandas da amostra IV).

Figura 51: Fase 1: Eletroforese de DNA plasmidial extraído de clones bacterianos nos quais foram inseridos os produtos da ligação de pJM9131 Δ phaA; pJM9131 Δ phaCA digeridos com *Stu*I, *Eco*RV e *Hind*III.

5.3.2.2 Transferência do vetor pJM9131::*phaB* para o vetor pBBR1MCS-2

Durante a construção foram utilizados dois vetores, ou seja, inicialmente, após sucessivos cortes para a retirada das seqüências *phaA* e *phaC*, consequentemente a obtenção dos produtos da ligação de pJM9131 Δ phaA; pJM9131 Δ phaCA digeridos com *Stu*I, *Eco*RV e *Hind*III, foi feito a ligação no vetor pJM9131 e, posteriormente, transferido para o vetor de amplo espectro de hospedeiro (pBBR1MCS-2).

Para a clonagem do gene *phaB* ao vetor pBBR1MCS-2, o plasmídeo foi digerido com a enzima de restrição *Hind*III e o produto desta ligação foi transferida para o vetor de amplo espectro o qual também foi digerido com a enzima de restrição. Posteriormente, o produto da ligação foi transferido por transformação

para a linhagem *Escherichia coli* XL1 Blue e colônias resistentes à canamicina e de cor esbranquiçada na presença de IPTG/XGal (isopropil tio- β -D-galactosídeo/5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo) foram selecionadas. As colônias selecionadas foram reativadas em CNK e, posteriormente, extraído o DNA plasmidial seguido de confirmação em gel de eletroforese, sendo denominado pBBR1MCS-2::*phaB*. Com a obtenção do produto de ligação pBBR1MCS-2::*phaB* foi feita a transferência para a linhagem *Escherichia coli* S17-1, sendo selecionando clones contendo o DNA plasmidial mutado.

A transferência dos plasmídeos mutados para a linhagem *Cupriavidus necator* DSM545 IPT-026, passando a ser denominada *Cupriavidus necator*::*phaB*, foi por conjugação (figura 52 – amostras 3 e 4) e os clones recombinantes foram avaliados quanto a produção de PHA utilizando o óleo de soja e ácido caprílico como fonte de carbono.

Convém ressaltar que, tentativas de inserção do plasmídeo contendo o operon *phaB* não foram bem sucedidas na linhagem *Burkholderia cepacia* IPT-048 devido o surgimento de clones espontâneos resistentes à canamicina (Km). A partir do momento que foi conseguido a linhagem *Cupriavidus necator*::*phaB* foram interrompidas as tentativas para *Burkholderia cepacia* no presente trabalho.

Figura 52: Fase 2: Eletroforese de DNA plasmidial extraído de clones bacterianos nos quais foram transferidos o produto da ligação de pJM9131 Δ phaCA digeridos com HindIII para o vetor pBBR1MC-2 e, posteriormente, para a linhagem *Cupriavidus necator* DSM545 IPT-026.

Os produtos das ligações obtidas e a linhagem controle foram submetidos aos experimentos de acúmulo. Taguchi *et al.* (2001) descreveram, em um estudo sobre a evolução *in vitro* de PHB sintase, que cepas de *E. coli* portando o operon *phaCAB_{Re}* com o gene *phaC_{Re}* mutado aleatoriamente por método de mutação com PCR (reação de polimerização em cadeia) apresentam um nível de P3HB abaixo dos resultado encontrados em cepas selvagens. Até o momento, nenhum clone com um acúmulo maior de PHB havia sido descrito, o que fez os autores concluírem que as enzimas do operon já estavam em sua eficiência máxima na cepa selvagem. Taguchi *et al.* (2003) criaram mutações somente em *phaC_{Re}* e clonaram esse gene em cepas de *Cupriavidus necator* PHB⁻ (*R. eutropha* PHB⁻⁴). Seus resultados indicaram que em algumas cepas apresentavam aumento na

quantidade de polímeros, assim como mudanças na composição dos monômeros com a formação de copolímeros. Normi *et al.* (2005) a partir dos trabalhos publicados de Taguchi *et al.* (2003) propuseram mutações sítio dirigida na posição 420 do gene *phaC_{Re}* e conseguiram uma atividade de polimerização da *phaC* mutada significativamente maior que a encontrada na linhagem selvagem, mas o percentual de PHB intracelular ainda continuava abaixo quando comparado a cepa selvagem. Zheng *et al.* (2006), extraíram a porção N terminal, equivalente a 88 aminoácidos do gene *phaC_{Re}*, como resultado obtiveram atividade extremamente reduzida e um acúmulo de apenas 1,5% de PHB comparado à linhagem selvagem. Como estes estudos demonstraram a viabilidade para a compreensão bioquímica da enzima sintetizada pelo gene *phaC_{Re}*. Em nossos estudos acreditamos que o aumento do número de cópias do gene *phaB_{Re}* traria resultados promissores quanto a mudanças no comportamento de síntese e acúmulo de PHAs.

5.4 Etapa IV - Produção PHAmcl em biorreator utilizando as linhagens *Cupriavidus necator* IPT-026 e *C. necator* recombinante IPT-026::*phaB*

Conforme relatado, acreditava-se que a linhagem *B. cepacia* IPT-48 apresentava uma característica para a produção de 3HB onde o crescimento bacteriano estaria associado ao acúmulo de polímero. Aparentemente, *C. necator* IPT-26 também caracteriza um processo no qual a síntese de 3HB e outros polímeros ocorrem associados à multiplicação celular, porém para Madison e Huisman (1999), *C. necator* disponibilizando glicose como fonte de carbono não começa o acúmulo de 3HB até que a bactéria tenha cessado sua multiplicação.

Inicialmente, foram realizados três ensaios em biorreator utilizando a linhagem *Cupriavidus necator* IPT026::*phaB*, as figuras a seguir correspondem a uma média dos valores experimentais e os calculados a partir deles. Para ambas as linhagens, IPT-026 e IPT-026::*phaB*, conforme apresentados nas figuras 53A e B, observa-se que a concentração de nitrogênio decresceram a partir do início do

processo atingindo valores de cerca de 0,26 mg/L e 0,51 mg/L na 8ª e 10ª hora, respectivamente. Este comportamento foi semelhante à linhagem *Burkholderia cepacia* nas diferentes variáveis testadas anteriormente. Neste mesmo intervalo, os valores obtidos para X_t foi de 0,98 a 1,22 g/L e 0,96 a 1,36 g/L, respectivamente. Apesar da limitação de nitrogênio ter ocorrido no início do processo observou-se um constante aumento da massa seca celular alcançando um total de 2,16 g/L para a linhagem IPT-026 na 32ª hora e 2,86 g/L para IPT-026::*phaB* na 48ª hora. Solaiman *et al.* (2001) demonstraram que *Pseudomonas putida* e *P. oleovorans* recombinantes com plasmídeo possuindo os genes da lipase foram capazes de multiplicarem-se a partir de gordura animal e óleos vegetais como única fonte de carbono (óleo de coco, soja e girassol). Os PHAmcl produzidos a partir dos óleos tinham como principais monômeros o 3-hidroxiocetanoato e o 3-hidroxidecanoato, respectivamente.

Figura 53A: Consumo de nitrogênio, concentração de biomassa total (X_t) e biomassa residual (X_r) para os ensaios utilizando as linhagens *C. necator* tipo IPT026 (A) e *C. necator* IPT026::*phaB* (B) em biorreator.

Figura 53B: Consumo de nitrogênio, concentração de biomassa total (Xt) e biomassa residual (Xr) para os ensaios utilizando as linhagens *C. necator* tipo IPT026 (A) e *C. necator* IPT026::*phaB* (B) em biorreator.

Apesar da redução significativa de nitrogênio ter sido entre 8^a e a 10^a hora este não interferiu no aumento da massa seca celular. Romero-Delgado (2006) obteve um rendimento de cerca de 20 g/L de Xr, entretanto, em seus experimentos foram adicionados ao sistema 40 g/L de óleo de soja divididas em duas adições de 20 g/L cada. Em nossos experimentos, a concentração de biomassa residual (Xr) alcançada foi de cerca de 1,0 g/L para ambas as linhagens (IPT-026 e IPT-026::*phaB*), respectivamente. Com a maior disponibilização de fonte de carbono, a quantidade obtida por Romero-Delgado de 3HB foi de 61,9%, enquanto que, em nosso caso utilizando 5 g/L a quantidade máxima obtida de 3HB foi de cerca de 65%.

A utilização de óleo vegetais e/ou derivados de óleo como fonte de carbono é considerado interessante para a síntese de PHAs, apesar da maioria dos trabalhos descreverem a utilização de carboidratos diversos como fonte de carbono para a produção de 3HB (Silva *et al.*, 2004; Ryu *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997, Wang e Lee 1997; Pataquiva, 2003; Tavares *et al.*, 2004). Fukui e Doi (1998) utilizaram uma concentração de óleo de oliva de 5 a 10 g/L para a

produção de PHAs e, em nossos ensaios, foi utilizado uma concentração inicial de óleo de soja de 5g/L apesar de já ter sido descrito a utilização de 15 g/L a 20 g/L de óleo (Tsuge *et al.*, 2004; Romero-Delgado, 2006). A concentração inicial escolhida baseou-se em testes previamente realizados em frascos agitados no qual se obteve rendimentos de 3HB em torno de 70%. A literatura relata valores de crescimento e acúmulo de 3HB para *Alcaligenes latus* utilizando carboidratos com fonte de carbono. Segundo Ramsay *et al.* (1990), *A. latus* alcança um teor de 3HB de 43% em meio limitado em nitrogênio e alimentado com sacarose, ao contrário da *C.necator* nas mesmas condições de cultivo acumulou cerca de 33% de 3HB (Romero-Delgado, 2006).

A redução da concentração do óleo de soja (figura 54) para as duas linhagens se deu após 24 horas, sendo de 2,5 g/L e 1,60 g/L para as linhagens IPT-026 e IPT026::*phaB*. Conforme o consumo, foi evidenciado a capacidade da linhagem IPT-026::*phaB* em utilizar o óleo como fonte de carbono pois a quantidade de PHA foi de 62,47%, enquanto que, na linhagem IPT-026 a quantidade obtida no mesmo período foi de 55,73%. Outra observação foi o rendimento total de PHA para a linhagem construída. Ao término do processo o teor de PHA obtido foi de cerca de 75% para uma concentração celular em torno de 3,0 g/L. Diferentemente, para a linhagem IPT-026, no mesmo período, foi observado um total de cerca de 65% de PHA e uma massa celular de cerca de 2,0 g/L. De acordo com o comportamento observado confirmou-se que à medida que houve redução da massa de óleo de soja adicionada observou-se aumento significativo na produção de PHA bem como aumento de X_t . As figuras 53A e 53B mostram os valores obtidos para X_t e X_r , respectivamente.

Figura 54: Consumo de óleo vegetal e produção da PHA para os ensaios utilizando as linhagens *C. necator* tipo IPT026 e *C. necator* IPT026::*phaB* em biorreator.

Fukui e Doi (1998), ao estudar *C. necator* cultivada em diversos óleos vegetais como fonte de carbono em meio mineral limitado em nitrogênio observaram valores de X_t de 3,6 a 4,3 g/L com um rendimento de 79 a 80% de 3HB acumulado. Tsuge *et al.* (2004) relataram um valor de X_t de 3,2 g/L e 83% de teor de PHA utilizando *C. necator* e óleo de soja como fonte de carbono. Em relação às quantidades obtidas por Fukui e Doi (1998), bem como Tsuge *et al.* (2004) foi possível obtermos valores semelhantes.

Como no presente trabalho, objetivou-se o aumento da quantidade de 3HHx e/ou outros polímeros de cadeia média pela elevação do número de cópias do gene *phaB*. Conforme apresentado na figura 55, o acúmulo máximo de 3HB e 3HHx pela linhagem IPT-026 foi de cerca de 65% (99,78 mol%) e 0,15% (0,22 mol%), respectivamente, após 16 horas de processo, enquanto que, a linhagem IPT026::*phaB* obteve-se um pequeno aumento no teor de unidades de 3HHx alcançando-se cerca de 70 % de 3HB (99,79 mol%) e 0,20% de 3HHx (0,21 mol%) após 44 horas de cultivo. A composição do PHA obtido também parece ser dependente do tempo, com maior quantidade de unidades 3HHx no início do

processo até cerca de 10 a 15 horas quando ainda há a presença de óleo de soja, como mostram as figuras 54 e 55.

Figura 55: Produção de 3HB, 3HHx e PHA total para os ensaios utilizando as linhagens *C. necator* tipo IPT026 (A) e *C. necator* IPT026::*phaB* (B) em biorreator.

Através dos resultados obtidos, verificamos que a linhagem recombinante não mostrou a total eficiência esperada, apesar do aumento do número de cópias do gene *phaB*, a síntese do monômero não ultrapassou 0,3% (0,25 mol%). Por outro lado, pode-se afirmar que houve uma melhora no que se refere ao teor total de acúmulo de biopolímero para IPT026::*phaB*. Além disso, diferente dos outros autores (Tsuge *et al.* 2004, Romero-Delgado, 2006) aparentemente a síntese de PHA nos experimentos parece estar fortemente associada ao crescimento celular. Observa-se pela figura 53B que o aumento da concentração de Xr se dá até cerca de 10 a 15 horas de cultivo concomitantemente com a elevação do teor de 3HB ou 3HHx na biomassa, segundo a figura 55.

Figura 56: Percentual molar de 3HB, 3HHx e PHA total para os ensaios utilizando as linhagens *C. necator* tipo IPT026 (A) e *C. necator* IPT026::*phaB* (B) em biorreator.

Kahar *et al.* (2004), a presença de ácidos graxos poderia afetar o crescimento bacteriano e, o uso de óleos vegetais com fração reduzida de ácido linolênico ($C18:3^{\Delta 9,12,15}$), possibilitaria maior crescimento bacteriano e consequentemente maior rendimento de 3HB. Durante a disponibilização de óleos vegetais como fonte de carbono para produção de PHAs muitos ácidos graxos são liberados no meio de cultura ao serem hidrolisados pelas lípases bacterianas podendo, segundo Kahar *et al.* (2004), afetar o comportamento bacteriano. Estes autores relatam que *C. necator* apresenta boa capacidade de multiplicação na presença de ácido palmítico ($C16:0$), ácido oléico ($C18:1\Delta^9$) e ácido linoléico ($C18:2\Delta^{9,12}$), com exceção do ácido linolênico ($C18:3\Delta^{9,12,15}$) no qual não se mostra eficiente. Os autores fizeram análises do perfil de ácidos graxos e relataram que durante o processo de fermentação ocorre um acúmulo de ácidos graxos livres. O uso de outros óleos vegetais com menor percentagem de ácido linolênico poderia dar como resultado maior crescimento bacteriano e, por consequência, maior acúmulo de 3HB. Por outro lado, temos que considerar que o óleo de soja contém ácido linolênico ($C18:3\Delta^{9,12,15}$) com um teor de cerca de 7% (Schuster, 2005). Confirmando esta hipótese de Kahar *et al.* (2004), Loo *et al.*

(2005) utilizaram óleo de semente de palma e de soja como fonte de carbono com *C. necator* e obteve valores maiores de Xt e PHA, a diferença entre os dois óleos é que o primeiro tem ácidos graxos saturados de 12 e 14 carbonos, enquanto o segundo tem ácidos graxos insaturados de 18 carbonos com 1, 2 e 3 insaturações. Estas seriam as possíveis explicações para uma baixa multiplicação bacteriana no trabalho não ultrapassando os 4,0 g/L em geral para os ensaios com a linhagem *C. necator* IPT-26.

Romero-Delgado (2006) descreve que para aumentar o acúmulo de 3HB poderia ser utilizada a amônia em fluxo constante durante a fase de acúmulo. Bitar *et al.* (1990) estudou o efeito da alimentação de amônia na fase de produção de 3HB por *C. necator*, relatando que a alimentação de amônia durante a fase de produção de 3HB pode aumentar a quantidade do polímero acumulado, os quais alcançaram um teor de 3HB de 42,5% (em ausência de amônia) a 62% (alimentado com amônia). A referida literatura confirma os resultados anteriormente obtidos por Suzuki *et al.* (1986) cuja alimentação com pequena quantidade de amônia durante a fase de acúmulo em culturas de *Protomonas extorquens* resultou em um aumento do conteúdo de 3HB quando comparado com culturas com deficiência de amônia. Em nossa hipótese de trabalho, acreditamos que o aumento do número de cópias do gene *phaB* poderia contribuir para o aumento do fluxo de carbono no sentido de elevar o rendimento tanto de 3HB quanto de outros monômeros. De acordo com resultados até o presente momento, novas propostas poderão auxiliar a fim de poder elucidar como as linhagens estão consumindo o óleo de soja bem como outros ácidos graxos e óleos vegetais, entretanto, partindo para uma nova rota metabólica como, por exemplo, envolvendo o gene *phaJ*. Além disso, novas construções poderão ser propostas para induzir o aumento do fluxo de carbono e consequentemente a síntese metabólica de 3HB e monômeros de cadeia média.

5.5 Etapa V - Manutenção do gene *phaB* na linhagem IPT-026::*phaB* em ensaios em frascos agitados

Posteriormente, a apresentação dos resultados obtidos com as linhagens IPT-026 e IPT-026::*phaB* continuamos o questionamento pelo fato da literatura apresentar resultados da possibilidade de síntese de PHAmcl a partir do óleo vegetal e ácidos graxos livres. Baseados nesta dúvida foram propostos novos ensaios, em frascos agitados, utilizando a linhagem juntamente com o óleo e o ácido caprílico na presença ou não do ácido acrílico. Um outro questionamento foi a manutenção do gene na linhagem IPT-026::*phaB*. Para solucionarmos este questionamento, células da linhagem controle e recombinada foram coletadas no início e no final do processo e, posteriormente extraído o DNA plasmidial. Através das análises eletroforética do DNA plasmidial extraído das linhagens de *Cupriavidus necator* foi constatado a permanência do plasmídeo durante todo o período conforme apresentado na figura 57. Convém ressaltar que, para que o DNA fosse extraído foi previamente ativado em meio mineral acrescido de frutose e meio mineral acrescido de frutose e canamicina para a linhagem IPT-026::*phaB*.

Figura 57: Eletroforese confirmatória de DNA plasmidial extraído de *Cupriavidus necator* DSM545 controle e *Cupriavidus necator* DSM545 IPT-026::*phaB* antes e depois do período de incubação em frascos agitados por 96 horas.

As figuras a seguir correspondem ao comportamento das linhagens em frascos agitados contendo óleo de soja e ácido caprílico adicionado ou não de ácido acrílico.

Como nos resultados obtidos anteriormente, a concentração para ambos os substratos foi de 5 g/L, bem como, o acrilato na concentração de 2,5 mM. Na tabela 21 foi apresentada o plano para o cultivo em frascos agitados, sendo analisado a cada 4 horas.

Tabela 21 - Plano para o cultivo em frascos agitados contendo 5,0 g/L de substratos com ou sem ácido acrílico

Ensaio	IPT-026	IPT-026:: <i>phaB</i>	Óleo de Soja (OS 5 g/L)	Caprilato (C8 5g/L)	Acrilato (2,5mM)
1	026*	-	OS	-	-
2	026*	-	OS	-	-
3	-	026:: <i>phaB</i> **	OS	-	Ac
4	-	026:: <i>phaB</i> **	OS	-	Ac
5	026*	-	-	C8	-
6	026*	-	-	C8	-
7	-	026:: <i>phaB</i> **	-	C8	Ac
8	-	026:: <i>phaB</i> **	-	C8	Ac

(*) linhagem *Cupriavidus necator* testada adicionando o de óleo de soja e/ou acrilato. OS) adição de 5,0 g/L de óleo de soja como fonte de carbono; (**) linhagem *Cupriavidus necator* recombinante testada adicionando o de óleo de soja e/ou acrilato. (OS) adição de 5,0 g/L de óleo de soja como fonte de carbono;

A insistência na utilização do ácido caprílico baseou-se no fato da possibilidade da(s) linhagem(s) oxidarem carbonos para a produção de células e energia e, no momento que houvesse a limitação de nitrogênio, iniciasse a fase

de acúmulo clivando dois carbonos para a produção de acetil-CoA e o restante da cadeia fosse armazenada na forma de 3HHx ou até mesmo 3HO.

A figura 58A mostra que com a disponibilização do ácido caprílico não houve a obtenção dos resultados esperados, muito pelo contrário, as linhagens tiveram sua capacidade replicativa inibida pelo substrato. Ao 16^a dia o X_t para a linhagem IPT-026::*phaB* não ultrapassou 0,25 g/L, enquanto que, para a linhagem controle no mesmo período o X_t foi de cerca de 0,12 g/L. Em ambas as linhagens, a velocidade específica máxima de crescimento celular foi de $0,006 \text{ h}^{-1}$ (figura 58B). Ao longo do período de incubação o X_t médio obtido foi de 0,16 e 0,18 g/L para as linhagens *C. necator* controle e *C. necator*::*phaB*, respectivamente.

A figura 59 mostra o comportamento das linhagens em ácido caprílico, entretanto, adicionado de ácido acrílico após o esgotamento da fonte de nitrogênio. Semelhante aos resultados obtidos anteriormente, a linhagem não se multiplicou conforme o esperado tendo sido inibidas pelo substrato. Em razão da inibição microbiana não foi detectado nenhum tipo de polímero.

Figura 58A: Análise comparativa da multiplicação das linhagens *Cupriavidus necator* e *Cupriavidus necator*::*phaB* durante o período de incubação de 48 horas a 30 °C/ 200 rpm em ácido caprílico 5g/L.

Figura 58B: Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{Xm\acute{a}x}$).

Figura 59: Análise comparativa da multiplicação das linhagens *Cupriavidus necator* e *Cupriavidus necator::phaB* durante o período de incubação de 48 horas a 30 °C/ 200 rpm em ácido caprílico 5g/L e ácido acrílico 2,5mM.

Nos frascos adicionados de óleo de soja com e sem o ácido acrílico o comportamento das linhagens foi o contrário aos observados com ácido caprílico. Na variável adicionada somente de óleo de soja, o X_t máximo obtido foi de cerca de 2,0 g/L na 28ª hora para as linhagens IPT-026 e IPT-026::*phaB* sendo iniciado os ensaios com 0,64 e 0,23 g/L, respectivamente (tabela 22 e figura 60A). De acordo com a capacidade de multiplicação a velocidade específica máxima de crescimento celular foi de 0,05 e 0,09 h⁻¹, respectivamente (figura 60B).

Figura 60A: Análise comparativa das linhagens *Cupriavidus necator* IPT-026 controle e *Cupriavidus necator*::*phaB* durante o período de incubação de 48 horas a 30 °C/ 200 rpm em óleo de soja 5g/L.

Figura 60B: Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{x_{\max}}$).

Ao longo do período de incubação, para ambas as linhagens, a quantidade de PHA e consequentemente o percentual de 3HB, na massa seca celular, foi de 22,95% (100 mol%) e 25,90% (100 mol%) na 28ª e 24ª horas, respectivamente. Ao compararmos o total de PHA obtido foi notado que, em frascos agitados, a medida que aumentamos a quantidade de substrato a linhagem teve sua capacidade de multiplicação, e por consequência a capacidade de síntese de polímeros reduzida.

Tabela 22 - Médias dos resultados obtidos no cultivo de *Cupriavidus necator* IPT-026 e *C. necator* IPT-026::*phaB* em meio mineral contendo 5 g/L de óleo de soja por 48h a 30°/ 200rpm

	Tempo	Xt	PHA						
			3HB		3HV		3HHx		% PHA
	h	g/L	%	mol%	%	mol%	%	mol%	
<i>C. necator</i> IPT-026 Linhagem controle	4	0,64	tr	tr	-	-	-	-	tr
	8	0,34	2,59	100,0	-	-	-	-	2,59
	12	1,25	12,26	100,0	-	-	-	-	12,26
	16	1,53	19,16	100,0	-	-	-	-	19,16
	24	1,90	22,04	100,0	-	-	-	-	22,04
	28	2,02	22,95	100,0	-	-	-	-	22,95
	32	1,77	20,62	100,0	-	-	-	-	20,62
	36	1,69	21,25	100,0	-	-	-	-	21,25
	40	1,78	21,28	100,0	-	-	-	-	21,28
	48	1,80	21,20	100,0	-	-	-	-	21,20
<i>C. necator</i> IPT-026::<i>phaB</i> Linhagem recombinante	4	0,23	tr	tr	-	-	-	-	tr
	8	0,26	tr	tr	-	-	-	-	tr
	12	0,48	tr	tr	-	-	-	-	tr
	16	1,21	10,83	100,0	-	-	-	-	10,83
	24	1,77	25,90	100,0	-	-	-	-	25,90
	28	1,96	18,75	100,0	-	-	-	-	18,75
	32	1,77	20,30	100,0	-	-	-	-	20,30
	36	1,74	19,34	100,0	-	-	-	-	19,34
	40	1,72	19,76	100,0	-	-	-	-	19,76
	48	1,78	18,69	100,0	-	-	-	-	18,69

tr – traços; 3HB – 3-hidroxibutirato; 3HV - 3-hidroxivalerato; 3HHx - 3-hidroxihexanoato; PHA – percentual total de polihidroxialcanoatos

Na condição adicionada de óleo de soja e o ácido acrílico o Xt foi crescente até a 48^a hora, sendo obtido cerca de 2,5 e 1,5 g/L para as linhagens IPT-026 e IPT-026::*phaB* tendo sido iniciado os ensaios com 0,34 e 0,27 g/L,

respectivamente (tabela 23 e figura 61A). De acordo com a capacidade de multiplicação a velocidade específica máxima de crescimento celular foi de 0,06 e 0,03 h⁻¹ (figura 61B).

Tabela 23 - Médias dos resultados obtidos no cultivo de *Cupriavidus necator* IPT-026 e *C. necator* IPT-026::*phaB* em meio mineral contendo 5 g/L de óleo de soja adicionado de ácido acrílico 2,5mM por 48h a 30°/ 200rpm

		PHA							
	Tempo	Xt	3HB		3HV		3HHx		% PHA
	h	g/L	%	mol%	%	mol%	%	mol%	
<i>C. necator</i> IPT-026 Linhagem controle	4	0,34	tr	tr	-	-	-	-	tr
	8	0,72	6,91	100,0	-	-	-	-	6,91
	12	1,02	12,83	100,0	-	-	-	-	12,64
	16	1,26	13,14	100,0	-	-	-	-	13,01
	24	1,96	9,24	100,0	-	-	-	-	20,70
	28	2,29	24,38	100,0	-	-	-	-	24,29
	32	2,33	23,99	100,0	-	-	-	-	23,91
	36	2,47	25,96	100,0	-	-	-	-	25,96
	40	2,47	25,38	100,0	-	-	-	-	25,38
	48	2,68	26,99	100,0	-	-	-	-	26,86
<i>C. necator</i> IPT-026:: <i>phaB</i> Linhagem recombinante	4	0,27	tr	tr	-	-	-	-	tr
	8	0,37	tr	tr	-	-	-	-	tr
	12	0,47	tr	tr	-	-	-	-	tr
	16	0,35	tr	tr	-	-	-	-	tr
	24	0,46	0,48	100,0	-	-	-	-	0,48
	28	0,65	3,79	100,0	-	-	-	-	3,79
	32	1,12	8,63	98,90	-	-	0,13	1,10	8,62
	36	1,49	13,85	99,47	-	-	0,10	0,53	13,83
	40	1,60	13,60	99,45	-	-	0,10	0,55	13,59
	48	1,47	13,57	99,54	-	-	0,08	0,46	13,54

tr – traços; 3HB – 3-hidroxi butirato; 3HV - 3-hidroxi valerato; 3HHx - 3-hidroxi hexanoato; PHA – percentual total de polihidroxi alcanoatos

Figura 61A: Análise comparativa das linhagens *Cupriavidus necator* IPT-026 controle e *Cupriavidus necator*::*phaB* durante o período de incubação de 48 horas a 30 °C/ 200 rpm em óleo de soja 5g/L adicionado de ácido acrílico 2,5mM.

Figura 61B: Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{x\text{máx}}$).

Ao longo do período de incubação, para ambas as linhagens, a quantidade de PHA e consequentemente o percentual de 3HB, na massa seca celular, foi de 26,99% (100 mol%) e 13,57% (99,54 mol%) na 48^a hora, respectivamente. Um resultado interessante observado foi que, para a linhagem IPT-026::*phaB*, no momento que adicionamos o ácido acrílico iniciou o acúmulo de 3HHx a partir da 32^a hora variando de 0,13 (1,10 mol%) a 0,08% (0,46 mol%).

Independente da população presente no inóculo, apesar de ter sido utilizado os mesmos procedimentos que os ensaios anteriores, somente foi observado a produção de 3HB a partir de 24^a hora com uma concentração inicial de 0,48% (100 mol%) alcançando uma concentração máxima de 13,85% (0,53 mol%) juntamente com a presença de 0,10% (0,53 mol%) de 3HHx. A partir deste período observou-se a concentração de 3HHx reduziu até a 48^a hora.

6 CONCLUSÕES

(I) Seleção de microrganismos em frascos agitados:

Durante o período de incubação foi verificado que *Pseudomonas* spp. em óleo de soja (OS) atingiu 18,1% correspondente a 3HB. Apesar da maior população microbiana (2,27 g/L) ter sido na presença de ácido caprílico a quantidade de 3HB foi de 25,7%, enquanto que, na presença de ácido palmítico, cujo Xt foi de 2,07 g/L o total de 3HB foi de 30,5%. Na 96ª hora, observou-se um aumento do monômero 3HB alcançando 31,3% para o ácido caprílico e 38,3% para o ácido palmítico. Para o ácido caprílico e o óleo de soja a quantidade de polímeros não foi considerada satisfatória.

Devido ao comportamento de *Pseudomonas* sp. em relação a quantidade de polímeros obtidos julgou-se inviável a continuidade em ensaios posteriores uma vez que, outras linhagens possibilitaram a obtenção de melhores resultados na presença de óleo de soja.

Para a linhagem *Cupriavidus necator* H16 IPT-027, na presença do ácido caprílico, não foi observado a síntese de PHA nas primeiras 48 horas de incubação, entretanto, após 96 horas detectou-se 47,83% de PHA sendo 47,75% de 3HB e 0,08% de 3HHx (0,12 mol%). A adição do ácido acrílico em concentrações de 10 e 30 mM não atuou significativamente na produção de outros PHAs porém, interferiu na capacidade de multiplicação e consequentemente de acúmulo. Nos ensaios contendo o ácido caprílico a quantidade de 3HB na 48ª hora de incubação foi de 35,69%, com um Xt de 1,58 g/L. Com a disponibilização do ácido palmítico por 48 horas, a quantidade máxima de PHA alcançada foi de 40,90% e um Xt de cerca de 2,0 g/L sendo este total correspondente a 3HB. Após 96 horas de incubação a concentração de 3HB foi semelhante ao observado no ensaio adicionando ácido caprílico. Quando

incubado com 10 mM de ácido acrílico verificou-se que 3HHx atingiu numa concentração de 0,13% (1,03%mol).

Na presença de óleo de soja, *C. necator* H16 IPT-027 após a 48^a hora, a quantidade de 3HB foi de 5,25%, enquanto que, na 96^a hora o total de PHA foi de 65,32% e, diferentemente do ensaio adicionado de ácido capróico, não foi verificado a presença de 3HHx. Com a adição do ácido acrílico à 10 mM a quantidade de 3HB verificada na 96^a hora foi de 40,76% (99,17 mol%) e 0,45% de 3HHx (0,83 mol%), enquanto que, houve uma redução significativa da multiplicação celular e consequentemente a síntese de PHA quando adicionado 30 mM de ácido acrílico.

C. necator H16 IPT-027 com a disponibilização de ácido palmítico e óleo de soja juntamente com o ácido acrílico 10 mM foi obtido uma quantidade de 9,77% e 40,76% de 3HB, porém observou-se que do total de PHA verificado 0,13 e 0,45% correspondia a 3HHx (1,03 e 0,83 mol%, respectivamente).

C. necator DSM545 IPT-026 quando disponibilizado o ácido capróico tanto na ausência quanto em concentrações até 10 mM de ácido acrílico, foram obtidos cerca de 70% de PHA total. Durante a multiplicação microbiana e na ausência de acrilato, foi observado que a quantidades de 3HHx totalizava um 0,25% (0,44 mol%).

O máximo de PHA obtido, na ausência do ácido acrílico, foi de 61,30% sendo 61,21% de 3HB (99,7 mol%) e 0,90% de 3HHx (0,31 mol%). Na 72^a hora de incubação também foi detectado 3HV numa concentração de 0,36% (0,80 mol%) e 0,27 de 3HHx (0,35 mol%). Quando adicionado o ácido acrílico 2,5 mM a quantidade máxima de PHA foi de 35,77% na 96^a hora de incubação sendo que 34,58% correspondia a 3HB (85,8 mol%) e 1,20% de 3HHx (14,19 mol%). Após a adição do ácido acrílico (10 mM) observou-se na 96^a hora uma quantidade de

PHA em cerca de 70%, cujo valor era semelhante ao observado na ausência do inibidor.

Com a adição de ácido caprílico foi verificado que a linhagem *C. necator* DSM 545 IPT-026 também acumulava 3HHx, entretanto, em quantidades inferiores ao detectado com o ácido capróico. Em razão da baixa quantidade de PHA considerou-se inviável a continuidade com ácido palmítico em ensaios posteriores, bem como, pela dificuldade de homogeneização do substrato em meio mineral. Ao analisar a condição juntamente com o inibidor a 2,5 mM, concentrações de PHA foram detectadas na 96^a hora de incubação, ou seja, cerca de 85,0 % sendo 84,10 de 3HB (99,78 mol%) e 0,25 de 3HHx (0,22 mol%). Entre a 36^a a 72^a hora de incubação verificou-se a presença de 3HV variando de 0,32 (0,50 mol%) a 0,28 % (0,41 mol%) e, ainda entre a 72^a e 96^a hora de incubação além de 3HV observou-se a presença de 3HHx (0,2 mol%).

A partir dos resultados obtidos com *C. necator* DSM 545 IPT-026 considerou-se viável a continuidade de ensaios disponibilizando o ácido capróico e óleo de soja. Nas mesmas concentrações realizados ensaios adicionando o ácido acrílico em uma concentração máxima de 2,5 mM.

Burkholderia cepacia IPT-048 nos ensaios com o ácido capróico e ausência de acrilato acumulou na 24^a hora 25,6% de 3HB e na 48^a hora 2,22 g/L e uma quantidade de 3HB de 47,4% (100 mol%). Quando adicionado o ácido acrílico 2,5 mM o máximo de PHA foi de 49,78% na 72^a hora de incubação correspondendo a 99,27 mol% de 3HB. Diferentemente ao observado na ausência de acrilato, esta condição possibilitou detectar 3HV na 72^a hora de incubação em quantidades de 0,42% (0,73 mol%). Conforme foi aumentada a concentração do inibidor a quantidade de 3HV foi de 0,28% (0,63 mol%) quando adicionado o ácido acrílico a 10 mM e 4,58% (10,79 mol%) em uma concentração de 30 mM.

Burkholderia cepacia IPT-048 juntamente com o ácido acrílico 2,5 mM, a quantidade de PHA detectada na 96^a hora foi de 54,54 % sendo 53,13 de 3HB (97,78 mol%) e 1,40 de 3HV (2,22 mol%). Com a adição do ácido acrílico a 5,0 mM foi verificado na 48^a e 96^a horas de incubação que a quantidade de PHA variou entre 32,29 a 41,97% sendo observado, expressivamente, uma quantidade de 3HV de cerca de 0,40% (variação entre 1,0 a 1,4 mol%). Para os ensaios em biorreator considerou-se viável a continuidade disponibilizando o ácido capróico e óleo de soja juntamente com o ácido acrílico em uma concentração máxima de 2,5 mM.

A partir dos resultados obtidos, as linhagens escolhidas durante a seleção dos microrganismos para os ensaios em biorreator foram *Burkholderia cepacia* IPT-048 e *Cupriavidus necator* IPT-026

(II) Ensaios em biorreator utilizando a linhagem *Burkholderia cepacia* IPT-048

Quando disponibilizado somente o óleo de soja foi obtido um resultado interessante, ou seja, a presença de 3HHx numa quantidade de 12,50% (48 mol%), entretanto a medida que houve a multiplicação da linhagem *B. cepacia* esta concentração foi reduzindo observando-se ao término de processo uma concentração de cerca de 3,0% (5,0 mol%).

A disponibilização do óleo de soja juntamente com o ácido acrílico contribuiu para a síntese de 3HV. A concentração de 3HV atingiu um máximo de 1,60% (2,76 mol%) na 38^a hora. Para 3HB a quantidade obtida, a partir da adição de acrilato, variou de 23,71 (99,56) a 48,40% (97,24 mol%), enquanto que, o rendimento de 3HV variou de 0,43 (0,97) a 1,58% (3,05 mol%). Com estes resultados evidenciou que a linhagem utilizou do ácido acrílico como fonte de carbono consequentemente a formação de acrilil-CoA para a síntese de HV.

Adição de ácido caprílico na 10^a hora do processo como co-substrato não contribui no aumento da quantidade de 3HHx e, nos ensaios posteriores, o ácido acrílico também não influenciou para o aumento dos monômeros 3HVe 3HHx.

As variáveis manipuláveis propostas quanto ao fluxo de óleo de soja, de co-substratos na modulação do teor de 3HB/3HAMcl não influenciaram na obtenção dos polímeros HV e HHx formado quando utilizado *Burkholderia cepacia* IPT-048.

(III) Obtenção de linhagens recombinantes produtoras de polihidroxialcanoatos: influência do gene acetoacetyl-CoA redutase NADPH dependente (*phaB*)

- Obtenção da linhagem *Cupriavidus necator* IPT026::*phaB*, porém não influenciou significativamente na produção de PHAmcl.

(IV) Produção PHAmcl em biorreator utilizando as linhagens *Cupriavidus necator* IPT-026 e *C. necator* recombinante IPT-026::*phaB*

O aumento do número de cópias do gene *phaB* pouco contribuiu para o aumento do fluxo de carbono no sentido de elevar o rendimento tanto de 3HB quanto de outros monômeros. Obtenção da linhagem *Cupriavidus necator*::*phaB*

(V) Manutenção do gene *phaB* na linhagem IPT-026::*phaB* em ensaios em frascos agitados

Através das análises eletroforética do DNA plasmidial extraído das linhagens de *Cupriavidus necator*::*phaB* foi constatado a permanência do plasmídeo durante todo o período de processo.

A adição de ácido caprílico em um concentração de 5 g/L inibiu a multiplicação tanto de *Cupriavidus necator* quanto da linhagem recombinante

Cupriavidus necator::phaB. Em razão da inibição microbiana não foi detectado nenhum tipo de polímero. Não houve a confirmação que a disponibilização do ácido caprílico auxilia na produção de 3HHx a partir do momento que houvesse a hidrólise de 2 carbonos para a formação de acetil-CoA.

Na presença de óleo de soja ao longo do período de incubação, para ambas as linhagens, a quantidade de PHA e consequentemente o percentual de 3HB, na massa seca celular, foi de 22,95% (100 mol%) e 25,90% (100 mol%) na 28^a e 24^a horas, respectivamente. Entretanto, um resultado interessante observado foi que, para a linhagem IPT-026::*phaB*, na presença do ácido acrílico iniciou o acúmulo de 3HHx a partir da 32^a hora variando de 0,13 (1,10 mol%) a 0,08% (0,46 mol%).

Propostas futuras

- Aprimoramento nos processos poderão ser propostos para descartar a influência do gene *phaB* durante a beta-oxidação.
- Avaliação comparativa entre as rotas metabólicas envolvendo os genes *phaB* e *phaJ*.

REFERÊNCIAS

Ahn WS, Park SJ, Lee SY. Production of Poly (3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombination *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. *Appl Environmental Microbiol.* 2000;212:247-249.

Akiyama M, Tsuge T, Doi Y. Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polym Degrad Stab.* 2003;80:183-94.

Amass W, Amass A, Tighe B. A review of biodegradable polymers: uses, current development in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of polymers and recent advances in biodegradation studies *Polymer International.* 1998;47:89-144.

Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev.* 1990;54(4):450-472.

Ansede JH, Pellechia PJ, Yoch DC. Metabolism of acrylate to beta-hydroxypropionate and its role in dimethylsulfoniopropionate lyase induction by a salt marsh sediment bacterium, *Alcaligenes faecalis* M3A. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Nov; 65(11): 5075-81.

Ansede JH, Pellechia PJ, Yoch DC. Nuclear magnetic resonance analysis of [1-13C]dimethylsulfoniopropionate (DMSP) and [1-13C]acrylate metabolism by a DMSP lyase-producing marine isolate of the alpha-subclass of Proteobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Jul;67(7):3134-9.

Antonio R, Steinbüchel A, Rehm BHA. Analysis of *in vivo* substrate specific of the PHA synthase from *Ralstonia eutropha*: formation of novel copolyester in recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 2000; 182:111.

Aragão GMF. Production de polyhydroxyalkanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures [these]. France: L'institut National des Science appliquées de Toulouse; 1996.

Ashby RD, Solaiman DK, Foglia TA. The synthesis of short- and medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) mixtures from glucose- or alkanoic acid-grown *Pseudomonas oleovorans*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2002 Mar;28(3):147-53.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. c2003 – [update 2005 June 15; cited 2006 May 16]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Ashby RD, Solaiman DKY, Foglia TA. Synthesis of short-/medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. *Biomacromolecules*. 2005; 6 (4): 2106 -2112.

Ashby, RD, Foglia, TA. Poly(hydroxyalkanoates) biosynthesis from triglycerides substrate. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1998;49:431-37.

Associação Brasileira das Empresas de Biotecnologia. 6º Congresso e Exposição das Empresas de Biotecnologia - ABRABI 2005. 6º Congresso e Exposição das Empresas de Biotecnologia - ABRABI 2005. 2005.

Associação Brasileiras de Óleos Vegetais. Disponível em: <http://www.abiove.com.br> Acesso em: em 20 de janeiro de 2008.

Birnboim HC, Dolly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res*. 1979; 7(6):1513-25.

Bitar A, Underhills S. Effect of ammonium supplementation on production of poly- β -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in batch culture. *Biotech Lett*. 1990;12(8):563-568.

Bosetti A, van Beilen JB, Preusting H, Lageveen RG, Witholt B. Production of primary aliphatic alcohols with a recombinant *Pseudomonas* strain. *Enzyme Microb. Technol*. 1992; 14:702–708.

Brandl H, Gross RA, Lenz RW, Fuller RC. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(3-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters In: Ghose TK, Flechter A, editors. *Advances in biochemical engineering/Biotechnol*, Berlin: Springer Verlag, 1990. p.77-93.

Brandl H, Gross RA, Lenz RW, Fuller RC. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl Environ Microbiol*. 1988; 54:1977-1982.

Braunegg G, Lefebvre G, Genser KF. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *J of Biotechnol*. 1998; 65: 127-161.

Bueno Netto CL, Craveiro AM, Pradella JGC, Oliveira MS, Maiorano AE, Pinto AG, Matsubara RMS. Patente Brasileira PI 9103116-8. Processo para produzir polihidroxialcanoatos a partir de açúcares extraídos da cana de açúcar INPI 2000.

Bueno Netto CL. Produção de plásticos biodegradáveis a partir da cana-de-açúcar por via biotecnológica. Convênio n.64 92 0201 00 PADCT-FINEP. 1991

Buffoni E, Gomez JGC, Silva LF. Avaliação da Composição de Polímeros Biodegradáveis Produzidos por *Burkholderia sacchari* a partir de Diferentes Substratos. In: SINAIFERM XV Simpósio Nacional de Bioprocessos; Recife: 2005.

Anais - Programa e trabalhos completos do SINAFERM XV Simpósio Nacional de Bioprocessos; 2005; p.633.

Byrom D. Industrial production of copolymers from *Ralstonia eutropha* Novel biodegradable microbial polymers. In: Dawes EA, editor. Novel biodegradable microbial polymers. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic; 1990. p.113-117.

Byrom D. Polymer synthesis by microorganisms: Technology and economics. Trends Biotechnol. 1987; 5(9): 246-250.

Byrom D. Production of poly- β -hydroxybutyrate and poly- β -hydroxyvalerate copolymers. Microbiol Rev. 1992; 103:937-942.

Campbell JW, Cronan Jr, JE. The Enigmatic *Escherichia coli* fadE gene is yafH. J Bacteriol. 2002 July; 184(13): 3759–3764.

Chandra R, Rustgi R. Biodegradable polymers. Progress in Polymer Science. 1998; 23(7): 1273-1335.

Choi J, Lee SY. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation Appl Microbiol Biotechnol. 1999; 51:13-21.

Chulia D, Deleuil M, Pourcelot Y. Powder Technology and Pharmaceutical Processes. Amsterdam: Elsevier Science; 1994. ISBN: 0444815333.

Costa RCS, Pereira, FS, Taciro, MK, Rodrigues MFA, Pradella JG. Controle da Biossíntese de poli-hidroxialcanoatos bacterianos através do fluxo de substratos. Química Nova. 2007; 30:53-55.

Cox MK. Properties and applications of PHAs. In: Doi Y, Fukuda K, editors. Biodegradable Plastics and Polymers. Elsevier: Amsterdam; 1994. p.120-135.

Cromwick AM, Flogia T, Lenz RW. The microbial production of poly(hydroxyalkanoates) from tallow. Appl Microbiol Biotechnol. 1996;46: 464-69.

Dawes EA. The role and regulation of poly- β -hydroxybutyrate as reserve material in microorganisms. In: International Symposium on Macromolecules; Rio de Janeiro; 1997. Elsevier Scientific Publishing; 1973. p.433-450.

De Koning G. Physical properties of bacterial poly (R-3-hydroxyalkanoates) Can J Microbiol. 1995 suppl 1 (41):303-309.

De Koning GJM, Kellerhals M, van Meurs C, Witholt B. (1997) A process for the production of bacterial medium-chain-length poly[(R)-3-hydroxyalkanoates]: reviewing the status quo. In: Eggink G, Steinbüchel A, Poirier Y, Witholt B. (ed.). International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates. NRC Research Press – Ottawa.1996. p.137-141

De Smet MJ, Eggink G, Witholt B, Kingma J, Wynberg H. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. J Bacteriol. 1983 May; 154(2): 870–878.

De Waard P, van der Wal H, Huijberts GN, Eggink G. Heteronuclear NMR analysis of unsaturated fatty acids in poly(3-hydroxyalkanoates). Study of beta-oxidation in *Pseudomonas putida*. J Biol Chem. 1993; 268(1): 315-319

Dennis D, McCoy M, Stangl A, Valentin HE, Wu Z. Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha*. J Biotechnol. 1998; 64(8):177-186.

Desai SJ, Simonelli A, Higuchi WI. Investigation of factors influencing release rate of solid drug dispersal in Inert Matrices. J Pharm Sci. 1965; 54: 1459-1464.

Di Russo CC, Black N, Weimar JD. Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from Bacteria. Prog Lipid Research. 1999; 38: 129-197.

Doi Y, Kitamura S, Abe H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). Macromolecules. 1995; 28: 4822-4828.

Doi Y, Kunioka M, Nakamura Y, Soga K. Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from ¹³C-labelled acetate and propionate. Macromolecules. 1987; 20: 22988-22991.

Doi Y. Microbial Polyesters. United States: Wiley-VCH; 1990.

Doi, Y, Segawa, A, Kawaguchi, Y, Kunioka, M Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus* FEMS Microbiol Lett. 1990; 67:165-170.

Donbrow M. Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy. Boca Raton: CRC Press, 1992. p.347.

Du GC, Chen J, Yu J, Lun S. Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. J of Biotechnol. 2001; 88:59-65.

Du GC, Chen J, Yu J, Lun S. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha* Biochem Engineer J. 2000; 8(4): 103-110.

Du GC, Yu J. Metabolic analysis on fatty acids utilization by *Pseudomonas oleovorans*: mcl-poly(3-hydroxyalkanoates) synthesis versus β -oxidation. Process Biochemistry. 2002; 38:325-332.

Eggink G, De Waard, P, Huijberts, GN. Formation of novel poly(hydroxyalkanoates) from long-chain fatty acids. *Can J Microbiol.* 1995 Suppl 1; 41:14-21

Eggink G, Wal H, Huijberts GNM, De Waard P. Oleic acid as a substrate for poly-3-hydroxyalkanoate formation in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas putida*. *Industrial Crops and Products.* 1993; 1:157-163.

Egilmez NK, Jong YS, Sabel MS, Jacob JS, Mathiowitz E, Bankert RB. In situ tumor vaccination with interleukin-12-encapsulated biodegradable microspheres: Induction of tumor regression and potent antitumor immunity *Cancer Research.* 2000; 60: 3832-3837.

Folkman J, Long DM. The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy. *J Surg Res.* 1964; 4(3): 139-142.

Fonseca GG, Antonio RV. Use of vegetable oils as substrates for medium chain-length polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol.* 2006; 5(3): 277-279.

Freitas TS. Isolamento de um novo *Bacillus cereus* produtor de polihidroxialcanoato (PHA) e caracterização da PHA sintase e da PHA polimerase [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

Füchtenbusch B, Fabritius D, Steinbüchel A. Incorporation of 2-methyl-3-hydroxybutyric acid into polyhydroxyalkanoic acids by axenic cultures in defined media. *FEMS Microbiol Lett.* 1996; 138: 153-160.

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 Microbiol Lett.* 1998; 159: 85-92.

Fukui T, Doi Y. Efficient production of from plant oils by polyhydroxyalkanoates from *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. Short contribution *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997; 49: 333-36.

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.* 1998; 18: 667-673.

García B, Olivera ER, Miñambres B, Fernández-Valverde M, Cañedo LM, Prieto MA, García JL, Martínez M, Luengo JM. Novel biodegradable aromatic plastic from a bacterial source Genetic and biochemical studies from a route of the phenylacetyl-CoA catabolon. *J Biol Chem.* 1999 Oct 8; 274(41):29228-241.

Garcia-Velandia SA, Garzon-Panesso AC. Production de poli(3HB-3HAMcl) em bactérias y clonaje de los genes de la biosíntesis de PHAs de *Ralstonia eutropha*. [TCC]. Bogotá: universidad Javeriana; 2002.

Gombert AK, Nielsen J. Mathematical Modelling of Metabolism. Current Opinion In Biotechnol. 2000; 11(2): 180-186.

Gomez JCG, Rodrigues MFA, Alli RC, Torres BB, Bueno Netto CL, Oliveira MS, Silva LF. Evaluation of soil Gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. Appl Microbiol Biotechnol. 1996; 45: 785-791.

Gomez JGC. Produção por *Pseudomonas* sp de polihidroxicanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2000.

Gomez JGC, Fontolan V, Alli RC, Rodrigues MFA, Bueno Netto CL, Silva LF, Simões DA. Production of P3HB-co-3HV by soil isolated bacteria able to use sucrose. Revista de Microbiologia. 1997; 28: 43-48.

Gomez JGC, Fontolan V, Alli RC, Rodrigues MFA, Bueno Netto CL, Silva LF, Simões DA. Polímeros bacterianos para plásticos biodegradáveis. In: II Congresso Brasileiro de Polímeros, 1993, São Paulo. Anais do 2º Congresso Brasileiro de Polímeros; 1993. p. 351-356.

Green PR, Kempere J, Schechtman L, Guo L, Satkowski M, Fiedler S, Steinbüchel, A, Rehm HA. Formation of short chain length/medium chain length polyhydroxyalkanoate copolymers by fatty acid β -oxidation inhibited *Ralstonia eutropha*. Biomacromolecules. 2002; 3: 208-213.

Han J, Qiu YZ, Liu DC, Chen CQ. Engineered *Aeromonas hydrophila* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with alterable monomers composition FEMS Microbiol Lett. 2004; 239(1): 195-201.

Hänggi UJ. Requirements on bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumer goods. FEMS Microbiol Reviews. 1995; 16(2-3): 213-220.

Haywood GW, Anderson AJ, Chu L, Dawes EA. Accumulation of polyhydroxyalkanoates by bacteria and the substrate specificities of the biosynthetic enzymes. Biochem Soc Trans. 1988; 60: 1046-1047.

Haywood GW, Anderson AJ, Chu L, Dawes EA. Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol Lett. 1989; 52: 91-96.

Haywood GW, Anderson AJ, Ewing DF, Dawes EA. Accumulation of polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxy-decanoate from simple carbohydrate substrate by *Pseudomonas* sp strain NCIMB 40135. Appl Environ Microbiol. 1990; 56: 3354-3359.

Hazer B, Demirel SI, Borcakli M, Eroglu MS, Cakmak BE. Free radical crosslinking of unsaturated bacterial polyesters obtained from soybean oily acids. Polymer Bulletin. 2001; 46: 389-394.

Herbert RA, Ranchou-Peyruse A, Duran R, Guyoneaud R, Schwabe S. Characterization of purple sulfur bacteria from the South Andros Black Hole cave system: highlights taxonomic problems for ecological studies among the genera *Allochromatium* and *Thiocapsa*. Environ Microbiol. 2005 Aug; 7(8): 1260-8.

Holland SJ, Tighe BJ. Biodegradable polymers. In: Advances in Pharmaceutical Science. Academic Press, London. 1992; 6: 101-164.

Holtwick R, Meinhardt F, Keweloh H. Cis-trans isomerization of unsaturated fatty acids: cloning and sequencing of the *cti* gene from *Pseudomonas putida* P8. Appl Environ Microbiol. 1997; 63: 4292-4297.

Huijberts GNM, De Rijk TC, De Waard, Eggink, G. ¹³C-NMR studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly-(3-hydroxyalkanoate) synthesis. J Bacteriol. 1994; 176: 1661-1666.

Huisman GW, De Leeuw O, Eggink G, Witholt B. Synthesis of polyhydroxyalkanoates is a common feature of Fluorescent Pseudomonads, Appl Environ Microbiol. 1999; 55(8): 1949-1954.

Huisman GW, Wonink E, Meima R, Kazemier B, Terpstra P, Witholt B. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas oleovorans*: identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. J Biol Chem. 1991; 266: 2191-2198.

Hustede E, Steinbüchel A. Characterization of the polyhydroxyalkanoate synthase gene *locus* of *Rhodobacter sphaeroides*. Biotechnol Lett. 1993; 15: 709-714.

Iamamura S, Ueda S, Mizugaki M, Kawaguchi A. Purification of the multi-enzyme complex for fatty acid β -oxidation from *Pseudomonas fragi* and reconstitution of the fatty acid oxidation system. J Biochem. 1990; 107: 184-189.

Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo e CEMPRES (Compromisso Empresarial para Reciclagem). Manual de Gerenciamento Integrado – Lixo Municipal. São Paulo: IPT/CEMPRE; 2000. p.144-155.

Jalil R, Nixon JR. Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. J Microencapsulation. 1990; 7(3): 297-325.

Portilho C. Brasil poderá produzir plásticos biodegradáveis no ano de 2000. Jornal do Plástico. 1999. Disponível em: <http://www.jorplast.com.br/secoes/Fev99.html> [2008 jan 25].

Kahar P, Agus J, Kikkawa Y, Taguchi K, Doi Y, Tsuge T. Effective production and kinetic characterization of ultra-high-molecular-weight poly (R)-3-hydroxybutyrate in recombinant *Escherichia coli*. Polym Degrad Stab. 2005; 87:161–169.

Kahar P, Tsuge T, Taguchi K, Doi Y. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. Polym Degrad Stab. 2004; 83: 79-86.

Kato M, Fukui T, Doi Y. Biosyntheses of polyester blends by *Pseudomonas* as 61-3 from alkanolic acids. Bull Chem Soc Jpn. 1996; 69: 515-20.

Khanna S, Srivastava AK. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates Process Biochemistry. 2005a; 40: 607-619.

Khanna S, Srivastava AK. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. Process Biochemistry. 2005b; 40: 2173-2182.

Kichise T, Fukui T, Yoshida Y, Doi Y. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) by recombinant *Ralstonia eutropha* and effects of PHA synthase activity on in vivo PHA biosynthesis. Int J Biol Macromol. 1999; 25: 69–77.

Kidwell J, Valentin H, Dennis D. Regulated expression of the *Alcaligenes eutrophus* PHA biosynthesis genes in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 1995; 61(4): 1391-98.

Kim BS, Lee SC, Lee SY, Chang HN, Chang YK, Woo SI. Production of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) by Fed-Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* with Glucose Concentration Control. Biotechnol and Bioengineering. 1994; 43:892-898.

Kim SW, Kim P, Lee HS, Kim JH. High production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from *Methylobacterium organophilum* under potassium limitation. Biotechnol lett. 1996; 18: 25-30.

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 Polymers. 1994; 410-416.

Kovach ME, Elzer H, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, Peterson KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene. 1995; 166: 175-176.

Lafferty RM, Korsatko B, Korsatko W. Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid. In: Rhem, H J, Reed, G (editors) Biotechnol Weinheim: VCH; 1988. p.136-176.

Lageveen RG, Huisman GW, Preusting H, Katelaar P, Eggink G, Witholt B. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. Appl Environ Microbiol. 1988; 54: 2924–2932.

Langer R, Cima LG, Tamada JA, Wintermantel E. Future directions in biomaterials. Biomaterials. 1990; 11: 738-745.

Leaf TA, Srienc F. Metabolic Modeling of Polyhydroxybutyrate Biosynthesis. J. Biotechnol and Bioengineering. 1997; 57:557-563

Lee SY, Choi J, Wong HH. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. International J Biological Macromol. 1999; 25: 31-36.

Lee SY, Choi JI, Chang HN. Process development and economic evaluation for the production of polyhydroxyalkanoates by *Alcaligenes eutrophus* In: Eggink, G, Steinbüchel, A, Poirier, Y, Witholt, B (eds) International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Ottawa Proceedings. Ottawa: NRC Research Press; 1997. p.127-136.

Lee SY, Wong HH, Choi JI, Lee SH, Lee SC, Ha CS. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* under phosphorus limitation. Biotechnol Bioeng. 2000; 68: 466-470.

Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. Trends Biotechnol. 1996; 14(3): 98-105.

Lemoigne, M. Products of deshydration and of polymerization of β -hydroxybutyric acid. Bull Soc Chem Biol. 1926; 68:770-782.

Liebergesell M, Rahalkar S, Steinbüchel A. Analysis of the *Thiocapsa pfennigii* polyhydroxyalkanoate synthase: subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases with the corresponding *Chromatium vinosum* enzyme. Appl Microbiol Biothechnol. 2004; 19: 186-194.

Liebergesell M, Sonomoto K, Madkour, M, Mayer F, Steinbüchel A. Purification and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid) synthase from *Chromatium vinosum* and localization of the enzyme at the surface of poly(hydroxyalkanoic acid) granules. Eur J Biochem. 1994; 226(1): 71-80.

Liebergesell M, Steinbüchel A. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyric acid) biosynthetic genes of *Thiocystis violacea*. Appl Microbiol Biotechnol. 1993; 38: 493-501.

Liebergesell, M, Mayer, M, Steinbüchel, A Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacteria reveals synthesis of a polyester exhibiting an unusual composition. Appl Microbiol Biothechnol. 1993; 40:292-300.

Loo CY, Lee WH, Tsuge T, Doi Y, Sudesh K. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant. Biotechnol Lett. 2005; 27: 1405-1410.

Lu X, Zhang J, Wu Q, Chen GQ. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid β -oxidation pathway in *E. coli*. FEMS Microbiol Lett. 2003; 221(1): 97–101.

MacCool GJ, Cannon MC. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. J Bacteriol. 2001; 183: 4235-4223.

Madison LL, Huisman GW. Metabolism engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. Microbiol Mol Biol Rev. 1999; 63: 21-53.

Matsumoto K, Matsusaki M, Taguchi K, Seki M, Doi Y. Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates inclusions and their associated proteins in *Pseudomonas* sp. 61-3. Biomacromolecules. 2002; 3:787-792

Matsusaki H, Abe H, Doi Y. Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. Biomacromolecules. 2000; 1:17-22.

Merrick, J M, Doudoroff, M Enzymatic synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid in bacteria. Nature; 1961; 189:890-92.

Michelin-Ramos ME. Caracterização de linhagens bacterianas para a produção de poli-3-hidroxibutirato (P3HB) a partir de bagaço de cana-de-açúcar [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2003.

Moskowitz GJ, Merrick JM. Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate enzymatic synthesis of D-(-)- β -hydroxybutyryl Coenzyme A by an enoyl hydratase from *Rhodospirillum rubrum*. Biochemistry. 1969; 8: 2748-55.

Nikel PI, Almeida A, Melillo EC, Galvagno MA, Pettinari, MJ. New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by products. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(6): 49-54.

Noda I, Satkowski MM, Dowrey AE, Marcott C. Polymer alloys of Nodax copolymers and poly(lactic acid). Macromol Biosci. 2004 Mar 15; 4(3): 269-75

Nogueira NR, Gomes RS, Gomez, JGC, Silva LF. Estudo dos Genes Envolvidos na Biossíntese de Plástico em *Burkholderia sacchari*. In: SINAFERM XV Simpósio

Nacional de Bioprocessos, 2005, Recife. Anais - Programa e Trabalhos completos SINAFERM XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2005. p. 211.

Nonato R, Mantelatto E, Rossell CE. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol Appl Microbiol Biotechnol. 2001; 57:1-5.

Normi YM, Hiraishi T, Taguchi S, Abe H, Sudesh K, Najimudin N, Doi Y. Characterization and properties of G4X mutants of *Ralstonia eutropha* PHA synthase for poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis in *Escherichia coli*. Macromolecular Bioscience. 2005; 5(3): 197-206.

Oeding V, Schlegel HG. β -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. Biochem J. 1973; 134: 239-248.

Ojumo T, Yu J, Solomon B. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. African J Biotechnol. 2004; 3:18-24.

Olivera ER, Carnicero D, Jodra R, Miñambres B, Garcia B, Abraham GA, Gallardo A, San Roman J, Garcia JL, Naharro G, Luengo JM. Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. Environ Microbiol. 2001; 3:612–618.

Page WJ. Waste source for polyhydroxyalkanoate production In: International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates, 1997, Ottawa Proceedings. Ottawa: NRC Research Press; 1997. p. 56-65.

Park SJ, Choi J, Lee SY. Engineering of *Escherichia coli* fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates. Enzyme Microbiol Technol. 2005; 36: 579-588.

Park SJ, Park JP, Lee SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates rich in specific monomers. FEMS Microbiol Lett. 2002; 214:217-220.

Pataquiva, AYM. Melhoramento das condições de produção de polihidroxibutirato a alta densidade celular em biorreatores Airlift. [dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2003.

Patel SS, Walt DR. Substrate specificity of acetyl coenzyme A synthetase. J. Biol. Chem. 1987; 262(15): 7132-7134.

Pedrini MRS, Souza JAR, Aragao GMF, Furigo Júnior A. Aplicação de um biorreator airlift com circulação externa em fermentações com *Ralstonia eutropha*. In: VI Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas - SHEB, 1999, Maringá - PR. Anais do SHEB; 1999. p.26.

Peoples O, Synskey AJ. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16 Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC). J Biol Chem. 1989; 264: 15298-15303.

Pereira FS, Rodrigues, MFA, Pradella JG. Influência do pH e da temperatura sobre o acúmulo do poli-3-hidroxi-4-pentenoato por *Burkholderia cepacia*. In: XXI Congresso de Microbiologia; 2001; Resumos 2001. Foz do Iguaçu. XXI Congresso de Microbiologia; Foz do Iguaçu, Brasil; 2001. p.327.

Pereira FS. Estudo do melhoramento da produção de poli-3-hidroxi-4-pentenoato por *Burkholderia* a partir de sacarose [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2002.

Pereira RM. Produção de Poli(3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxivalerato) por *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 sob diferentes condições de oferta de substratos [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1996.

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. 1992; 96: 73-80.

Pouton CW, Akhtar S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. Adv Drug Delivery Rev. 1996; 18: 133-162.

Pradella JGC, Silva LF, Taciro MK, Gómez JGC. Plásticos biodegradáveis a partir de matérias-primas renováveis. Rev Alcoolbrás. 2000; 57:44-45.

Pradella JGC. Biopolímeros e Intermediários Químicos. Relatório Técnico nº 84 396-205; 2006. Disponível em: http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06_biopolimeros.pdf. Acesso em: 24 fev. 2008.

Preusting H, Kingma J, Witholt B. Physiology and polyester formation of *Pseudomonas oleovorans* in continuous two-liquid-phase cultures Enzyme. Microbiol Technol. 1991; 13:770-780.

Purushothaman M, Anderson R, Narayana S, Jayaraman V. Industrial byproducts as cheaper medium components influencing the production of polyhydroxyalkanoates (PHA) - biodegradable plastics. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2001; 24 (3): 131-136.

Qi Q, Steinbüchel A, Rehm BHA. Metabolic routing towards polyhydroxyalkanoic acid synthesis in recombinant *Escherichia coli* (fadR): inhibition of fatty acid β -oxidation by acrylic acid. FEMS Microbiol Lett. 1998; 167(1): 89-94.

Queiroz Silva SR. Obtenção de mutantes deficientes na oxidação de ácidos graxos insaturados para produção de elastômeros biodegradáveis [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2003.

Ramsay BA, Lomaliza K, Chavarie C, Dubé B, Bataile, Ramsay JA. Production of Poly- β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric acids. *Appl Environ Microbiol.* 1990; 56(7):2093-2098.

Re MI, Rodrigues MFA. Polímeros biodegradáveis. Em: *Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação* São Paulo: Artliber Editora; 2006. p.149-159.

Rehm BHA, Antonio RV, Spiekermann P, Amara AA, Steinbüchel A. Molecular characterization of the poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) sintase from *Cupriavidus necator*: *in vitro* evolution, site-specific mutagenesis and development of a PHB sintase protein model. *Biochem Biophys Acta.* 2002 Jan 31;1594(1):178-90.

Rehm BHA, Steinbüchel A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *Int J Biol Macromol.* 1999; 25: 3-19.

Rehm BHA. Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoates granules: a platform technology for the production of tailor-made bioparticles. *Curr Issues Mol Biol.* 2007; 9(1): 41-62.

Rehm BHA. Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases. *Biotechnol Lett.* 2006; 28(4): 207-213.

Rehm BHA. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem J.* 2003; 376(1): 15-33.

Riis V, Mai W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *J Chromatogr.* 1988; 445:285–289.

Rocha RCS, Pereira FS, Taciro MK; Rodrigues MFA; Pradella JGC. Controle da biossíntese de poli-hidroxialcanoatos bacterianos através do fluxo de substratos. *Quím Nova.* 2007; 30(1): 53-55.

Rocha RCS. Produção de poli-3-hidroxibuirato-co-3-hidroxivalerato por *Burkholderia sacchari* IPT189 [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2002.

Rodrigues MFA, Silva LF, Gomez JGC, Valentin HE, Steinbüchel A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid co-3-hydroxy-4-pentenoic acid) from unrelated substrates by *Burkholderia* sp. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1995; 43:880-886.

Rodrigues MFA, Vicente EJ, Steinbüchel A. Estudos on polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation in a PHA syntase I-negative mutant of *Burkholderia cepacia* generated by homogenization. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 193:179-185.

Romero-Delgado CC. Estudo da biossíntese de poli-3-hidroxibutirato (P3HB) a partir de óleo de soja. [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2006.

Ryu HW, Hahn SK, Chan YK, Chang HN. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. *Biotechnol Bioengineer*. 1997; 55:28-32.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Lab Press; 1989.

Sánchez R, Schripsema J, Silva LF, Taciro MK, Pradella JGC, Gomez JG. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHAmcl) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. *Eur Polymer J*. 2003; 39:1385-1394, 2003.

Satoh Y, Minamoto N, Tajima K, Munekata M. Polyhydroxyalkanoate synthase from *Bacillus* s INT005 is composed of PhaC and PhaR. *J Biosci Bioengi*. 2002; 94:343-350.

Satori DM. Obtenção de um mutante de *Alcaligenes eutrophus* melhorado geneticamente para a produção do co-polímero polihidroxibutirato-polihidroxivalerato (PHB-PHV) [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1998.

Scandola M, Focarete ML, Frisoni G. Simple kinetic model for the heterogeneous enzymatic hydrolysis of natural poly(3-hydroxybutyrate). *Macromolecules* 1998; 31 (12): 3846 -3851.

Schembri MA, Bayly RC, Davies JK. Cloning and analysis of the polyhydroxyalkanoic acid synthase gene from an *Acinetobacter* sp.: Evidence that the gene is both plasmid and chromosomally located. *FEMS Microbiol Lett*. 1994; 118 (1-2): 145-152.

Schubert P, Steinbüchel A, Schlegel HG. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- β -hidroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1988; 170(12): 5837–5847.

Schulz H, Kunau WH. Beta oxidation of unsaturated fatty acids: a revised pathway. *Trends Biochem Sci*. 1987; 12:403-406.

Schuster I. Soja e Saúde, 2005 Disponível em: http://www.coodetec.com.br/sojasaude/acidos_graxos.htm. Acesso em: 20 jan de 2008

Senior PJ, Dawes EA. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J*. 1971 November; 125(1): 55–66.

Shimamura E, Kasuya K, Kobayashi G, Shiotani Y, Shima Y, Doi Y. Physical properties and biodegradability of microbial poly(hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromol.* 1984; 27:878-80.

Shishatskaya E, Goreva A, Voinova O, Volovaa T. Resorbable polyhydroxyalkanoates as a carrier of antitumor drugs. *J Biotechnol.* 2007; 131:50.

Silva LF, Gomez JGC, Oliveira MS, Alterthum F. Freeze-drying of industrial yeast strains: influence of growth conditions, cooling rates and suspending media on the viability of the recovered cells. *Rev Microbiol.* 1992; 23: 117-122.

Silva LF, Gomez JGC, Oliveira MS, Torres BB. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp. *J Biotechnol.* 2000; 7:165-174.

Silva LF, Gomez JGC, Rocha RCS, Taciro MK, Pradella JGC. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Quím Nova.* 2007; 30:1732-1743.

Silva LF, taciro MK, Pradella, JGC, et al. Fábrica viva de plástico biodegradável. *Ciência Hoje.* 2001; 29(174):69-71.

Silva LF, Taciro MK, Ramos MEM, Carter JM, Pradella JGC, Gomez JGC. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugar cane bagasse hydrolysate. *J Microbiol Biotechnol.* 2004; 31:245-254.

Silva LF, Taciro, MK, Rodrigues MFA, Pradella JGC, Gómez JGC. Produção de plásticos biodegradáveis por via biotecnológica, a partir de matérias-primas renováveis. *Gerenciamento Ambiental.* 2003; 23:49-53.

Silva LF. Estudo do catabolismo de propionato em *Burkholderia* sp visando o aumento da eficiência na produção de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato P(3HB-co-3HV): um plástico biodegradável [Tese] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1998.

Silva LF, Gomez JGC, Taciro MK, Ramos MEM, Carter JM, Pradella JGC. *Br PI* 0207356-0, 2002.

Simon R, Priefer U, Pühler A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio Technology.* 1983; 1:784–791.

Slater S, Houmiel KL, Tran M, Mitsky TA, Taylor NB, Padgett SR, Gruys KJ. Multiple β -ketothiolases mediate poly(β -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. *J Bacteriol.* 1998; 180:1979-1987.

Solaiman DKY, Ashby RD, Foglia TA. Production of polyhydroxyalkanoates from intact triacylglycerols by genetically engineered *Pseudomonas*. Appl Microbiol Biotechnol. 2001; 56:664-669.

Solaiman DKY, Ashby RD. Rapid genetic characterization of poly(hydroxyalkanoate) synthase and its applications. Biomacromolecules. 2005; 6:532-537.

Squiao, C R, Aragão, G M F. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bactérias. Quim. Nova. 2004; 27(4): 615-622.

Steinbüchel A, Hustede E, Liebergesell M, Pieper U, Timm A, Valentin HE. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. FEMS Microbiol Rev. 1992; 103:217-230.

Steinbüchel A, Lütke-Eversloh T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. Biochemical Engineering J. 2003; 16(2): 81-96.

Steinbüchel A. PHB and other Polyhydroxyalkanoic acids. In: Rehm HJ, Reed G, Roehr M, editors. Products of primary metabolism. 2 ed. Nova York: Willey: John e Sons; 1996. p.405-464.

Steinbüchel A. Polyhydroxyalkanoic acids In: Byrom D, editors. Biomaterials Novel materials from biological sources. Macmillan Publishers, Basingstoke; 1991. p.123-213.

Steinbüchel A. Recent advances in the knowledge of the metabolism of bacterial polyhydroxyalkanoic acids and potential impacts on the production of biodegradable thermoplastics. Acta Biotechnol. 1991; 5: 419-427.

Steinbüchel, A, Valentin, H E Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids FEMS Microbiol Lett, 1995; 128:219-228.

Stephanopoulos G, Nielsen JB, Aristodou A. Metabolic Engineering: Principles and methodologies. San Diego: Academic Press, 1998. p.725.

Stoffel W, Caesar H. Metabolism of unsaturated fatty acids. V. On the beta-oxidation of mono- and polyene-fatty acids. Mechanism of enzymatic reactions of delta-2-cis-enoyl-CoA compounds. Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1965; 341(1):76-83.

Sudesh K, Abe HE, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Prog Polym Sci. 2000; 25:1503-55.

Suriyamongkolaa P, Weselakeb R, Narineb S, Moloneyc M, Shaha S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants – A review. *Biotechnol Adv.* 2007; 25(2):148-175.

Suzuki T, Yamane T, Shimizu S. Kinetics and effect of nitrogen source feeding on production of poly- β -Hydroxybutyric Acid by fed-batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1986; 24:366-369.

Taguchi S, Maehara A, Takase K, Nakahara M, Nakamura H, Doi Y. Analysis of mutational effects of polyhydroxybutyrate (PHB) polymerase on bacterial PHB accumulation using an *in vivo* assay system. *FEMS Microbiol Lett.* 2001; 198:65-71.

Taguchi S, Maehara A, Takase K, Nakahara M, Nakamura H, Doi Y. Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) from renewable carbon sources in recombinant *Ralstonia eutropha* using mutants of original PHA synthase. *Biochem Engineer J.* 2003; 16:107-113.

Takada Y, Shinkai F, Kondo S, Yamamoto S, Tsuboi H, Korenaga R, Ando J. Fluid shear stress increases the expression of thrombomodulin by cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Dec 15; 205(2):1345-52.

Tavares LZ, Silva ES, Pradella JGC. Production of poly(3-hydroxybutyrate) in airlift bioreactor by *Ralstonia eutropha*. *Biochem Engineering J.* 2004; 18:49-53.

Tavares LZ. Produção de polihidroxialcanoatos em biorreator tipo airlift [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2000.

Thijsse GJ. Fatty-acid accumulation by acrylate inhibition of beta-oxidation in alkane-oxidizing *Pseudomonas*. *Biochim Biophys Acta.* 1964 Apr 20; 84:195-7.

Timm A, Steinbüchel A. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur J Biochem.* 1992 Oct 1;209(1):15-30.

Timm A, Steinbüchel A. Formation of polyester consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol.* 1990; 56: 3360-3367.

Tobin KM, O'Connor KE. Polyhydroxyalkanoate accumulating diversity of *Pseudomonas* species utilising aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Dec 1; 253(1):111-8.

Tokiwa Y, Calabia B. Degradation of microbial polyesters. *Biotechnol Lett.* 2004; 26:1181-1189.

Tsuge T, Saiot Y, Kikkawa Y, Hiraish T, Doi Y. Biosynthesis and compositional regulation of poly[(3-hydroxybutirate)-co-(3-hydroxyvalerate)] in recombinant *Ralstonia eutropha* expressing polyhydroxyalkanoates synthase genes. *Macromol Biosci.* 2004; 4:238-242.

Tsuge T. Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. *J Biosci Bioengi.* 2002; 94:579-584.

Valappil S, Peiris D, Langley GJ, Herniman JM, Boccaccini AR, Bucke C, Roy I. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* sp. *J Biotechnol.* 2007; 127:475-487.

Valentin HE, Berger PA, Gruys KJ, Rodrigues MFA, Steinbüchel A, Tran M, Asrar J. Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxy-4-pentenoic acid). *Macromolecules.* 1999; 32(22):7389 -7395.

Valentin HE, Dennis D. Metabolic pathway for the poly(3-hydroxybutirate-co-3-hydroxyvalerate) formation in *Nocardia coralina*: inactivation of a *mutB* by chromosomal integration of kanamycin resistance gene. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62:371-379.

Valentin HE, Steinbüchel A. Cloning and characterization of the *Methylobacterium extorquens* polyhydroxyalkanoic-acid-synthase structural gene. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1993; 39:309-317.

Vandamme P, Coenye T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54:2285-2289.

Vanechoutte M, Kämpfer P, De Baere, T, Falsen E, Verschraegen G. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] syzygii. *Int J System Evol Microbiol.* 2004; 54:317-327.

Vanzin C, Gomez JGC, Pradella JGC. Biossíntese do copolímero poli-3-hidroxibutirato e poli-3-hidroxialcanoatos de cadeia média (P3HB/3HAMcl) a partir de óleo de soja. In: X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental; Goiânia; 2006b; Anais do Congresso.

Vanzin C, Gomez JGC, Pradella JGC. Seleção de linhagens produtoras de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxialcanoatos de cadeia média (P3HB/3HAMcl) cultivadas em óleo de soja e ácidos graxos livres. In: X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental; Goiânia; 2006a; Anais do Congresso.

Wang H, Lee S. Poly(3-hydroxybutirate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63:3703-3706.

White D. The physiology and biochemistry of prokaryotes, 2nd ed, Oxford: University Press; 2000. 565p.

Williams SF, Martins D. Applications of PHAs in medicine and pharmacy In: Doi Y, Steinbüchel A, editors. Biopolymers. Weinheim: Wiley-VCH; 2002.

Witholt B, Kessler B. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. Curr Opin Biotechnol. 1999; 10:279-285.

Wong HH, Lee SY. Poly (3-hydroxybutyrate) production from whey by high density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol. 1998; 50:507-514.

Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. No: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb No, *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb No and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb No. Microbiol Immunol. 1995; 39(11):897-904.

Yamane T, Fulkunaga M, Lee YW. Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producers. Biotechnol Bioeng. 1996; 50:197-202.

Zheng Z, Li M, Xue XJ, Tian HL, Li Z, Chen GQ. Mutation on N-terminus of polyhydroxybutyrate synthase of *Ralstonia eutropha* enhanced PHB accumulation. Appl Microbiol Biotechnol. 2006; 72(5):896-905.

ANEXOS

Tabela 18(1) e 19(1) – Médias dos resultados obtidos em agitador rotativo referente ao *Cupriavidus necator* DSM545 IPT-026 em meio mineral contendo 2 g/L de ácido capróico adicionado ou não de ácido acrílico.

Substrato 2g/L	Acrilato mM	Tempo h	MSC g/L	PHA						
				3HB		3HV		3HHx		% PHA
				%	mol%	%	mol%	%	mol%	
C6	0	0	0,13	2,40	100,0					2,40
C6	0	12	0,14	4,06	100,0					4,06
C6	0	24	0,92	39,01	99,8			0,04	0,24	25,30
C6	0	36	1,61	42,66	99,6			0,25	0,44	34,40
C6	0	48	1,79	32,30	99,6			0,17	0,41	32,48
C6	0	72	1,66	37,56	99,7	0,36	0,80	0,27	0,35	38,19
C6	0	96	1,75	61,21	99,7			0,09	0,31	61,30
C6	2,5	0	0,11	1,97	100,0					1,97
C6	2,5	12	0,15	3,31	100,0					3,31
C6	2,5	24	0,31	7,86	100,0					7,86
C6	2,5	36	0,39	11,52	91,2			1,47	8,78	12,99
C6	2,5	48	0,44	11,28	87,2			2,19	12,78	13,47
C6	2,5	72	1,33	30,20	92,6	0,56	0,69	1,22	13,69	31,71
C6	2,5	96	1,19	34,58	85,8			1,20	14,19	35,77

C6 - ácido capróico; MSC – massa celular seca, PHA – polihidroxiálcanoatos, 3HB – 3-hidroxibutirato, 3HV - 3-hidroxivalerato, 3HHx - 3-hidroxihexanoato, %PHA - porcentagem total de polihidroxiálcanoatos.

Tabela 22(1) e 23(1) – Médias dos resultados obtidos em agitador rotativo referente ao cultivo de *Cupriavidus necator* DSM545 IPT-026 em meio mineral contendo 2 g/L de óleo de soja adicionado ou não de ácido acrílico.

Substrato	Acrilato	Tempo	MSC	PHA						
				3HB		3HV		3HHx		% PHA
2g/L	mM	h	g/L	%	mol%	%	mol%	%	mol%	
OS	0	0	1,11	20,85	100,0	-	-	-	-	20,85
OS	0	12	1,42	30,15	100,0	-	-	-	-	30,15
OS	0	24	1,89	50,68	100,0	-	-	-	-	50,68
OS	0	36	2,54	53,22	100,0	-	-	-	-	59,5
OS	0	48	2,58	63,96	100,0	-	-	-	-	63,96
OS	0	72	2,69	66,50	100,0	-	-	-	-	66,5
OS	0	96	5,29	77,77	99,64	0,33	0,36	-	-	78,10
OS	2,5	0	0,10	0,92	100,00	-	-	-	-	0,92
OS	2,5	12	0,80	18,14	100,00	-	-	-	-	18,14
OS	2,5	24	2,30	43,68	100,00	-	-	-	-	43,68
OS	2,5	36	3,03	54,96	99,50	0,32	0,50	-	-	55,27
OS	2,5	48	3,12	57,85	99,51	0,33	0,49	-	-	58,18
OS	2,5	72	4,90	59,27	99,32	0,28	0,41	0,21	0,27	59,76
OS	2,5	96	5,58	84,10	99,78	-	-	0,25	0,22	84,35

OS – óleo de soja; MSC – massa celular seca, PHA – polihidroxialcanoatos, 3HB – 3-hidroxibutirato, 3HV - 3-hidroxivalerato, 3HHx - 3-hidroxihexanoato, %PHA - porcentagem total de polihidroxialcanoatos.

Tabela 20(1) e 21(1) – Médias dos resultados obtidos em agitador rotativo referente ao cultivo de *Burkholderia cepacia* IPT-048 em meio mineral contendo 2 g/L de ácido capróico adicionado ou não de ácido acrílico.

Substrato	Acrilato	Tempo	MSC	PHA						
				3HB		3HV		3HHx		% PHA
2g/L	mM	h	g/L	%	mol%	%	mol%	%	mol%	
C6	0	0	0,26	6,97	100,0					6,97
C6	0	12	0,25	5,54	100,0					5,54
C6	0	24	0,85	25,6	100,0					25,6
C6	0	36	1,66	39,13	100,0					39,13
C6	0	48	2,22	47,4	100,0					47,4
C6	0	72	1,59	54,31	100,0					54,31
C6	0	96	1,33	64,35	100,0					64,35
C6	2,5	0	0,19	3,30	100,0					3,30
C6	2,5	12	0,26	3,99	100,0					3,99
C6	2,5	24	0,88	24,48	100,0					24,48
C6	2,5	36	1,25	22,78	100,0					22,78
C6	2,5	48	2,62	40,37	100,0					40,37
C6	2,5	72	2,56	49,36	99,27	0,42	0,73			49,78
C6	2,5	96	2,02	48,29	100,0					48,29

C6 - ácido capróico; MSC – massa celular seca, PHA – polihidroxiálcanoatos, 3HB – 3-hidroxi-bútilato, 3HV - 3-hidroxi-valerato, 3HHx - 3-hidroxi-hexanoato, %PHA - porcentagem total de polihidroxiálcanoatos.

Tabela 24(1) e 25(1) – Médias dos resultados obtidos em agitador rotativo referente ao cultivo de *Burkholderia cepacia* IPT-048 em meio mineral contendo 2 g/L de óleo de soja adicionado ou não de ácido acrílico.

Substrato	Acrilato	Tempo	MSC	PHA						
				3HB		3HV		3HHx		% PHA
2g/L	mM	h	g/L	%	mol%	%	mol%	%	mol%	
OS	0	0	0,30	1,66	100,0					1,66
OS	0	12	1,39	28,96	100,0					28,96
OS	0	24	3,03	50,53	100,0					50,53
OS	0	36	3,23	46,25	100,0					46,25
OS	0	48	2,92	47,89	100,0					47,89
OS	0	72	2,91	48,47	100,0					48,47
OS	0	96	1,63	63,34	100,0					63,34
OS	2,5	12	1,30	28,28	100,0					28,28
OS	2,5	24	3,14	49,73	100,0					49,73
OS	2,5	36	3,39	54,02	97,76	1,44	2,24			55,46
OS	2,5	48	3,63	52,91	97,65	1,48	2,35			54,39
OS	2,5	72	3,55	53,53	97,66	1,49	2,34			55,02
OS	2,5	96	3,40	53,13	97,78	1,40	2,22			54,54

OS – óleo de soja; MSC – massa celular seca, PHA – polihidroxialcanoatos, 3HB – 3-hidroxibutirato, 3HV - 3-hidroxivalerato, 3HHx - 3-hidroxihexanoato, %PHA - porcentagem total de polihidroxialcanoatos.

Tabela 30(1) e 31(1) – Média dos resultados da linhagem *Burkholderia cepacia* IPT-048 em meio mineral durante 48 horas a 30 °C/ 300 rpm adicionado de 5 g/L de óleo de soja em biorreator.

Tempo h	Xt		3HB		3HV		3HHx		PHA	(NH ₄) ₂ SO ₄	Xr	
	g/L	Ln	%	mol%	%	mol%	%	mol%	%	g/L	g/L	Ln
0	0,11	-2,2	10,2	51,97	-	-	12,5	48,03	22,71	0,54	0,09	-2,46
2	0,15	-1,9	15,67	65,14	-	-	11,11	34,86	19,78	0,49	0,12	-2,12
4	0,28	-1,3	11,59	77,25	-	-	4,53	30,7	16,11	0,44	0,23	-1,47
6	0,45	-0,8	8,69	82	-	-	4,56	28,34	13,25	0,36	0,39	-0,95
8	1,24	0,22	9,3	84,7	-	-	3,49	22,06	12,79	0,15	1,08	0,08
10	1,45	0,37	24,92	90,19	-	-	3,59	9,81	28,51	0,03	1,03	0,03
12	1,58	0,46	35,96	92,74	-	-	3,73	7,26	39,69	0,01	0,95	-0,05
14	2,03	0,71	37,48	93,31	-	-	3,93	6,69	45,22	0	1,11	0,1
16	2,35	0,85	42,5	94,4	-	-	3,62	5,6	49,57	0	1,19	0,17
18	2,52	0,92	44,19	94,65	-	-	3,63	5,35	52,15	0	1,21	0,19
20	2,44	0,89	46,52	94,41	-	-	4,04	5,59	55,47	0	1,09	0,08
22	2,2	0,79	45,44	94,8	-	-	3,3	5,2	54,74	0	0,99	-0,01
24	2,2	0,79	50,16	95,67	-	-	3,2	4,33	56,48	0	0,96	-0,04
26	2,15	0,77	50,25	94,84	-	-	3,62	5,16	53,88	0	0,99	-0,01
28	2,56	0,94	49,97	95,2	-	-	3,34	4,8	53,31	0	1,19	0,18
30	2,37	0,86	53,65	95,25	-	-	3,54	4,75	57,2	0	1,01	0,01
32	2,22	0,8	54,79	95,65	-	-	3,3	4,35	58,09	0	0,93	-0,07
34	2,43	0,89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	2,46	0,9	54,95	95,22	0,17	0,23	3,89	4,55	57,07	0	1,05	0,05
38	2,44	0,89	49,35	94,24	0,14	0,24	3,84	5,53	53,33	0	1,14	0,13
46	2,55	0,94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	2,62	0,96	-	-	-	-	-	-	45	0	1,44	0,37

MSC – massa celular seca, PHA – polihidroxialcanoatos, 3HB – 3-hidroxibutirato, 3HV - 3-hidroxivalerato, 3HHx - 3-hidroxihexanoato, %PHA - porcentagem total de polihidroxialcanoatos.

Tabela 34(1) e 35(1) – Média dos resultados da linhagem *Burkholderia cepacia* IPT-048 em meio mineral durante 48 horas a 30 °C/ 300 rpm adicionado de 5 g/L de óleo de soja em biorreator adiconado de ácido acrílico 2,5mM.

Tempo	Xt		3HB		3HV		3HHx		PHA	(NH ₄) ₂ SO ₄	Xr	
h	g/L	Ln	%	mol%	%	mol%	%	mol%	%	mol%	g/L	Ln
0	0,37	-0,99	8,33	100,00					8,33	0,54	0,34	-1,08
2	0,35	-1,05	9,06	99,11			0,15	1,34	9,15	0,44	0,32	-1,15
4	0,38	-0,98	9,12	99,34			0,12	1,39	9,19	0,41	0,34	-1,08
6	0,70	-0,36	8,24	99,03			0,14	1,45	9,70	0,25	0,63	-0,46
8	1,17	0,16	13,56	99,60			0,11	0,60	13,63	0,02	1,01	0,01
10	1,49	0,40	23,90	99,70			0,13	0,45	23,98	0,01	1,14	0,13
12	1,55	0,44	23,71	99,56			0,12	0,66	23,79	0,00	1,18	0,17
14	1,90	0,64	27,00	99,28	0,43	0,97	0,10	0,60	27,21	0,00	1,39	0,33
16	2,10	0,74	27,76	98,22	0,79	1,73	0,14	0,94	28,38	0,00	1,51	0,41
18	2,04	0,71	31,27	98,61	0,87	1,76	0,13	1,56	31,67	0,00	1,40	0,33
20	2,01	0,70	33,43	95,99	1,01	1,86	0,13	1,16	35,92	0,00	1,29	0,25
22	2,01	0,70	33,39	98,10	1,12	2,04	0,15	0,81	34,23	0,00	1,32	0,28
24	2,14	0,76	32,45	98,43	1,09	2,10	0,14	-	33,24	0,00	1,43	0,36
26	3,03	1,11	43,42	97,65	1,14	2,22	0,16	-	44,64	0,00	1,68	0,52
28	3,45	1,24	44,91	97,71	1,16	2,17	0,14	0,69	46,15	0,00	1,86	0,62
30	3,18	1,16	42,69	96,95	1,56	3,05	-	-	44,25	0,00	1,77	0,57
32	3,19	1,16	43,75	97,90	1,12	2,94	0,15	-	44,88	0,00	1,76	0,56
34	3,16	1,15	44,62	97,14	1,53	2,86	-	-	46,15	0,00	1,70	0,53
36	3,47	1,24	38,02	97,16	0,92	2,84	0,15	0,35	-	0,00	-	-
38	3,44	1,24	48,40	97,24	1,60	2,76	-	-	50,00	0,00	1,72	0,54
40	3,38	1,22	47,98	97,24	1,58	2,76	-	-	49,56	0,00	1,70	0,53
44	3,50	1,25	42,26	98,44	1,05	2,80	0,16	0,32	43,12	0,00	1,99	0,69
46	3,43	1,23	37,33	97,18	1,26	2,82	-	-	38,59	0,00	2,11	0,74
48	3,56	1,27	46,12	97,75	1,19	2,77	0,21	0,39	47,41	0,00	1,87	0,63

MSC – massa celular seca, PHA – polihidroxialcanoatos, 3HB – 3-hidroxibutirato, 3HV - 3-hidroxivalerato, 3HHx - 3-hidroxihexanoato%PHA - porcentagem total de polihidroxialcanoatos.

Tabela 38(1) e 39(1) – Média dos polímeros contidos nas células de *Burkholderia cepacia* IPT-048 dos processos iniciado com 5 g/L de óleo de soja e adicionado na 10^a hora de cultivo o ácido acrílico 2,5mM.

Tempo	Xt		3HB		3HV		3HHx		PHA	(NH ₄) ₂ SO ₄	Xr	
h	g/L	Ln	%	mol%	%	mol%	%	mol%	%	g/L	g/L	Ln
0	0,31	-1,17	1,61	100,00	-	-	-	-	1,61	0,38	0,31	-1,19
4	0,33	-1,11	2,32	100,00	-	-	-	-	2,32	0,37	0,32	-1,13
8	0,42	-0,87	2,60	100,00	-	-	-	-	2,60	0,21	0,41	-0,89
12	0,80	-0,22	2,43	100,00	-	-	-	-	2,46	0,00	0,78	-0,25
16	0,90	-0,11	2,38	100,00	-	-	-	-	2,27	0,00	0,88	-0,13
19	0,84	-0,17	1,82	100,00	-	-	-	-	1,81	0,00	0,82	-0,19
24	1,03	0,03	1,23	100,00	-	-	-	-	1,23	0,00	1,02	0,02
28	0,99	-0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	1,08	0,08	0,78	100,00	-	-	-	-	0,78	0,00	1,07	0,07
36	1,16	0,15	1,81	100,00	-	-	-	-	1,37	0,00	1,14	0,13
40	1,20	0,18	1,72	100,00	-	-	-	-	1,61	0,00	1,18	0,17
44	1,14	0,13	4,96	100,00	-	-	-	-	2,80	0,00	1,11	0,10
48	1,23	0,21	3,11	100,00	-	-	-	-	3,05	0,00	1,19	0,18

MSC – massa celular seca, PHA – polihidroxialcanoatos, 3HB – 3-hidroxi butirato, 3HV - 3-hidroxi valerato, 3HHx - 3-hidroxi hexanoato, %PHA - porcentagem total de polihidroxialcanoatos.

Tabela 40(1) e 41(1) - Média de polímeros extraídos com clorofórmio produzidos por *Burkholderia cepacia* IPT-048 dos processos iniciado com 5 g/L de óleo de soja e adicionado na 10^a hora de cultivo o ácido acrílico 2,5 mM.

Tempo h	Xt		3HB		3HV		3HHx		PHA	(NH ₄) ₂ SO ₄	Xr	
	g/L	Ln	%	mol%	%	mol%	%	mol%	%	g/L	g/L	Ln
0	0,31	-1,17	37,68	100,00			-	-	37,68	0,38	0,19	-1,64
4	0,33	-1,11	49,51	100,00			-	-	49,51	0,37	0,17	-1,79
8	0,42	-0,87	48,23	100,00	-	-	-	-	48,12	0,21	0,22	-1,52
12	0,80	-0,22	47,10	100,00	-	-	-	-	47,70	0,00	0,42	-0,87
16	0,90	-0,11	48,79	98,40	0,92	1,60	-	-	49,71	0,00	0,45	-0,79
20	0,84	-0,17	51,27	98,24	1,07	1,76	-	-	52,34	0,00	0,40	-0,92
24	1,03	0,03	45,49	98,08	1,03	1,92	-	-	46,52	0,00	0,55	-0,60
28	0,99	-0,01	48,04	97,90	0,95	2,10	-	-	48,99	0,00	0,51	-0,68
32	1,08	0,08	45,81	97,89	1,15	2,11	-	-	46,96	0,00	0,57	-0,56
36	1,16	0,15	52,62	97,98	1,26	2,02	-	-	51,50	0,00	0,56	-0,58
40	1,20	0,18	46,36	97,86	1,18	2,14	-	-	47,54	0,00	0,63	-0,46
44	1,14	0,13	47,71	97,96	1,16	2,04	-	-	48,86	0,00	0,58	-0,54
48	1,23	0,21	29,43	98,25	0,61	1,75	-	-	40,04	0,00	0,74	-0,30

MSC – massa celular seca, PHA – polihidroxialcanoatos, 3HB – 3-hidroxibutirato, 3HV - 3-hidroxivalerato, 3HHx - 3-hidroxihexanoato, %PHA - porcentagem total de polihidroxialcanoatos.

Tabela 42 (1) e 43 (1) - Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de *Burkholderia cepacia* IPT-048 nos processos iniciados com 5 g/L de óleo de soja e adicionados na 10ª hora de cultivo o 5 g/L de ácido capróico (C6).

Tempo	Xt		3HB		3HV		3HHx		PHA	(NH4)2SO4	Xr	
	g/L	Ln	%	mol%	%	mol%	%	mol%	%	g/L	g/L	Ln
2	-	-	13,67	99,26	-	-	0,14	1,42	13,81	0,55	-	-
4	0,33	-1,11	12,50	99,30	-	-	0,13	1,03	12,62	0,49	0,29	-1,24
6	0,70	-0,36	-	99,23	-	-	0,11	1,08	8,93	0,30	0,64	-0,45
8	1,24	0,22	12,15	99,11	-	-	0,14	1,35	12,29	0,00	1,09	0,08
10	1,78	0,58	24,13	97,46	-	-	0,18	1,54	24,97	0,00	1,34	0,29
12	2,01	0,70	41,94	99,60	-	-	0,17	0,50	26,00	0,00	1,49	0,40
14	2,23	0,80	28,13	99,72	-	-	0,11	0,33	29,50	0,00	1,57	0,45
16	2,32	0,84	32,10	99,75	-	-	0,11	0,28	32,21	0,00	1,57	0,45
18	2,42	0,88	39,40	99,76	-	-	0,13	-	39,53	0,00	1,46	0,38
20	2,06	0,72	43,96	99,74	-	-	0,15	0,27	44,11	0,00	1,15	0,14
22	2,49	0,91	48,50	99,77	-	-	0,14	0,24	44,70	0,00	1,38	0,32
24	2,03	0,71	45,74	99,81	-	-	0,12	0,22	46,00	0,00	1,10	0,09
26	-	-	-	99,73	-	-	-	0,27	-	-	-	-
28	2,57	0,94	48,19	99,69	-	-	0,17	-	48,39	0,00	1,33	0,28
32	2,24	0,81	50,69	99,70	-	-	0,16	0,26	52,40	0,00	1,07	0,06
36	2,84	1,04	63,56	100,00	-	-	0,17	0,25	63,32	0,00	1,04	0,04
44	3,07	1,12	35,17	99,58	-	-	0,18	0,36	65,40	0,00	1,06	0,06
48	3,10	1,13	37,46	99,52	-	-	0,19	0,37	64,70	0,00	1,09	0,09

MSC – massa celular seca, PHA – polihidroxialcanoatos, 3HB – 3-hidroxibutirato, 3HV - 3-hidroxivalerato, 3HHx - 3-hidroxihexanoato, %PHA - porcentagem total de polihidroxialcanoatos.

Tabela 46(1) - Média dos resultados obtidos durante a multiplicação de *Burkholderia cepacia* IPT-048 nos processos iniciados com 5 g/L de óleo de soja e adicionados na 10ª hora de cultivo 5 g/L de ácido capróico (C6) e ácido acrílico 2,5 mM.

Tempo	Xt		3HB		3HV		3HHx		PHA	(NH ₄) ₂ SO ₄	Xr	
h	g/L	Ln	%	mol%	%	mol%	%	mol%	%	g/L	g/L	Ln
2	0,10	-2,30	5,05	100,00	-	-	-	-	5,05	0,47	0,09	-2,35
4	0,19	-1,66	6,07	100,00	-	-	-	-	6,07	0,42	0,18	-1,72
6	0,68	-0,39	8,30	100,00	-	-	-	-	8,30	0,31	0,62	-0,47
8	1,15	0,14	7,21	100,00	-	-	-	-	7,21	0,04	1,07	0,06
10	1,66	0,51	9,70	100,00	-	-	-	-	9,50	0,01	1,50	0,41
12	1,30	0,26	9,70	100,00	-	-	-	-	10,00	0,01	1,17	0,16
14	1,30	0,26	9,92	100,00	-	-	-	-	9,92	0,01	1,17	0,16
16	1,33	0,29	10,15	100,00	-	-	-	-	10,15	0,02	1,20	0,18
18	1,49	0,40	11,40	100,00	-	-	-	-	11,40	0,01	1,32	0,28
20	1,49	0,40	11,40	100,00	-	-	-	-	11,40	0,01	1,32	0,28
22	1,57	0,45	17,70	100,00	-	-	-	-	17,30	0,01	1,30	0,26
24	1,54	0,43	20,15	100,00	-	-	-	-	20,15	0,01	1,23	0,21
26	1,69	0,52	20,15	100,00	-	-	-	-	20,15	0,01	1,35	0,30
28	1,88	0,63	35,84	100,00	-	-	-	-	35,84	0,01	1,21	0,19
32	2,01	0,70	38,51	100,00	-	-	-	-	38,51	0,01	1,24	0,21
36	2,02	0,70	37,93	100,00	-	-	-	-	37,93	0,01	1,25	0,23
44	2,51	0,92	50,19	100,00	-	-	-	-	50,19	0,00	1,25	0,22
46	2,54	0,93	50,23	100,00	-	-	-	-	50,23	0,00	1,26	0,23

MSC – massa celular seca, PHA – polihidroxialcanoatos, 3HB – 3-hidroxi butirato, 3HV - 3-hidroxi valerato, 3HHx - 3-hidroxi hexanoato, %PHA - porcentagem total de polihidroxialcanoatos.

Tabela 53(1) - Consumo de nitrogênio e da concentração de biomassa total (Xt) e biomassa residual (Xr), para os ensaios utilizando as linhagens *C. necator* tipo IPT026 (A) e *C. necator* IPT026::*phaB* (B) em biorreator.

<i>Cupriavidus necator</i> IPT-026				<i>Cupriavidus necator</i> IPT-026:: <i>phaB</i>		
Tempo	Xt	Xr	(NH ₄) ₂ SO ₄	Xt	Xr	(NH ₄) ₂ SO ₄
h	g/L	g/L	mg/L	g/L	g/L	mg/L
0	0,38	0,25	57,91	0,39	0,17	56,98
2	0,33	0,24	31,58	0,47	0,28	38,14
4	0,51	0,40	1,69	0,60	0,34	24,31
6	0,78	0,61	0,23	1,12	0,67	0,75
8	0,98	0,68	0,26	1,22	-	0,51
10	0,96	0,48	0,24	1,36	0,64	0,24
12	1,19	0,74	0,24	1,49	0,86	0,24
14	1,32	0,53	0,24	1,65	0,70	0,24
16	1,57	0,57	0,24	1,79	0,78	0,24
18	-	0,82	0,24	2,27	1,04	0,24
20	1,90	0,94	0,24	-	1,11	0,24
22	1,90	0,92	0,24	2,35	1,07	0,24
24	2,05	0,91	0,24	2,39	1,01	0,24
26	2,11	0,82	0,24	2,09	-	0,24
28	1,97	0,68	0,24	2,34	1,04	0,24
30	2,16	0,72	0,24	2,43	1,07	0,24
32	2,16	0,76	0,24	2,51	0,98	0,24
34				2,78	1,01	0,22
36				2,82	1,01	0,22
44				2,99	0,95	0,22
48				2,99	1,02	0,22

Tabela 54(1), 55(1) e 56(1) - Consumo de óleo vegetal e produção da PHA para os ensaios utilizando as linhagens *C. necator* tipo IPT026 e *C. necator* IPT026::*phaB* em biorreator.

tempo h	<i>Cupriavidus necator</i> IPT-026								<i>Cupriavidus necator</i> IPT-026:: <i>phaB</i>							
	3HB		3HV		3HHx		PHA	OS	3HB		3HV		3HHx		PHA	OS
	%	mol%	%	mol%	%	mol%	%	g/L	%	mol%	%	mol%	%	mol%	%	g/L
0	33,91	99,18	-	-	0,37	0,82	33,90	5,15	56,87	99,47	-	-	0,24	0,53	42,93	5,15
2	28,42	99,36	-	-	0,24	0,64	28,48	4,56	41,28	99,43	-	-	0,23	0,57	34,23	5,14
4	22,11	99,53	-	-	0,14	0,47	21,82	5,12	39,18	99,57	-	-	0,22	0,43	36,36	-
6	22,47	99,53	-	-	0,14	0,47	22,11	-	-	99,53	-	-	0,19	0,47	28,94	5,04
8	31,76	99,69	-	-	0,13	0,31	30,16	4,55	34,74	99,55	-	-	0,21	0,45	41,25	-
10	51,41	99,76	-	-	0,16	0,24	49,74	4,69	50,55	99,73	-	-	0,18	0,27	50,02	4,52
12	-	99,72	-	-	0,15	0,28	-	4,20	-	99,75	-	-	-	0,25	48,99	4,05
14	61,18	99,82	-	-	0,14	0,18	59,79	-	60,76	99,76	-	-	0,19	0,24	63,58	3,71
16	65,64	99,78	-	-	-	0,22	63,86	3,23	58,03	99,77	-	-	0,17	0,23	62,10	2,82
18	-	99,73	-	-	0,15	0,27	-	-	56,36	99,77	-	-	0,17	0,23	60,91	-
20	50,73	99,75	-	-	0,17	0,25	-	-	56,35	99,73	-	-	0,20	0,27	58,67	1,76
22	51,71	99,76	-	-	0,17	0,24	-	-	-	99,75	-	-	-	0,25	-	-
24	57,24	99,80	-	-	0,15	0,20	55,73	-	59,73	99,77	-	-	0,18	0,23	62,47	-
26	-	99,80	-	-	0,15	0,20	-	-	-	99,79	-	-	0,18	0,21	71,84	-
28	65,40	99,80	-	-	0,17	0,20	65,16	2,48	55,96	99,77	-	-	0,17	0,23	63,25	1,60
30	-	99,79	-	-	0,16	0,21	55,71	1,67	56,20	99,77	-	-	0,17	0,23	62,94	1,34
32	66,14	99,84	-	-	0,14	0,16	64,84	1,67	60,43	99,79	-	-	0,17	0,21	66,44	1,48
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,77	-	-	0,17	0,23	67,65	0,96
36	-	-	-	-	-	-	-	-	65,04	99,80	-	-	0,17	0,20	74,32	0,92
44	-	-	-	-	-	-	-	-	69,81	99,79	-	-	0,19	0,21	76,73	0,96
48	-	-	-	-	-	-	-	-	68,04	99,79	-	-	0,19	0,21	75,77	1,24

PHA – polihidroxialcanoatos, 3HB – 3-hidroxibutirato, 3HV - 3-hidroxivalerato, 3HHx - 3-hidroxihexanoato; %PHA - porcentagem total de polihidroxialcanoatos.

Tabela 58 A (1) - Análise comparativa da multiplicação das linhagens *Cupriavidus necator* e *Cupriavidus necator::phaB* durante o período de incubação de 48 horas a 30 °C/ 200 rpm em ácido caprílico 5g/L.

	Substrato	Inibidor	Tempo	Xt			HB			HV			HHx		PHA	Xr	
			h	g/L	Ln		mol%	%		mol%	%		mol%	%		g/L	Ln
<i>Cupriavidus necator</i> IPT-026	Ácido caprílico 5g/L	não adicionado	4	0,23	-1,47		-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,23	-1,47
			8	0,13	-2,04		-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,13	-2,04
			12	0,10	-2,32		-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,10	-2,32
			16	0,12	-2,12		-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,12	-2,12
			24	0,19	-1,66		-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,19	-1,66
			28	0,18	-1,71		-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,18	-1,71
			32	0,16	-1,83		-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,16	-1,83
			36	0,17	-1,78		-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,17	-1,78
			40	0,17	-1,77		-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,17	-1,77
			48	0,19	-1,66	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,19	-1,66
<i>Cupriavidus necator</i> IPT-026::phaB	Ácido caprílico 5g/L	não adicionado	4	0,16	-1,83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,16	-1,83
			8	0,20	-1,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,20	-1,61
			12	0,22	-1,51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,22	-1,51
			16	0,24	-1,43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,24	-1,43
			24	0,18	-1,71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,18	-1,71
			28	0,16	-1,83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,16	-1,83
			32	0,15	-1,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,15	-1,90
			36	0,15	-1,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,15	-1,90
			40	0,15	-1,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,15	-1,90
			48	0,17	-1,77	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,17	-1,77

PHA – polihidroxiálcanoatos, 3HB – 3-hidroxibutirato, 3HV - 3-hidroxivalerato, 3HHx - 3-hidroxihexanoato; %PHA - porcentagem total de polihidroxiálcanoatos.

Tabela 59 (1) - Análise comparativa da multiplicação das linhagens *Cupriavidus necator* e *Cupriavidus necator::phaB* durante o período de incubação de 48 horas a 30 °C/ 200 rpm em ácido caprílico 5g/L e ácido acrílico 2,5mM.

	Substrato	Inibidor	Tempo h	Xt			HB mol%	%	HV mol%	%	HHx mol%	PHA %	Xr	
				g/L	Ln	%							g/L	Ln
<i>Cupriavidus necator</i> IPT-026	Ácido caprílico 5g/L	Ácido acrílico 2,5mM	4	0,25	-1,39	-	-	-	-	-	-	0,00	0,25	-1,39
			8	0,20	-1,61	-	-	-	-	-	-	0,00	0,20	-1,61
			12	0,09	-2,41	-	-	-	-	-	-	0,00	0,09	-2,41
			16	0,21	-1,56	-	-	-	-	-	-	0,00	0,21	-1,56
			24	0,15	-1,90	-	-	-	-	-	-	0,00	0,15	-1,90
			28	0,15	-1,90	-	-	-	-	-	-	0,00	0,15	-1,90
			32	0,16	-1,83	-	-	-	-	-	-	0,00	0,16	-1,83
			36	0,17	-1,77	-	-	-	-	-	-	0,00	0,17	-1,77
			40	0,13	-2,04	-	-	-	-	-	-	0,00	0,13	-2,04
			48	0,02	-3,91	-	-	-	-	-	-	0,00	0,02	-3,91
<i>Cupriavidus necator</i> IPT-026:: <i>phaB</i>	Ácido caprílico 5g/L	Ácido acrílico 2,5mM	4	0,25	-1,39	-	-	-	-	-	-	0,00	0,25	-1,39
			8	0,11	-2,21	-	-	-	-	-	-	0,00	0,11	-2,21
			12	0,02	-3,91	-	-	-	-	-	-	0,00	0,02	-3,91
			16	0,12	-2,12	-	-	-	-	-	-	0,00	0,12	-2,12
			24	0,13	-2,04	-	-	-	-	-	-	0,00	0,13	-2,04
			28	0,19	-1,66	-	-	-	-	-	-	0,00	0,19	-1,66
			32	0,16	-1,83	-	-	-	-	-	-	0,00	0,16	-1,83
			36	0,15	-1,90	-	-	-	-	-	-	0,00	0,15	-1,90
			40	0,14	-1,97	-	-	-	-	-	-	0,00	0,14	-1,97
			48	0,13	-2,04	-	-	-	-	-	-	0,00	0,13	-2,04

PHA – polihidroxiálcanoatos, 3HB – 3-hidroxibutirato, 3HV - 3-hidroxivalerato, 3HHx - 3-hidroxihexanoato; %PHA - porcentagem total de polihidroxiálcanoatos.

Tabela 60A (1) - Análise comparativa das linhagens *Cupriavidus necator* IPT-026 controle e *Cupriavidus necator::phaB* durante o período de incubação de 48 horas a 30 °C/ 200 rpm em óleo de soja 5g/L.

	Substrato	Inibidor	Tempo	Xt		HB			HV		HHx	PHA	Xr	
			h	g/L	Ln	%	mol%	%	mol%	%	mol%	%	g/L	Ln
<i>Cupriavidus necator</i> IPT-026	Óleo de soja 5g/L	não adicionado	4	0,64	-0,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			8	0,34	-1,08	2,59	100,00	-	-	-	-	2,59	0,33	-1,11
			12	1,25	0,22	12,26	100,00	-	-	-	-	12,26	1,10	0,09
			16	1,53	0,43	19,16	100,00	-	-	-	-	19,16	1,24	0,21
			24	1,90	0,64	22,04	100,00	-	-	-	-	22,04	1,48	0,39
			28	2,02	0,70	22,95	100,00	-	-	-	-	22,95	1,56	0,44
			32	1,77	0,57	20,62	100,00	-	-	-	-	20,62	1,41	0,34
			36	1,69	0,52	21,25	100,00	-	-	-	-	21,25	1,33	0,29
			40	1,78	0,58	21,28	100,00	-	-	-	-	21,28	1,40	0,34
			48	1,80	0,59	21,20	100,00	-	-	-	-	21,20	1,42	0,35
<i>Cupriavidus necator</i> IPT-026::phaB	Óleo de soja 5g/L	não adicionado	4	0,23	-1,47	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			8	0,26	-1,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			12	0,48	-0,73	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			16	1,21	0,19	10,83	100,00	-	-	-	-	10,83	1,08	0,08
			24	1,77	0,57	25,90	100,00	-	-	-	-	25,90	1,31	0,27
			28	1,96	0,67	18,75	100,00	-	-	-	-	18,75	1,59	0,47
			32	1,77	0,57	20,30	100,00	-	-	-	-	20,30	1,41	0,34
			36	1,74	0,55	19,34	100,00	-	-	-	-	19,34	1,40	0,34
			40	1,72	0,54	19,76	100,00	-	-	-	-	19,76	1,38	0,32
			48	1,78	0,58	18,69	100,00	-	-	-	-	18,69	1,45	0,37

PHA – polihidroxialcanoatos, 3HB – 3-hidroxibutirato, 3HV - 3-hidroxivalerato, 3HHx - 3-hidroxihexanoato; %PHA - porcentagem total de polihidroxialcanoatos.

Tabela 61A (1) - Análise comparativa das linhagens *Cupriavidus necator* IPT-026 controle e *Cupriavidus necator::phaB* durante o período de incubação de 48 horas a 30 °C/ 200 rpm em óleo de soja 5g/L adicionado de ácido acrílico 2,5mM.

	Substrato	Inibidor	Tempo h	Xt		HB			HV		HHx		PHA	Xr	
				g/L	Ln	%	mol%	%	mol%	%	mol%	%	%	g/L	Ln
<i>Cupriavidus necator</i> IPT-026	Óleo de soja 5g/L	Ácido acrílico 2,5 mM	4	0,34	-1,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			8	0,72	-0,33	6,91	100,00	-	-	-	-	-	6,91	0,67	-0,40
			12	1,02	0,02	12,83	100,00	-	-	-	-	-	12,64	0,89	-0,12
			16	1,26	0,23	13,14	100,00	-	-	-	-	-	13,01	1,10	0,09
			24	1,96	0,67	9,24	100,00	-	-	-	-	-	20,70	1,55	0,44
			28	2,29	0,83	24,38	100,00	-	-	-	-	-	24,29	1,73	0,55
			32	2,33	0,85	23,99	100,00	-	-	-	-	-	23,91	1,77	0,57
			36	2,47	0,90	25,96	100,00	-	-	-	-	-	25,96	1,83	0,60
			40	2,47	0,90	25,38	100,00	-	-	-	-	-	25,38	1,84	0,61
			48	2,68	0,99	26,99	100,00	-	-	-	-	-	26,86	1,96	0,67
<i>Cupriavidus necator</i> IPT-026:: <i>phaB</i>	Óleo de soja 5g/L	Ácido acrílico 2,5 mM	4	0,27	-1,31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			8	0,37	-0,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			12	0,47	-0,76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			16	0,35	-1,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			24	0,46	-0,78	0,48	-	-	-	-	-	-	0,48	0,46	-0,78
			28	0,65	-0,43	3,79	-	-	-	-	-	-	3,79	0,63	-0,47
			32	1,12	0,11	8,63	98,90	-	-	0,13	1,10	-	8,62	1,02	0,02
			36	1,49	0,40	13,85	99,47	-	-	0,10	0,53	-	13,83	1,28	0,25
			40	1,60	0,47	13,60	99,45	-	-	0,10	0,55	-	13,59	1,38	0,32
			48	1,47	0,39	13,57	99,54	-	-	0,08	0,46	-	13,54	1,27	0,24

PHA – polihidroxialcanoatos, 3HB – 3-hidroxibutirato, 3HV - 3-hidroxivalerato, 3HHx - 3-hidroxihexanoato; %PHA - porcentagem total de polihidroxialcanoatos.