BERNARDO FERREIRA CAMILO

**Seleção de isolados bacterianos para produção
de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de
melaço de soja**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciência.

São Paulo

BERNARDO FERREIRA CAMILO

**Seleção de isolados bacterianos para produção
de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de
melaço de soja**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciência.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2016

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

reprodução não autorizada pelo autor

Camilo, Bernardo Ferreira.

Seleção de isolados bacterianos para a produção de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de melaço de soja / Bernardo Ferreira Camilo. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biopolímeros.

Versão do título para o inglês: Selection of bacterial isolates to produce polyhydroxyalkanoates (PHA) from soybean molasses.

1. Biopolímeros 2. Melaço de soja 3. Polihidroxialcanoato 4. Burkholderia 5. Isolados bacterianos 6. Biorefinarias I. Gomez, Prof. Dr. José Gregório Cabrera II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB031/2016

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

Candidato(a): Bernardo Ferreira Camilo.

Título da Dissertação: Seleção de isolados bacterianos para a produção de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de melaço de soja.

Orientador(a): Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez.

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **804/2016** referente ao projeto intitulado: ***"Seleção de isolados bacterianos para produção de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de melão de soja"*** sob a responsabilidade de ***Bernardo Ferreira Camilo*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***José Gregório Cabrera Gomez***, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 18 de março de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo M. A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

Aos amigos e familiares por
todo o apoio e companhia.

Agradecimentos

Agradeço principalmente à minha família por toda a ajuda nos mais diferentes aspectos.

Ao professor doutor José Gregório Cabrera Gomez pelo apoio, orientação e aconselhamento durante todo o processo de realização deste trabalho.

À professora doutora Luiziana Ferreira da Silva

Ao grupo dos laboratórios 148 e 172 incluindo alunos de graduação, pós-graduação e técnicos pela convivência dia a dia e pelas eventuais ajudas e colaborações.

Ao meu colega de laboratório Lucas Cespedes que sempre me ajudou quando precisei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro que me possibilitou realizar este trabalho.

Resumo

Camilo BF. Seleção de isolados bacterianos para produção de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de melaço de soja. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

O melaço de soja é um subproduto do processamento da soja para a produção de proteína, este resíduo contém quantidades elevadas de carboidratos como: sacarose, rafinose, glicose, frutose, galactose e estaquiose. Polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres acumulados como material de reserva por diversas bactérias. Estes polímeros apresentam propriedades termoplásticas podendo ser utilizados em diferentes aplicações. Neste trabalho, foi avaliado o potencial do uso do melaço de soja como fonte de carbono em cultivos para a produção de PHA. Quatorze isolados bacterianos foram cultivados sob condições propícias ao acúmulo de PHA utilizando melaço de soja integro ou hidrolisado como única fonte de carbono. Destas, três foram isoladas de lodo de esgoto, seis foram isoladas do solo de mata atlântica e cinco foram isoladas do próprio melaço de soja, além disso, duas linhagens de referência, *Burkholderia sacchari* e *Pseudomonas sp.* LFM046, também foram utilizadas. As linhagens de referência foram isoladas de solo de canavial. Ao hidrolisar o melaço de soja foram disponibilizados mais mono e dissacarídeos pela quebra de tetra e dissacarídeos. Todas as dezesseis linhagens bacterianas foram capazes de crescer em meio contendo melaço de soja íntegro ou hidrolisado como única fonte de carbono. Alguns dos isolados produziram quantidades expressivas de PHA tanto com o melaço integro como com o hidrolisado. Com o melaço integro obtivemos cinco linhagens com produção expressiva de PHA, dentre estas, as quatro maiores produtoras acumularam poli-3-hidroxibutirato (P3HB) correspondendo a aproximadamente 20-25% da massa seca celular total. Com o melaço de soja hidrolisado, foram detectadas oito linhagens com produção expressiva de P3HB, dentre estas, três se destacaram acumulando P3HB correspondendo a 30-35% da massa seca celular total. As linhagens com maior rendimento na produção de P3HB tiveram seu 16S rRNA seqüenciado e foram identificadas como sendo do gênero *Burkholderia*, que apresenta espécies conhecidas capazes de produzir PHA. Cultivo em biorreator com o isolado SCU 31 revelou que sacarose, glicose e frutose foram eficientemente utilizadas para produção de P3HB. Rafinose não foi utilizada pelo isolado, mas estaquiose foi parcialmente hidrolisada. Nesse cultivo, atingiu-se velocidades específicas de crescimento e produção de P3HB de $0,30\text{ h}^{-1}$ e $0,04\text{ h}^{-1}$, respectivamente, compatíveis com o desenvolvimento de processos de produção de PHA a partir de resíduos.

Palavras-chave: biopolímeros. Polihidroxialcanoatos. melaço de soja. *Burkholderia*. biorefinarias.

Abstract

Camilo BF. Selection of bacterial isolates to produce polyhydroxyalkanoates(PHA) from soybean molasses. [Master thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

The soybean molasses is a subproduct of the processing method for the production of soybean protein, this residue contains high amounts of carbohydrates such as: sucrose , raffinose , glucose , fructose , galactose and stachyose . Polihydroxialkanoates (PHA) are polyesters accumulated by bacteria that are used as reserve material by various bacteria. This polymer presents thermoplastic properties and can be utilized in different application. In this work It is been evaluated the potential use of soybean molasses as a carbon source in cultures for production of PHA. Sixteen bacterial strains were grown in utilizing raw or hydrolyzated soybean molasses as the sole carbon source. Among this, three were isolated from sewage sludge, six were isolated from atlantic forest soil and five were isolated from the molasses itself, besides that, two reference strains, *Burkholderia sacharie* and *pseudomonas* sp. LFM046 were also utilized. The reference strains were isolated from cane fild soil. The hydrolyzes of the soybean molasses was able to provide more mono and disaccharides by breaking larger sugars. All of the sixteen bacteria were able to grow in a medium containing raw or hydrolyzed soybean molasses as the sole carbon source. Some of the isolated bacteria produced expressive quantities of PHA both with raw and hydrolyzed soybean molasses. With raw soybean molasses it was obtained five strains with the expressive production of PHA, among theses strains the four biggest producers accumulate poli-3-hydroxybutirate(P3HB) corresponding in approximately 20-25% of the total dry cellular dry weight. With de hydrolyzed soybean molasses were detected eight strains with a expressive production of P3HB, among these three stood out producing from 30-35% of P3HB from the total dry cellular weight. The strains with the biggest yield in the production of PHA had they 16S rRNA sequenced and were identified as been from *Burkholderia* genre that presents other species capable of producing PHA. Bioreactor cultivation with the isolated 31 SCU revealed that sucrose , glucose and fructose have been used efficiently for the production of P3HB . Raffinose was not used by the strain , but stachyose was partially hydrolysed . In this cultivation was reached Specific growth rates and production of P3HB of 0.30 h⁻¹ and 0.04 h⁻¹, respectively, consistent with the development of PHA production processes from waste and residues.

Keywords: biopolymers. polihydroxyalkanoates. *Burkholderia*. soybean molasses. biorefinery.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Concentração dos açúcares no melaço após fermentação alcoólica (Jocélia da Silva, fonte pessoal).....	19
Tabela 3 – Potencial técnico de substituição (em percentual) de diferentes polímeros de origem petroquímica por polímeros biodegradáveis.....	23
Tabela 4 – Quantidade de diferentes polímeros de origem petroquímica consumidos mundialmente em 2007 e as respectivas quantidades que poderiam ser substituídas por polihidroxialcanoatos.....	23
Tabela 5 – Componentes do meio Luria-Bertani (LB)	33
Tabela 6 – Componentes do Meio Mineral.....	33
Tabela 7 – Componentes da solução de elementos traços presente no Meio Mineral	33
Tabela 8 – Composição do meio mínimo utilizado no ensaio de produção de PHA em Biorreator.....	34
Tabela 9 – Massas molares dos diferentes sacarídeos quantificados	38
Tabela 10 – Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR.....	39
Tabela 11 – Temperaturas usadas na reação de PCR.....	39
Tabela 12 – Oligonucleotídeos utilizados nas reações de sequenciamento	39
Tabela 13 – Produção de PHA a partir de melaço de soja íntegro. Média, duplicatas biológicas e analíticas.	42
Tabela 14 – Produção de PHA a partir de melaço de soja hidrolisado. Média, duplicatas biológicas e analíticas	48
Tabela 15 – Maiores identidades encontradas na base de dados GenBank com relação ao 16S rRNA dos isolados SCU 31, SCU 63, SCU 66, SCU 74.....	60
Tabela 16 – Linhagens de <i>Burkholderia</i> selecionadas para a construção da árvore filogenética. <i>Rastonia eutropha</i> utilizada para enraizar a árvore.....	61
Tabela 17 – Antibiógrama do isolado SCU 31.....	66

Lista de Figuras

Figura 1 – Principais açúcares do melaço de soja	20
Figura 2 – Biossíntese de PHA no contexto do metabolismo microbiano.....	25
Figura 3 – Perfil de carboidratos de melaço de soja submetido a hidrólise ácida (Área dos açúcares)	44
Figura 4 – Perfil de carboidratos do melaço de soja submetido a zero e 60 minutos de hidrólise ácida.	46
Figura 5 – Perfil de carboidratos do melaço de soja submetido a 180 minutos de hidrólise ácida.	47
Figura 6 – Perfil de carboidratos detectado no sobrenadante das culturas realizadas utilizando melaço de soja íntegro como fonte de carbono após 72 horas de cultivo .	52
Figura 7 – Perfil de carboidrato detectado no sobrenadante de cultivos utilizando melaço de soja hidrolisado com fonte de carbono após 72 horas de cultivo	55
Figura 8 – Perfil de carboidratos observado após diferentes tempos de hidrólise ácida.....	56
Figura 9 – Perfil de carboidratos observados após diferentes tempos de hidrólise do melaço soja	59
Figura 10 – Árvore filogenética do 16S rRNA dos isolados SCU 031, SCU 063, SCU 066 e SCU 074.....	62
Figura 11 – Halos de ausência de crescimento da linhagem SCU 031 utilizando discos com diferentes antibióticos.....	65
Figura 12 – Perfil cinético de produção de biomassa celular (total e residual) e P3HB pela linhagem SCU 31 cultivada em biorreator	69
Figura 13 – Logaritmo neperiano de X_r (massa celular total) com linha de tendência do período de crescimento exponencial do cultivo. Equação da reta com coeficiente angular(0,3048) indicando a velocidade específica máxima.	70
Figura 14 – Perfil cinético da concentração molar de carboidratos detectados no sobrenadante do cultivo da linhagem SCU31 em biorreator suprida com melaço de soja com única fonte de carbono. As setas indicam o momento de alimentação da solução de melaço de soja.	71

Sumário

1	Introdução e Justificativa	12
2	Revisão bibliográfica.....	14
2.1	Biorrefinarias.....	14
2.2	Melaço de Soja	18
2.3	Produção de PHA a partir de melaço de soja.....	20
2.4	Polihidroxialcanoatos	21
2.5	Metabolismo de PHA.....	24
2.6	Diversidade bacteriana na produção de PHA	26
3	Objetivo.....	31
4	Material e métodos	32
4.1	Microrganismos utilizados.....	32
4.2	Preparo de melaço de soja	32
4.3	Produção de PHA a partir de melaço de soja em agitador rotativo.....	32
4.4	Produção de PHA a partir de melaço de soja em Biorreator	34
4.5	Determinação da Biomassa	35
4.6	Determinação do pH	35
4.7	Composição e quantidade de PHA	35
4.8	Concentração de carboidratos	36
4.9	Extração de DNA	38
4.10	Reações de PCR	38
4.11	Reação de sequenciamento	39
4.12	Análise das sequências de DNA.....	40
4.13	Antibiograma.....	40
5	Resultados e Discussão	42
5.1	Produção de PHA com melaço integro.....	42
5.2	Hidrólise do melaço de soja	43
5.3	Produção de PHA com melaço hidrolisado.....	47
5.4	Análise dos carboidratos	49
5.5	Análise quantitativa da hidrólise do melaço de soja.....	56
5.6	Análise das sequências de DNA	59
5.7	Antibiograma	64

5.8 Produção de PHA a partir de melaço de soja em Biorreator	68
6 Conclusões	75
Referências	76
Anexo A	86
Anexo B	89

1 Introdução e Justificativa

O avanço para uma economia de base biológica irá exigir matérias primas para a produção de bioprodutos. Biorrefinarias são complexos industriais com algumas similaridades as refinarias petroquímicas, nestes complexos, fontes de carbono (biomassa) são convertidas em biocombustíveis, energia e químicos. As usinas de açúcar e álcool no Brasil representam embriões de biorrefinarias onde são produzidos açúcar, etanol e eletricidade, mas com a possibilidade de integrar em sua carteira outros bioprodutos. Estes poderiam ser produzidos a partir de recursos disponíveis nas usinas de açúcar e álcool (sacarose, bagaço, etc.), embora outras fontes de carbono possam ser integradas na produção como glicerol (derivado do processo de produção de biodiesel), óleos vegetais e resíduos agrícolas, como melaço de soja ou de eucalipto (Antonietti; Esposito, 2015).

O melaço de soja é um subproduto do processamento da soja para a extração de proteína. Um destino adequado para esse subproduto poderia aliviar os problemas da sua eliminação em indústrias de processamento de soja. Foi estimada a produção de mais de 100 mil toneladas de melaço de soja no Brasil. (Siqueira et al., 2007). Atualmente, é estimada uma produção muito maior deste produto, citando, por exemplo, a empresa paranaense IMCOPA (IMCOPA - Importação, Exportação e Indústria de Óleos S.A., Araucária, PR., Brasil) com capacidade de produção de 70.000 toneladas por ano.

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres acumulados por algumas bactérias na forma de grânulos citoplasmáticos e são utilizados como reserva energética e de carbono. Estes poliésteres são de interesse bioeconômico, pois possuem propriedades termoplásticas muito semelhantes às dos polímeros derivados de fontes petroquímicas. Um grande empecilho para a produção dos PHA é a influência do custo da fonte de carbono. Atualmente, o açúcar é utilizado como fonte de carbono para a produção de PHA e a troca desta fonte de carbono por um resíduo, como melaço de soja diminuiria o preço final do produto consideravelmente, pois o preço do melaço de soja chega a ser dezesseis vezes menor que o preço do açúcar (CEPEA-USP/ESALQ - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada <http://cepea.esalq.usp.br/acucar/>).

O melaço de soja poderia ser uma boa matéria prima para a produção de PHA. No entanto, linhagens bacterianas capazes de utilizar açúcares presentes nesse subproduto, como rafinose e estaquiose, devem ser selecionadas.

Neste trabalho, foi avaliada a capacidade de produção de PHA a partir de melaço de soja por bactérias de uma coleção selecionadas em um trabalho anterior(Lício, 2011) e classificadas como produtoras de PHA a partir de outras fontes de carbono.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Biorrefinarias

Biorrefinarias são complexos industriais com algumas similaridades as refinarias petroquímicas, nestes complexos, fontes de carbono (biomassa) são convertidas em biocombustíveis, energia e químicos.

As usinas de açúcar e álcool no Brasil representam embriões de biorrefinarias onde são produzidos açúcar, etanol e eletricidade, mas com a possibilidade de integrar em sua carteira outros bioprodutos. Estes poderiam ser produzidos a partir de recursos disponíveis nas usinas de açúcar e álcool (sacarose, bagaço, etc), embora outras fontes de carbono possam ser integradas na produção como glicerol (derivado do processo de produção de biodiesel), óleos vegetais e resíduos agrícolas, como melaço de soja ou de eucalipto (Antonietti; Esposito, 2015).

O princípio das indústrias químicas é converter materiais simples em produtos com maior valor agregado como, por exemplo, combustíveis, materiais químicos, polímeros e fármacos. Desde o início do século XX, os combustíveis fósseis têm sido utilizados como principal matéria prima para a fabricação dos mais diversos produtos e para utilização em processos industriais. No entanto, atualmente, a sustentabilidade tem sido colocada em destaque na hora de pensar sobre um novo produto ou técnica industrial, isso acontece graças a incentivos políticos, científicos e ao fato dos combustíveis fósseis estarem cada vez mais escassos. Esta nova forma de pensar promoveu o destaque das biorrefinaria como uma solução sustentável. Em uma biorrefinaria, recursos renováveis oriundos de biomassa ou de resíduos da produção de alimentos seriam refinados e convertidos em materiais com maior valor agregado como combustíveis ou outros produtos químicos através do uso de técnicas químicas ou biológicas (Antonietti; Esposito, 2015).

Na última década, grande parte dos estudos e pesquisas feitas na área de biorrefinarias foi vinculado à busca por novas formas de combustíveis. Isto aconteceu devido ao grande número de investimentos direcionados para essa área de pesquisa. É possível constatar o retorno deste capital verificando na literatura científica dos últimos anos, diversos estudos sobre metodologias de como converter biopolímeros de biomassa, principalmente lignocelulósica, em combustíveis, óleos orgânicos e aditivos para combustíveis (Climent et al., 2014).

Quando comparada com uma refinaria de petróleo moderna, uma biorrefinaria é um complexo tecnológico onde pode haver a produção de solventes, combustíveis, energia elétrica ou até mesmo produtos químicos de alto valor comercial a partir de fontes renováveis. Contendo em suas linhas de produção redes flexíveis para chegar ao produto final, podendo captar diversos resíduos ou diferentes tipos de biomassa como matéria prima (Kamm; Kamm, 2004). O suporte técnico que providenciaria esta flexibilidade e adaptabilidade a estes complexos seria a utilização de microrganismos (ou suas enzimas) adaptados para converter estes resíduos e subprodutos de baixo custo em produtos mais desejáveis e que vão para o mercado sob o rótulo de “químicos verdes”. Geralmente a escolha do produto final produzido por estes complexos também está diretamente relacionada com o tipo de material ou resíduo que será utilizado e este por sua vez está relacionado com a localidade da biorefinaria e quais são os produtos disponíveis neste local.

No entanto, após uma primeira onda de otimismo e entusiasmo com o papel dos bicomcombustíveis sendo uma opção renovável e ambientalmente correta para o suprimento de energia, sofreu críticas por um debate que vem sendo realizado, o embate entre comida e combustível. É claro que o consumo de combustíveis fósseis é intenso e substituí-lo por combustíveis de origem agrícola seria potencialmente prejudicial para o mercado alimentício. Apenas uma pequena parcela dos combustíveis tradicionais foi substituída por seus equivalentes de origem verde como biogás, biotanol e biodiesel. Porém há muito mais em moléculas orgânicas do que o seu conteúdo de energia como pode ser demonstrado pela procura por novos produtos químicos e fármacos. É por isso que atualmente as atenções têm crescido para a produção de material com maior valor agregado, além de não entrarem em conflito com o mercado de alimentos a demanda destes produtos não é de grande volume então eles podem ser vinculados a resíduos produzidos por outros setores como agroindústria, papel e reciclagem. Com a utilização de resíduos na produção em biorrefinarias, esta pôde desviar da pressão gerada pela indústria de alimentos e de novas políticas de utilização da terra, que ocorre quando a terra é utilizada para plantações destinadas a produção de químicos e não de alimentos (Caspeta; Nielsen, 2013). Enquanto isso pesquisas para a otimização técnica para a produção de biocombustíveis são intensificadas para que se possa ultrapassar as barreiras vinculadas a essa produção.

Os resíduos da indústria da madeira são um enorme estoque de materiais ricos em carbono e de fontes renováveis que possuem potencial para serem utilizados como matéria prima para a produção de uma ampla variedade de *commodities* industriais (Mai, 2004). No mundo todo, é gerado aproximadamente 80 bilhões de toneladas de biomassa derivada da indústria da madeira (papel, móveis, construção civil entre outros) por ano e se considerarmos os resíduos não lignocelulóticos que estão intrinsecamente ligados ao processo teríamos 180 bilhões de toneladas anualmente (Likens; Whittaker, 1975; Galbe; Zacchi, 2002). Todo esse resíduo possui em sua composição carboidratos que podem ser utilizados industrialmente, a composição deste resíduo pode conter 30-50% de celulose, 20-50% de hemicelulose e 15-35% de lignina dependendo da origem da biomassa.

Nas últimas décadas, muitas revisões foram publicadas com a intenção de catalogar todas as estratégias desenvolvidas para converter biopolímeros de fontes lignocelulósicas em produtos químicos. Este é um mercado de difícil inserção para os produtos da química verde já que a produção a partir de combustíveis fósseis já é bem estabelecida e possui preços bastante econômicos. A competição pelo mercado por produtos da química verde fica ainda mais complicada com a descoberta do gás de xisto, que parece ser capaz de por no mercado produtos tradicionais com preços competitivos (Bruijninx; Weckhuysen, 2013).

As biorrefinarias não trazem apenas a possibilidade de substituir produtos feitos pela indústria do petróleo, mas também trazem um potencial para desenvolver alternativas aos químicos utilizados atualmente trazendo inovações e novos compostos com novas utilidades. Estas moléculas não competiriam diretamente com os produtos já estabelecidos no mercado petroquímico. Ácido láctico, ácido levulínico, 5-hidroximetilfurfural, γ -valerolactona e produtos derivados da lignina são produtos que podem ser aplicados com mínimas modificações para a produção de novos materiais, fármacos e polímeros (Antonietti; Esposito, 2015).

O ácido láctico é uma importante plataforma química com potencial para utilização em biorrefinarias. Além de sua aplicação direta como um aditivo para alimentos ou como componente farmacêutico, o ácido láctico pode ser o precursor de muitos químicos com importância industrial. Transformações simples como a oxidação a piruvato, a redução a 1,2-propanodiol ou a esterificação para gerar ésteres de lactato já possuem certo interesse comercial. No entanto, atualmente a desidratação do ácido láctico em ácido acrílico e a síntese de di-lactido, usado para

a produção de ácido poliláctico biodegradável continuam sendo as aplicações mais importantes para o ácido láctico (Dusselier; Sels, 2014; Dusselier et al., 2013).

Ácido levulínico é um γ -cetoácido obtido através de um processo de degradação de materiais celulósicos utilizando ácidos orgânicos fortes. O ácido levulínico é um dos compostos mais estudados para fabricação em biorrefinarias e foi um dos primeiros a ser escolhido para aplicações comerciais. Atualmente, sua produção é feita com hidrólise da celulose e juntamente com a produção de ácido levulínico é produzido ácido fórmico (Climent et al, 2014). Junto a outros produtos, o ácido levulínico tem sido proposto como um material de partida para a síntese de ésteres úteis, dióis e lactonas cíclicas. Entre todas as moléculas que podem ser obtidas a partir de ácido levulínico a γ -valerolactona recebe a maior atenção por seu papel como solvente renovável e como um aditivo de combustível sustentável (Alonso et al., 2013).

Processos de degradação de biomassa lignocelulósica também formam outros compostos como o 5-hidroximetilfurfural a partir de um processo de desidratação direta de carboidratos. Este produto também pode ser obtido como um co-produto da hidrólise de biomassa em ácido levulínico (Titirici; Antonietti, 2010). O 5-hidroximetilfurfural pode ser aplicado como monômero para síntese de polímeros de interesse comercial e também como aditivo de combustíveis.

A lignina é um dos principais produtos presentes em resíduos orgânicos de origem vegetal. Há cem anos, era apenas um resíduo da indústria de papel e continuou assim por bastante tempo, então este produto começou a ser submetido a queima em caldeira para a produção de energia elétrica. Hoje a lignina recebe muita atenção, pois é uma fonte em potencial de compostos aromáticos, que são muito desejados para indústria química (Zakzeski et al., 2010).

Os polihidroxicanoatos que serão apresentados em mais detalhes neste trabalho também foram alvo das biorrefinarias. Estes polímeros são poliésteres com propriedades termoplásticas. A possibilidade de produzir um plástico biodegradável a partir de resíduos e compostos orgânicos de pouco valor agregado como xilose e ácido levulínico é amplamente estudada (Keenan et al., 2004). Keenan e colaboradores produziram um copolímero poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato a partir de compostos oriundos de resíduos lignocelulolíticos, no caso hidrolisados de hemicelulose.

Transformações similares poderiam ser consideradas para outros produtos descartados como, por exemplo, taninos (Aouf et al., 2013), polifenóis ou triglicerídeos. Os triglicerídeos em particular têm sido muito estudados no contexto de biorrefinarias para a produção de bicompostíveis. Curiosamente compostos como estes são abundantes em matéria prima vegetal como glicerol e ácidos graxos, que já são utilizados para produções de polímeros e novos materiais (Simon et al., 2012).

As biorrefinarias definitivamente iniciam uma ampla linha de pesquisa com oportunidades para integrar a produção de diversos produtos de interesse econômico, utilizando como matérias-primas, resíduos ou materiais orgânicos de baixo custo. As pesquisas na área de biotecnologia mostram que as biorrefinarias podem gerar complexo industrial bem estabelecido e com produtos competitivos para o mercado de químicos, combustíveis e fármacos.

2.2 Melaço de Soja

O melaço de soja é um resíduo de origem agroindustrial gerado a partir do processamento dos grãos de soja para a produção de alimentos sendo utilizados principalmente para rações (Siqueira et al., 2007).

O melaço de soja tem em sua composição 26,3% de umidade; 4,6% de proteína bruta; 2,8% extrato etéreo; 12,5% resíduo mineral fixo; 53,2% de carboidratos totais; 0,11% de fibras e minerais (Montovani, 2013). O melaço de soja é resíduo do processo de produção de farelo de soja, na obtenção de 750 kg de farelo de soja são gerados 250 kg de melaço de soja. Estima-se uma produção no Brasil de mais de cem mil toneladas de melaço de soja no ano de 2007 (Siqueira et al., 2007).

Algumas empresas utilizam o potencial biotecnológico do melaço de soja. A empresa brasileira IMCOPA produz combustível (etanol) para a sua frota de veículos e com o restante do material ela gera energia (formação de vapor) para suas usinas queimando os açúcares que sobram em caldeiras. Além disso, os resíduos também são vendidos como aditivos para rações de suínos. A Tabela 1 mostra a concentração de açúcares e etanol no melaço após a fermentação alcoólica.

Tabela 1 – Concentração dos açúcares no melaço após fermentação alcoólica (Jocélia da Silva, fonte pessoal)

Compostos	Concentração (%)
Estaquiose	2,19
Rafinose	14,94
Sacarose	7,55
Glicose	0,96
Galactose	0,39
Frutose	3,67
Glicerol	1,85
Etanol	11,07

Porém mesmo com a sobra de material após obtenção de etanol praticamente todo o melaço gerado pela empresa é consumido de outras formas mostrando o potencial energético deste produto e sua potencial aplicabilidade (<http://www.imcopa.com.br/>).

Um dos grandes desafios para a produção de PHA em larga escala é o alto custo vinculado à obtenção do produto, uma forma de reduzir este custo é utilizando resíduos como matéria-prima (Solaiman et al., 2006), por isso o melaço de soja desperta interesse para síntese de polihidroxialcanoatos, pois o preço do melaço de soja é muito inferior ao preço do açúcar. Uma tonelada de melaço de soja custa apenas R\$ 100,00 já o açúcar custa R\$1.600,00 (CEPEA-USP/ESALQ - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada <http://cepea.esalq.usp.br/acucar/>). Porém para utilizar o melaço de soja é necessário encontrar bactérias que possam consumir as diferentes fontes de carboidratos presentes neste produto. De acordo com a literatura, os açúcares presentes no melaço de soja íntegro são glicose, frutose, galactose, sacarose, rafinose e estaquiose (Montovani, 2013), porém em análise feita pela empresa IMCOPA esta composição também pode conter glicerol.

A Tabela 2 mostra a composição dos açúcares presentes no melaço de soja em diferentes estudos. É possível observar que a heterogeneidade do melaço é um fator a ser considerado, pois apesar de todos os resultados mostrarem grandes concentrações de açúcares, a composição de carboidratos varia consideravelmente entre os três estudos apontados.

Tabela 2 – Composição e concentração de açúcares presentes no melaço de soja em diferentes estudos

Estudo	Açúcares totais do melaço (%)							Total
	Estaquiase	Rafinose	Sacarose	Glicose	Galactose	Frutose	Glicerol	
Montovani(2013)	6,5	13	24,5	0,3	1,5	0,8	0	46,6
Siqueira et al.(2007)	9,7	18,6	28,4	0,25	0,25	0,15	0	57,35
IMCOPA	20,18	6,25	24,80	1,92	5,52	3,76	6,47	68,89

A Figura 1 mostra a estrutura dos di-, tri- e tetrassacarídeos encontrados no melaço de soja. Por isso, é interessante utilizar isolados para a produção de PHA a partir de açúcares como rafinose e estaquiase ou metodologias de hidrólise que quebrem estes açúcares.

Figura 1 – Principais açúcares do melaço de soja

Fonte: Solaiman et al., 2006.

2.3 Produção de PHA a partir de melaço de soja

Existem na literatura alguns trabalhos cujo foco é utilizar o potencial biotecnológico do melaço de soja para a produção de bioprodutos, como, por exemplo, a síntese de PHA.

Em um estudo publicado em 2006, Solaiman e colaboradores conseguiram produzir PHA-mcl utilizando melaço de soja como única fonte de carbono. Solaiman e colaboradores utilizaram uma solução diluída de melaço de soja e forneceu para algumas linhagens bacterianas do gênero *Pseudomonas*. Nenhuma das linhagens utilizadas consumiu açúcares específicos do melaço de soja como rafinose e estaquiase, porém uma das linhagens consumiu toda a sacarose e foram obtidos 3,2g/L de massa seca celular total e porcentagens de PHAmcl de até 17%.

Em outro estudo, Full e colaboradores. (2006) procuraram por bactérias capazes de utilizar rafinose como única fonte de carbono para produção de PHA.

Sendo a rafinose um dos principais açúcares do melaço de soja, encontrar bactérias que produzem PHA consumindo este açúcar seria uma forma indireta de produção a partir do melaço de soja, uma vez que a rafinose poderia ser purificada do melaço. No trabalho citado, foi possível obter 90% de PHA em relação à massa seca celular total em cultivos com rafinose purificada.

2.4 Polihidroxialcanoatos

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são o material de reserva de carbono e energia de diversas bactérias. São encontrados na forma de grânulos intracelulares, que podem representar até 80% da massa seca celular total (Anderson e Dawes, 1990; Doi, 1990). A presença destes grânulos de reserva no citoplasma bacteriano não alterando a pressão osmótica das células (Preusting, 1992). Esses poliésteres chamam atenção do setor industrial, pois possuem propriedades termoplásticas que se assemelham a de polímeros de origem petroquímica. Este material também é promissor do ponto de vista ecológico, pois é biodegradável podendo ser uma alternativa para amortizar os impactos gerados pelos polímeros de origem petroquímica (Bueno Netto; Gomez, 1997; Silva et al., 2007). Para a síntese de PHA, normalmente é oferecido ao microrganismo excesso de uma fonte de carbono e limitação de ao menos um nutriente essencial para o crescimento (N, P, O₂, etc.) (Brandl et al., 1990).

Em pesquisas realizadas por diversos grupos foram descritos cerca de 150 diferentes monômeros presentes na composição dos PHA. Estes diferentes monômeros são produzidos por diferentes bactérias dependendo de suas condições de cultivo e também da fonte de carbono oferecida. Os PHA são classificados pelo número de carbonos presentes nos monômeros que o constitui, podem ser PHAscl e PHAmcl.

Os PHAscl (do inglês “*short chain length*”) são os polímeros que possuem monômeros com cadeias carbônicas curtas, ou seja, monômeros com 3 a 5 átomos de carbono e são encontrados em distintas espécies bacterianas (*Ralstonia eutropha*, *Rhodococcus ruber*, etc). Outra classe desses polímeros, os PHAmcl (do inglês “*médium chain length*”), tem nas cadeias carbônicas de seus monômeros de 6 a 14 átomos de carbono e são encontrados em indivíduos do gênero *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. oleovorans*, *P. putida*) (Rehm, 2003; Steinbüchel; Valentim, 1995). Dentre os diversos monômeros de PHA conhecidos e produzidos por bactérias,

cerca de 90% pertencem à classe dos PHAmcl (Rehm; Steinbüchel, 1999). Os PHAmcl possuem características distintas dos PHAscl. Os PHAscl se assemelham mais aos plásticos como polipropileno e polietileno, enquanto os PHAmcl apresentam propriedades elastoméricas semelhantes à borracha (Brandl et al., 1990; Reddy et al., 2003).

As propriedades dos polímeros de PHA variam, pois, dependendo da composição dos diversos monômeros que constituem o polímero este pode ter diferentes propriedades físicas e mecânicas. Sendo assim, o conhecimento da produção destes diversos polímeros com composições diversas poderia possibilitar a confecção sob medida destes polímeros para as mais diferentes aplicações (Kim et al., 2007).

As Tabelas 3 e 4 mostram o potencial técnico de substituição de polímeros de origem petroquímica por PHA e outros dois biopolímeros (polímeros de amido e polilactato). O PHA mostra maior taxa de substituição para todos os polímeros derivados do petróleo em comparação com os outros dois polímeros. Um exemplo do potencial do PHA apresentado na tabela é a possibilidade do PHA substituir até 10% do PVC produzido, é pertinente observar também que os outros dois polímeros não possuem qualquer porcentagem de substituição para o PVC. Sendo o PVC um material amplamente utilizado, a possibilidade de suprir parte de sua produção evidencia o potencial dos PHA. A Tabela 3 traz informações da quantidade de polímeros que poderia ser produzida a partir de PHA para a substituição dos diversos polímeros petroquímicos. É possível notar que até 12,5% da produção total de polímeros derivados dos petroquímicos pode ser substituída por PHA o que significa quase 30 milhões de toneladas sendo pelo menos 3 milhões de PVC. Até o momento apenas os PHA podem ser substitutos biodegradáveis para este material (Shen et al., 2010).

Tabela 3 – Potencial técnico de substituição (em percentual) de diferentes polímeros de origem petroquímica por polímeros biodegradáveis

% de substituição	LDPE	HDPE	PP	PVC	OS	PET	PUR	PA	ABS	PC	PBT	PMMA
Polímeros de amido	8	8	8	-	8	-	8	-	-	-	-	4
PLA	-	10	10	-	10	20	-	10	-	-	-	5
PHA	20	20	10	10	20	10	10	-	10	-	-	5

LDPE-Polietileno de baixa densidade; HDPE-Polietileno de alta densidade; PP-Polipropileno; PVC-Poli(cloreto de vinila); OS-Poliestireno; PET-Poli(tereftalato de etileno); PUR-Poliuretano; PA-Poliamida; ABS-Poli(acrilonitrila-butadieno-estireno); PC-Policarbonato; PBT-Poli(tereftalato de butireno); PMMA-Poli(metacrilato de metila); PLA-Policaprolactona; PHA-Poli(hidroxicarboxilatos). Fonte Shen et al., 2010.

Tabela 4 – Quantidade de diferentes polímeros de origem petroquímica consumidos mundialmente em 2007 e as respectivas quantidades que poderiam ser substituídas por polihidroxicarboxilatos

(1.000t)	PE	PP	PVC	OS	PET	PUR	PA	ABS	PC	PBT	PMMA	Outros	Total	
Consumo global	67.800	44.900	35.280	16.105	15.498	12.285	2.730	7.455	3.150	954	1.400	19.629	227.186	%substituição
PHA para substituição	13.560	4.490	3.528	3.221	1.550	1.228	-	746	-	-	70	-	28.393	12.50

PE-Polietileno; PP-Polipropileno; PVC; OS-Poliestireno; PUR-Poliuretano; PA-Poliamida; ABS-Poli(acrilonitrila-butadieno-estireno); PC-Policarbonato; PBT-Poli(tereftalato de butireno); PMMA-Poli(metacrilato de metila);. Fonte Shen et al., 2010.

Um PHA estudado é o homopolímero de cadeia curta poli-3-hidroxibutirato (P3HB) por seu potencial para entrada no mercado. Este polímero é produzido em uma planta experimental no Brasil. A empresa PHB industrial S/A produz este material utilizando tecnologia desenvolvida pela Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo e pelo Centro de Tecnologia da Copersucar (CTC) (Nonato et al., 2001). A tecnologia desenvolvida utiliza sacarose como fonte de carbono para produção de polihidroxialcanoatos e os custos de produção tornam o processo economicamente viável (Rossel et al., 2006). A produção de combustíveis biorrenováveis no Brasil também passou por diversas fases até atingir a viabilidade econômica. Muitos incentivos e programas do governo como Proálcool foram implementados para que a produção de etanol, a partir de fermentação fosse competitiva no mercado e em 2004 o etanol era uma alternativa viável a gasolina quando o preço do barril do petróleo estava acima de 40 US\$ (Macedo et al., 2008). Assim, sacarose e mesmo outros açúcares derivados do bagaço de cana são tidos como importantes fontes de carbono para a produção de etanol (Dias et al, 2010; 2011). Consequentemente, a produção de PHA fica em segundo plano. No entanto, existe a possibilidade da produção de PHB ser integrada em usinas de açúcar e álcool, formando biorrefinarias, sobretudo considerando-se fontes de carbono de baixo custo e que sejam mais difíceis de serem metabolizadas para a produção de etanol, como a xilose (Silva et al., 2014) ou o melaço de soja que também tem parte de seus açúcares extraídos destinados a produção de álcool.

2.5 Metabolismo de PHA

Para que possa haver síntese de PHA é necessário o fornecimento de fonte de carbono que possa ser convertida a hidroxiacil-CoA por meio de vias metabólicas, que podem ser diversificadas. A hidroxiacil-CoA é o substrato utilizado pela enzima PHA sintase para incorporação de subunidades neste poliéster em formação, portanto, é necessária uma via metabólica capaz de fornecer o substrato e subsequentemente uma enzima capaz de formar o polímero a partir desse substrato. Variações tanto na fonte de carbono como na PHA sintase utilizada podem definir qual será a composição monomérica de uma cadeia polimérica (Gomez, 2000).

A Figura 2 resume as principais vias para a síntese de PHA demonstrando como os diversos metabolismos bacterianos fornecem precursores para síntese destes poliésteres.

Figura 2 – Biossíntese de PHA no contexto do metabolismo microbiano

Abreviações: PhaA – α -cetotiolase; PhaB – 3-cetoacil-CoA redutase (para biossíntese de P3HB esta enzima é acetoacetyl-CoA redutase); PhaC – PHA sintase ou polimerase; PhaG – (R)-3- hidroxiacil-CoA:ACP transacilase; PhaJ – enoil-CoA hidratase (R)-específica. As linhas tracejadas representam passos metabólicos não incluídos. PhaC é específica para monômeros na configuração (R). Fonte: Aldor e Keasling, 2003 - adaptada.

Para descrever de forma genérica o metabolismo de PHA pode ser citada a síntese de P3HB (poli-3-hidroxibutirato) um dos 3-hidroxialcanoatos mais presentes na literatura. A via metabólica descrita é a de *Ralstonia eutropha*. A produção de P3HB ocorre a partir de Acetil-CoA que é um

composto intermediário entre degradação de carboidratos e ácidos graxos e o ciclo do ácido cítrico. São necessárias três enzimas para esta síntese: a β -cetotiolase que forma uma molécula de acetoacetil-CoA a partir de duas moléculas de acetil-CoA; acetoacetil-CoA é reduzida a *R*-3-hidroxiacetil-CoA pela ação da enzima 3-cetoacetil-CoA redutase NADPH dependente e então o último passo é a inclusão do 3-hidroxiacetil-CoA ao polímero em formação pela ação da PHA sintase.

2.6 Diversidade bacteriana na produção de PHA

O início das pesquisas sobre as propriedades termoplásticas dos PHA, mais especificamente do P3HB, ocorreu no começo dos anos 60 (Steinbüchel, 1991). Décadas depois, o interesse por esses polímeros aumentou consideravelmente com a descoberta de que suas propriedades mecânicas podiam ser moduladas através de alterações em sua composição monomérica (Holmes., 1985). Quando foi descoberta a produção de PHAmcl por bactérias do gênero *Pseudomonas* (Brandl et al., 1990; De Smet et al., 1983; Lageveen et al., 1988; Preusting et al., 1992) foram iniciadas pesquisas para investigar a possibilidade da produção de polímeros adequados para uma ampla gama de aplicações (Kim et al., 2007).

Embora se tenha um alto número (em torno de 150) de possíveis monômeros constituintes de PHA que podem ser produzidos por bactérias, é necessário destacar que nem todos estes monômeros podem ser sintetizados a partir de fontes de carbonos simples e baratas. Muitos monômeros têm sua síntese estritamente relacionada à presença de uma fonte de carbono que possua estrutura semelhante à do produto final.

Assim, as soluções para produção de polímeros sob medida para diferentes aplicações têm a necessidade da pesquisa em busca de bactérias capazes de fazer monômeros diferenciados a partir de fontes de carbono baratas ou então fontes de carbono complexas que possibilitem a produção de diversos monômeros. Exemplos da relação entre a diversidade bacteriana, a fonte de carbono fornecida, e a composição do PHA produzido podem ser vistos pela produção de PHAmcl ("*medium chain length*") por *Pseudomonas* a partir de carboidratos, óleos vegetais ou ácidos graxos deles derivados e a produção de P3HB, um PHAscl ("*short chain length*"), por diversas bactérias a

partir de fontes de carbono variáveis (carboidratos, ácidos graxos, óleos vegetais, álcoois e poliálcoois, etc). A diferença entre estes materiais também é notável, enquanto o PHAmcl é um polímero considerado elastômero com valor de alongamento de ruptura de 1000% (Steinbüchel, 2003), o P3HB resulta em um material duro e quebradiço com valor de alongamento de ruptura de apenas 5%. Com estas informações apresentadas podemos observar a versatilidade dos PHA com uma variação do valor de alongamento para ruptura que pode ir de 5% a 1000%. Ao compararmos estes valores com um derivado da indústria petroquímica como o polipropileno, que possui valor próximo a 400% (Sudesh et al., 2000), colocamos em evidencia a capacidade termoplástica dos PHA.

Um exemplo da composição de um PHA contendo mais que um monômero, é a do copolímero P3HB-co-3HV (3-Hidroxibutirato e 3-Hidroxivalerato). Este polímero pode ser obtido com a adição de um co-substrato (ácido propiônico, por exemplo) ao meio de cultura, que funciona como um precursor para as unidades 3HV do polímero P3HB-co-3HV. Quando há baixa incorporação de unidades de 3HV no polímero, este apresenta características próximas ao poliestireno (duro e quebradiço) quando há uma média incorporação de unidades 3HV, o material possui certa flexibilidade e dureza semelhantes ao polipropileno e com uma alta taxa de incorporação de 3HV, o polímero se assemelha ao polietileno (Holmes, 1985). Porém existem limitações, à incorporação de unidade 3HV ao polímero de P3HB: o conteúdo máximo de HV no polímero permite maleabilidade capaz de atingir valores de alongamento para ruptura (medida utilizada para medir maleabilidade de materiais) de 50-60% (Holmes., 1985; Sudesh et al., 2000). Portanto, para substituir materiais mais elásticos, este copolímero não seria o mais adequado.

A capacidade de acumular PHA com a cadeia carbônica curta e média em uma mesma cadeia polimérica já foi observada tanto em bactérias de ocorrência natural (Abe et al., 1994; Chen et al., 2006; Doi., 1995; Kato et al.; 1996a, b; Kobayashi et al., 1994) como em bactérias recombinantes (; Dennis et al., 1998; Leo et al., 2005; Liebergesell et al., 1993a, b; Lu et al., 2003; 2008; Matsumoto et al., 2005; ; Nomura et al., 2005; Normi et al., 2005a, b; Park). A combinação de P3HB e monômeros de PHAmcl têm possibilitado a produção de copolímeros com valores de alongamento para ruptura superiores aos obtidos com a incorporação de 3HV. Em um estudo, Doi e colaboradores

(1995) apresentaram um copolímero de 3HB com 3HHx (3-Hidroxihexanoato, um monômero de PHA com cadeia carbônica média) produzido por *Aeromonas caviae* utilizando ácidos graxos ou óleos vegetais como fonte de carbono. Estes copolímeros apresentavam valores de alongamento para ruptura maiores, atingindo 400% com 10 mol% de 3HHx e até 850% com 17 mol% de 3HHx no copolímero. Estudos já demonstraram que os copolímeros P3HB-co-3HHx possuem propriedades mecânicas similares ao polietileno de baixa densidade, sendo maior a maleabilidade conforme aumenta a proporção de 3HHx no polímero (Xie; Chen, 2006). Em linhagens recombinantes, também pode ser vista mudança de propriedades do material de acordo com a composição do PHA. Linhagens recombinantes de *Pseudomonas* sp. que produziam PHA contendo monômeros de 3HB e 3HAMcl com cadeias carbônicas variando de 6 a 12 átomos de carbono, produziam um copolímero de PHA com valor de alongamento para ruptura de 680% quando a fração de 3HAMcl em sua composição correspondia a 6% (Matsusaki et al., 2000; Sudesh et al., 2000).

Os polímeros de PHA que possuem em sua composição monômeros de 3HB e 3HAMcl são essencialmente obtidos a partir de cultivos que utilizam óleos vegetais ou ácidos graxos como fonte de carbono (Doi; Fukui, 1998; Kahar et al., 2003; Kobayashi et al., 1994). O gênero *Aeromonas* foi o primeiro a ser descrito com a capacidade de incorporar quantidades expressivas de 3HAMcl ao PHA (Doi, 1995; Fukui, 1997; Kobayashi et al., 1994;).

O Brasil é internacionalmente conhecido pelo seu potencial em mega-diversidade biológica, porém são publicados poucos trabalhos com o intuito de encontrar bactérias produtoras de PHA nos diversos biomas brasileiros (Silva et al., 2007).

Em um trabalho de isolamento de novos microrganismos produtores de PHA a partir de amostras de solo de canavial (Gomez et al., 1994; 1996), foram encontradas 75 linhagens bacterianas capazes de produzir PHA. Em estudos posteriores, foi observado que uma destas linhagens possuía potencial para a produção industrial destes polímeros (Gomez et al., 1997; Silva et al., 2000) e que esta linhagem se tratava de uma espécie ainda não descrita (Brämer et al., 2002). Este estudo evidencia o

potencial de biodiversidade que ainda pode ser explorado no Brasil, mesmo em ambientes bastante explorados como o solo de canavial ainda é possível encontrar novas espécies. Em outro trabalho, foram encontradas bactérias capazes de produzir um novo monômero (3HPE; 3-hidroxi-4-pentenoato) além do P3HB a partir de carboidratos (Rodrigues et al., 1995). Quanto à fonte de carbono, estes isolados foram capazes de produzir PHA a partir de xilose (Silva et al., 2004) ou até mesmo óleos vegetais (Matsuda, 2009). Além destas linhagens, novas produtoras de PHA dentre estes isolados, também foram encontradas bactérias do gênero *Pseudomonas* capazes de produzir eficientemente PHAmcl a partir de carboidratos (Gomez, 2000) ou de óleos vegetais (Silva-Queiroz et al., 2009).

No estudo de Lício, bactérias foram isoladas de amostras de lodo de esgoto e de uma reserva florestal localizada dentro do campus da Cidade Universitária Armando Sales de Oliveira (CUASO - Universidade de São Paulo). Foram detectadas por volta de 226 linhagens capazes de acumular PHA (Lício, 2011). Algumas bactérias apresentaram eficiência na conversão de carboidratos em P3HB superior a *Burkholderia sacchari*, uma linhagem bastante eficiente na produção desses polímeros, mostrando novamente que o investimento em procurar linhagens naturais para a produção de PHA é uma estratégia em potencial.

Em 2004 Bonato e colaboradores isolaram bactérias a partir de amostras de solo de Mata Atlântica e identificaram um isolado com atributos interessantes para a produção de P3HB.

Isolados bacterianos produtores de PHA também foram encontrados a partir de amostras de solo e areia em diversos ambientes do estado do Rio Grande do Sul (Matias et al., 2001). Foi feita análise da subunidade subssomal 16S rRNA destes microorganismos e então a sequência foi comparada ao banco de dados do Ribossomal Database Project (RDP). A análise mostrou que dentre estes isolados foram encontrados representantes dos gêneros *Streptomyces*, *Bacillus*, *Streptacidiphilus*, *Streptoalloteichus* e *Burkholderia* (Matias et al., 2009).

Fora do Brasil também são descobertas novas linhagens a partir de isolamento em ambientes naturais. Na Malásia foi isolada a linhagem *Cuprividus* sp. USMAA1020 a partir de amostras de solo, lama, sedimento e

água e esta linhagem apresentando capacidade de acumular mais de 50% da massa seca celular em copolímero P3HB-co-4HB (4HB; 4-Hidroxibutirato). Foram obtidas frações de até 38 %mol de 4HB no copolímero quando era fornecido γ -butirolactona como fonte de carbono no meio de cultura, um valor de 2% maior quando oferecido o ácido 4-hidroxibutírico (Amirul et al., 2009).

A linhagem *Zobellella denitrificans* MW1 foi isolada a partir de lodo de esgoto em um estudo com amostras de diferentes ambientes da Alemanha e Egito. Os autores observam a produção de, aproximadamente, 87% da massa seca celular de P3HB em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono e alta concentração salina, condições que sugerem uma possível aplicação para o glicerol que é um resíduo da produção de biodiesel. Esta linhagem também apresenta uma característica singular, o acúmulo associado ao crescimento, que ocorre concomitantemente ao consumo de glicerol (Ibrahim; Steinbüchel, 2009).

Os trabalhos citados mostram a importância de procurar novas espécies bacterianas nos mais diversos ambientes, para que assim seja possível encontrar produtores de PHA com capacidades de utilizar substratos diferentes e produzir também polímeros de composição diferentes.

3 Objetivo

Este trabalho visa avaliar isolados bacterianos com relação à capacidade de produzir PHA a partir do melaço de soja como fonte de carbono. Para cumprir esse objetivo geral, são propostos os seguintes objetivos específicos:

- avaliar, em cultivos em agitador rotativo, isolados bacterianos com relação à produção de PHA em meio mineral contendo melaço de soja íntegro e hidrolisado como única fonte de carbono;
- identificar os diferentes açúcares presentes no melaço de soja;
- estabelecer procedimento de hidrólise para di-, tri- e tetra-sacarídeos presentes no melaço de soja;
- identificar em nível de gênero os isolados bacterianos mais eficientes por sequenciamento através do gene subssomal 16S rRNA; Obter antibiograma dos isolados bacterianos mais eficientes;
- realizar cultivo em biorreator para avaliar o potencial biotecnológico de produção de PHA a partir do resíduo em questão.

4 Material e métodos

4.1 Microrganismos utilizados

Neste estudo, foram utilizadas duas bactérias como referência: *Pseudomonas* sp. LMF046 (Gomez, 2000) e *Burkholderia sacchari* LFM101. A primeira produtora de PHAmcl e a segunda de P3HB. Foram avaliados também quatorze isolados bacterianos (DCL 07, DCL 08, DCL 11, SCU 29, SCU 31, SCU 63, SCU 66, SCU 74, SCU 86, ISO A, ISO B1, ISO B2, ISO C1 e ISO C2), sendo DCL 07, DCL 08 e DCL 11 isoladas de lodo de esgoto, SCU 29, SCU 31, SCU 63, SCU 66, SCU 74 e SCU 86 isolados do solo de uma reserva florestal nas proximidades do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Lício, 2011) e ISO A, ISO B1, ISO B2, ISO C1 e ISO C2 isolados do melaço de soja neste estudo.

4.2 Preparo de melaço de soja

A solução de melaço de soja (200 g/L) foi primeiramente centrifugada durante 30 minutos a 15.000 rpm para remoção de material particulado. O sobrenadante foi coletado e então filtrado com um microfiltro de 0,22 µm. Esta solução era utilizada nos ensaios com 10% do volume total do cultivo.

Para os ensaios com o melaço hidrolisado esta mesma solução filtrada foi submetida a uma hidrólise ácida com adição de 10% de H₂SO₄ 10 mol/L,

aquecida a 70 °C por tempos variáveis de cinco a cento e oitenta minutos para testes com o melaço, todavia o melaço utilizado para os cultivos era submetido a hidrólise por apenas sessenta minutos. Após a hidrólise, a solução foi neutralizada com adição de 10% NaOH 10 mol/L. A solução hidrolisada por sessenta minutos era utilizada nos ensaios com 10% do volume total do cultivo.

4.3 Produção de PHA a partir de melaço de soja em agitador rotativo

As bactérias foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 2001) sólido e depois em meio líquido. Foram primeiramente estriadas em placas contendo meio LB sólido e incubadas durante 24 h a 30 °C para a obtenção de colônias isoladas. Para preparação do pré-inóculo foram inoculadas colônias, previamente isoladas, em frasco de Erlenmeyer de 125 ml contendo 25 ml de meio LB líquido e então foram submetidas a cultivo em agitador rotativo (150 rpm e 30 °C) por 24 h.

Tabela 5 – Componentes do meio Luria-Bertani (LB)

Componentes	Concentração
Triptona	10g/L
Extrato de levedura	5g/L
NaCl	5g/L
Meio sólido	
Ágar	20g/L

Os ensaios de acúmulo e produção dos polímeros foram feitos em meio mínimo (MM) (Ramsay et al., 1989) com a adição de 10% do volume total da cultura de uma solução de melaço de soja íntegro ou hidrolisado como fonte de carbono.

Tabela 6 – Componentes do Meio Mineral

Componente	Concentração
Na ₂ HPO ₄	3,5g/L
KH ₂ PO ₄	1,5g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0g/L
Sol. Traços	1,0ml/L
Citr. Fe NH ₄	1,0ml/L
MgSO ₄ 7 H ₂ O	1,0ml/L
CaCl ₂ 2 H ₂ O	1,0ml/L

Fonte: Ramsay et al., 1989.

Tabela 7 – Componentes da solução de elementos traços presente no Meio Mineral

Componentes	Concentração
H ₃ BO ₃	0,3g/L
CaCl ₂ .6 H ₂ O	0,2g/L
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,1g/L
MnCl ₂ .4 H ₂ O	30mg/L
NaMoO ₄ .2 H ₂ O	30mg/L

NiCl ₂ .6 H ₂ O	20mg/L
CuSO ₄ .5 H ₂ O	10mg/L

Fonte: Ramsay et al., 1989.

Os cultivos de produção foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 125 ml com 25 ml de meio mineral contendo melaço hidrolisado ou íntegro e inoculados com 1,6 ml da cultura pré-inóculo. A incubação foi realizada em agitador rotativo (150 rpm e 30 °C) durante 72 h.

Para amostragem eram retirados 20 ml do cultivo e então era medido o pH, a massa seca celular, o teor de PHA e a concentração de carboidratos de acordo com as metodologias descritas abaixo.

4.4 Produção de PHA a partir de melaço de soja em Biorreator

O isolado SCU 31 foi selecionado para o cultivo em biorreator utilizando melaço de soja para a produção de PHA. O aparelho utilizado foi biorreator Biostat B (B. Braun Biotech International, Melsungen, HE, Alemanha) em meio mineral adaptado com o melaço de soja íntegro como única fonte de carbono e limitado em nitrogênio (NH₄)₂SO₄. O volume inicial do cultivo foi de 1,5 litros, sendo alimentado com mais melaço de soja quando os níveis de açúcar estavam baixos.

Tabela 8 – Composição do meio mínimo utilizado no ensaio de produção de PHA em Biorreator

Componente	Concetração
MgSO ₄	0,3105g/L
KH ₂ PO ₄	0,3875g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,907g/L
Sol. Traços*	2,0ml/L
Citr. Fe NH ₄	1,0ml/L
NaCl	1,0ml/L
CaCl ₂ 2 H ₂ O	2,0ml/L

* – esta solução traço possui a mesma composição da solução mostrada na Tabela 7.

Para amostragem foram retirados 20 ml do cultivo e então era medido o pH, a massa seca celular, o teor de PHA e a concentração de carboidratos de acordo com as metodologias descritas abaixo.

4.5 Determinação da Biomassa

A massa seca celular foi obtida após centrifugação de volume conhecido da cultura, então o pellet obtido era lavado e liofilizado. Após este processo, a massa do pellet liofilizado era determinada em uma balança analítica.

4.6 Determinação do pH

O pH foi determinado no sobrenadante, após centrifugação da cultura, em potenciômetro (Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil – modelo TEC – 2) utilizando padrões de pH 4,0 e 7,0.

4.7 Composição e quantidade de PHA

Para determinar a quantidade e a composição de PHA produzido por cada linhagem, utilizou-se cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (Riis e Mai, 1988). Foram separados cerca de 12 a 19 mg de células liofilizadas de cada amostra. Estas células foram colocadas em um tubo ao qual foi adicionado 2 mL de uma solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2-dicloreto e 100 µL de uma solução de ácido benzóico (40 g/L) em propanol. Os tubos foram fechados e vedados com fita veda rosca, agitados e então submetidos a propanólise por 3 horas a 100 °C. Após os primeiros 30 minutos, os tubos foram agitados novamente e então retornaram para serem aquecidos por mais 2 horas e 30 minutos. Os tubos foram resfriados e então se adicionaram 4 mL de água destilada e os tubos foram agitados novamente. Após alguns minutos, a fase aquosa (superior) foi retirada e então foi adicionado sulfato de sódio anidro para retirada da água remanescente, a fase restante (orgânica) foi utilizada para análise.

Um volume de 2,0 µL da fase orgânica foi analisado após fracionamento da amostra (“split” 1:20) em cromatógrafo gasoso HP7890A, GC System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos) equipado com uma coluna HP-1 (100% fenilmetilsiloxano, comprimento – 30 m, diâmetro 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm) (Agilent Technologies). A análise foi conduzida nas seguintes condições: Gás de arraste: Nitrogênio (0,6 mL/min); Temperatura do injetor: 250 °C; Temperatura do detector: 300 °C; Sistema de detecção: ionização de chama (FID); Programa de temperaturas do forno : 100

°C por 3 minuto, elevação da temperatura a 6 °C/min até 180 °C por 5 minutos, então elevação novamente da temperatura a 6 °C/min até 220 °C . Ácido benzóico foi utilizado como padrão interno. Polímeros produzidos por *P. oleovorans* ou *P. putida* a partir de diferentes fontes de carbono ou P3HB e P3HB-co-3HV (Aldrich) foram utilizados como padrões para a geração de curvas de calibração. O PHA total foi calculado somando as quantidades de 3HB (3-Hidroxibutirato) e de outros constituintes 3HV (3-Hidroxivalerato), 3HHx (3-Hidroxihexanoato), 3HHp (3-Hidroxiheptanoato), 3HO (3-Hidroxioctanoato), 3HN (3-Hidroxinonanoato), 3HD (3-Hidroxidecanoato) e 3HDD (3-Hidroxidodecanoato) quando presentes no polímero.

4.8 Concentração de carboidratos

Neste trabalho foram utilizadas duas metodologias para determinar a concentração dos açúcares presentes no melaço de soja. Em um primeiro momento foi utilizado H₂SO₄ como fase móvel à temperatura ambiente e num segundo momento foi utilizado HClO₄ como fase móvel à 20 °C.

A concentração dos açúcares do melaço foi obtida por análise em HPLC (Ultimate 3000 – Dionex: Thermo Fischer Scientific Inc., Whaltham, MA, Estados Unidos) equipado com coluna para determinação de açúcares (Aminex HPX87-H 300x7,8mm, fase móvel ácido sulfúrico H₂SO₄ 0,005 mol/L vazão 0,6 mL/min, temp. ambiente). O detector utilizado foi o de índice de refração diferencial (Shodex IR-101). Foram usados como padrões os açúcares glicose, frutose, sacarose e rafinose.

A concentração dos açúcares do melaço após o melhoramento das técnicas de detecção foi obtida por análise em HPLC (Ultimate 3000 – Dionex: Thermo Fischer Scientific Inc., Whaltham, MA, Estados Unidos) equipado com coluna para determinação de açúcares (Aminex HPX87-H 300 x 7,8mm, fase móvel ácido perclórico HClO₄ 0,005 mol/L vazão 0,6 mL/min, temp. 20 °C). O detector utilizado foi o de índice de refração diferencial (Shodex IR-101). Foram usados como padrões os açúcares glicose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose.

Mesmo com o aumento da qualidade da técnica utilizada para detectar os açúcares presentes no meio e suas concentrações, não foi possível diferenciar a frutose da galactose, pois estes dois monossacarídeos têm praticamente o mesmo tempo de retenção. Para resolver este problema todos

os açúcares foram convertidos para mols de hexoses utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Massa do açúcar [g/L]} \times (N) \times 1.000}{\text{Massa Molar de Hexose}^{**}}$$

*Número de hexoses que compõem o açúcar.

*Massa molar de Hexose = 180,16

Desta forma foi possível calcular a concentração molar em hexoses de cada um dos açúcares analisados. Esta é uma maneira mais simples de se avaliar o destino e origem de cada uma das hexoses nos diferentes carboidratos analisados. A Tabela 9 mostra a massa molar dos açúcares quantificados neste trabalho.

Tabela 9 – Massas molares dos diferentes sacarídeos quantificados

Carboidrato	Massa molar
Estaquiase	666,58
Rafinose	504,42
Sacarose	342,3
Glicose	180,16
Frutose/Galactose	180,16

4.9 Extração de DNA

Para a extração do DNA os isolados bacterianos foram cultivadas por doze horas em meio líquido Luria Bertani (LB). Posteriormente foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 RPM para obtenção de um pellet com as células. A extração do DNA genômico foi feita utilizando o KIT DNeasy Blood e Tissue Kit (Qiagen) conforme instruções do fabricante.

4.10 Reações de PCR

Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do gene 16S rRNA estão apresentados na tabela abaixo.

Tabela 10 – Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR

Oligonucleotídeo e Sequências	Referências
27 F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3'	Lane., 1991
1401 R 5'-CGG TGT GTA CAA GCC GCT GA- 3'	Heuer <i>et al.</i> , 1997

A amplificação foi feita em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) utilizando o kit *Gotaq* Master Mix (Promega, Madison, WI, Estados Unidos).

A programação das temperaturas utilizadas para o par de oligonucleotídeos citado acima são apresentadas na Tabela 10. Foram feitos 30 ciclos de extensão.

Tabela 11 – Temperaturas usadas na reação de PCR

Temperatura inicial de desnaturação	95 °C	1 minuto
Temperatura de desnaturação	94 °C	15 segundos
Temperatura de anelamento	45 °C	15 segundos
Temperatura de extensão	72 °C	1,5 minutos
Temperatura final de extensão	72 °C	5 minutos

4.11 Reação de sequenciamento

Os produtos de PCR do fragmento gênico 16S rRNA dos isolados mais produtores de PHA(SCU 031.063,066,074) foram purificados com o kit QIAquick PCR purification Miucrocentrifuge QIAGEN e utilizados para a reação de sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano – USP. O equipamento usado foi o ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, USA), com o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits.

Os oligonucleotídeos utilizados para a reação de sequenciamento são listados na tabela abaixo.

Tabela 12 – Oligonucleotídeos utilizados nas reações de sequenciamento

Oligonucleotídeo e Sequências	Referências
27 F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3'	Lane., 1991
926 F 5'-AAA CTC AAA GGA ATT GAC GG-3'	Baker <i>et al.</i> , 2003
782 R 5'-ACC AGG GTA TCT AAT CCT GT- 3'	Chunf <i>et al.</i> , 1995

4.12 Análise das sequências de DNA

Os resultados do sequenciamento do 16S rRNA foram utilizados para fazer uma sequência consenso para cada um dos isolados a partir dos resultados do sequenciamento com o programa MAFFT(Katoh; Standley, 2013).

As sequências dos isolados SCU 031, 063, 066 e 074 foram analisadas utilizando a ferramenta BLASTN no National Center for Biothecnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Após a busca por sequências semelhantes, foram selecionadas aquelas provenientes de linhagens que continham alto grau de similaridade do gene que codifica 16S rRNA ($\leq 98\%$) em relação dos isolados citados.

Todas as sequências do 16S rRNA foram alinhadas utilizando o programa MAFFT, este alinhamento foi utilizado na construção de uma árvore filogenética de parcimônia através do programa TNT (Goloboff., 2008) armazenando na memória 100 mil árvores a cada iteração de uma busca heurística com 100 réplicas e a manutenção de 100 topologias por réplica de ratchet, tree-fusing, tree-drift (Giribet., 2007) e enraizada no grupo mais externo *Ralstonia eutropha*.

4.13 Antibiogama

A técnica utilizada para testar a resistência dos isolados a antibióticos foi o teste de sensibilidade por disco de difusão (Bauer et al. 1966) em ágar Müller-Hinton, seguindo as normas do Manual Clinical and Laboratorial Standards Institute(CLSI) de 2011.

A linhagem foi primeiramente cultivada em placas de LB sólido à 30 °C por 24 h para a obtenção de colônias isoladas. Uma colônia foi inoculada em 25 mL de LB líquido e cultivada em agitador rotativo à 30 °C, 150 rpm por 24 h. A cultura em meio LB líquido foi diluída em solução salina (0,85%) até que fosse atingida a absorbância de 0,8 no comprimento de onda de 625 nm. A cultura então foi espalhada em uma placa contendo meio sólido Müller-Hinton com o auxílio de um swab estéril até que toda a superfície da placa fosse coberta. Assim que foi observado, após alguns minutos, que a superfície da

placa estava totalmente seca, foram colocados, com o auxílio de uma pinça estéril, os discos contendo os antibióticos a seguir: Ertapenem, Norfloxacin, Piperacilina e Tazobactam, Ceftazidima, Ceftriaxona, Levofloxacin, Rifampicina, Gentamicina, Aztreonam, Estreptomicina, Ofloxacin, Tetraciclina, Pefloxacin, Ciprofloxacina, Netilmicina, Cefotaxima, Imipenem, Cloranfenicol. Tobramicina, Sulfametoxazol e Trimetoprim, Amicacina, Cefepime.

As placas com os discos contendo antibióticos foram incubadas a 30 °C por 24 h. Após incubação, foi analisada a presença ou ausência de halos de inibição do crescimento ao redor dos discos, os halos foram medidos e esses valores foram interpretados conforme as recomendações do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de 2011..

5 Resultados e Discussão

5.1 Produção de PHA com melaço integral

O objetivo deste trabalho foi selecionar bactérias potencialmente úteis para processo de produção de PHA utilizando melaço de soja como principal matéria-prima. Neste estudo, foram avaliadas 14 isolados bacterianos obtidos em outros trabalhos (Lício., 2011) e que demonstraram a capacidade de produzir PHA a partir de carboidratos. Para avaliar os isolados, estes primeiramente foram cultivados em meio sólido para que fossem obtidas colônias isoladas, em seguida foram cultivados em meio líquido LB por 24 horas a 30 °C e depois em meio mineral contendo o melaço de soja integral como única fonte de carbono por 72 horas também a 30 °C.

Das quatorze linhagens capazes de produzir PHA avaliadas neste trabalho, apenas 5 foram capazes de sintetizar PHA utilizando o melaço de soja como única fonte de carbono (Tabela 13).

Tabela 13 – Produção de PHA a partir de melaço de soja integral. Média, duplicatas biológicas e analíticas.

Linhagem Bacteriana	pH	CDW (g/L)	PHA (%MSC)
<i>Pseudomonas</i> sp. LMF046	7,30±0,33	0,73±0,10	-
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101	6,88±0,03	2,38±0,09	10,7±1,6
DCL 007	7,03±0,25	1,33±0,45	-
DLC 008	7,04±0,25	1,24±0,07	Traços
DCL 011	7,00±0,01	1,17±0,02	Traços
SCU 029	7,05±0,02	2,39±0,15	20,1±2,1
SCU 031	6,92±0,07	3,72±0,13	25,0±2,6
SCU 063	7,03±0,06	3,39±0,14	26,3±1,9
SCU 066	6,97±0,01	2,45±0,14	21,7±1,9
SCU 074	6,96±0,06	2,40±0,12	23,6±4,3
SCU 086	7,34±0,01	1,31±0,25	-
ISO A	7,39±0,24	1,09±0,07	-
ISO B1	7,22±0,06	1,22±0,07	-
ISO B2	7,41±0,06	0,83±0,01	-
ISO C1	7,27±0,01	1,31±0,04	-
ISO C2	7,45±0,01	0,86±0,11	-

Controle	6,95±0,02	-	-
----------	-----------	---	---

“–”: não detectado. Traços <5% da massa celular seca (MCS).

Embora tenha sido observado um pequeno crescimento e alteração no pH do cultivo de *Pseudomonas* sp. LFM046, não se observou a produção de qualquer PHA por essa linhagem. *B. sacchari* LFM101 atingiu uma massa celular seca de 2,38 g/L e o teor de P3HB acumulado correspondeu a cerca de 10%. Para dois isolados (DCL 008 e DCL 011), observou-se apenas o acúmulo de traços de P3HB. Os isolados SCU 029, SCU 031, SCU 063, SCU 066 e SCU 074 apresentaram acúmulo de P3HB em teores e concentrações superiores aqueles atingidos pela linhagem de referência (*B. sacchari* LFM101). Dentre estas, as linhagens SCU 031 e SCU 063 se destacam por apresentarem mais de 25% da massa celular seca de PHA, isto chega a representar cerca de 0,90 g/L de P3HB, mais que o dobro do valor obtido por *Burkholderia sacchari* (0,25 g/L) que é uma linhagem conhecida por possuir alta eficiência na conversão de carboidratos em PHA (Gomez et al., 1996; 1997; Mendonça et al., 2014). As outras sete linhagens foram capazes de crescer utilizando melaço de soja como única fonte de carbono, porém não se detectou o acúmulo de PHA.

Em comparação com a literatura este estudo se destaca com maior teor de produção de PHA em porcentagem de massa seca celular. Solaiman e colaboradores num estudo feito em 2006 obtiveram cerca de 3,0 g/l e 17% de PHA em massa seca celular total utilizando melaço de soja com o única fonte de carbono em cultivos com bactérias do gênero *Pseudomonas*. Full e colaboradores, também em 2006, atingiram produção de PHA correspondendo a 90% da massa seca celular total, porém não foi utilizado melaço de soja, mas sim o sacarídeo rafinose purificado.

5.2 Hidrólise do melaço de soja

O melaço de soja é composto por uma mistura de mono-, di-, tri- e tetra-sacarídeos. Desta forma, sua hidrólise pode levar a liberação dos mono-sacarídeos (glicose, frutose e galactose) que podem ser mais facilmente metabolizados por diferentes linhagens bacterianas. Assim, foi avaliado o processo de hidrólise ácida do melaço de soja como estratégia para aumentar

a disponibilização de carboidratos e permitir uma melhor produção de PHA. O melaço de soja foi submetido a processo de hidrólise ácida utilizando H_2SO_4 10 mM. A hidrólise se estendeu por até cento e oitenta minutos e foi acompanhada por mudanças no perfil de carboidratos, analisados em HPLC.

Primeiramente, foi feita uma análise para determinar qual o melhor tempo de hidrólise e então após determinado este tempo foram feitas análises mais minuciosas.

Na primeira análise, a metodologia utilizada para detecção de carboidratos não era completa, pois só haviam padrões para rafinose, sacarose, glicose e frutose/galactose. Além disso, a fase móvel utilizada era H_2SO_4 5 mM que, como se evidenciou posteriormente, não separava adequadamente os picos dos açúcares e tornava menos reprodutível as análises.

Figura 3 – Perfil de carboidratos de melaço de soja submetido a hidrólise ácida (Área dos açúcares)

As análises preliminares do perfil de açúcares obtidos durante a hidrólise do melaço mostram que a partir dos 60 minutos não são observadas grandes diferenças no padrão dos açúcares detectados. Porém quando comparamos o

tempo zero com o de 60 minutos se observa a diminuição na concentração de sacarose e, menos acentuada, da rafinose e o aumento da concentração de glicose e frutose, evidenciando a eficácia da metodologia de hidrólise utilizada, sobretudo para sacarose. No tempo de 120 minutos foi observado um leve aumento na concentração de glicose, no entanto esses valores não são significativos, indicando que não há ganhos com mais 60 minutos de hidrólise.

Nos cromatogramas da Figura 4 podemos ver como os picos de sacarose e rafinose diminuem enquanto picos de glicose e frutose aumentam com a hidrólise ácida.

Hidrólise tempo 0

Hidrólise tempo 60'

Figura 4 – Perfil de carboidratos do melaço de soja submetido a zero e 60 minutos de hidrólise ácida.

Mesmo sendo uma análise preliminar este resultado já nos permitiu determinar um tempo efetivo de hidrólise. A Figura 5 mostra o perfil de carboidratos obtidos após hidrólise pelo tempo de 180 minutos. É possível ver que o resultado de degradação dos tetra e trissacarídeos é obtido com 60 minutos de hidrólise e que depois deste tempo não há grande variação.

Figura 5 – Perfil de carboidratos do melaço de soja submetido a 180 minutos de hidrólise ácida.

5.3 Produção de PHA com melaço hidrolisado

Para avaliar o efeito da hidrólise na disponibilização de maior quantidade de carboidratos para o crescimento celular e produção de PHA, o melaço foi hidrolisado por 60 minutos e utilizado como fonte de carbono em cultivos de produção de PHA.

Os isolados primeiramente foram cultivados em meio sólido para que fossem obtidas colônias isoladas, em seguida foram cultivados em meio líquido LB por 24 horas a 30 °C e depois em meio mineral contendo o melaço de soja hidrolisado como única fonte de carbono por 72 horas também a 30 °C.

Com o melaço de soja hidrolisado foi possível detectar o crescimento de todas as linhagens bacterianas (Tabela 14). Para todas as linhagens bacterianas avaliadas detectou-se a produção de algum PHA, ainda que em alguns casos em pequena quantidade.

Tabela 14 – Produção de PHA a partir de melaço de soja hidrolisado. Média, duplicatas biológicas e analíticas

Linhagem Bacteriana	pH	CDW (g/L)	PHA (%MSC)
<i>Pseudomonas sp.</i> LMF046	6,95±0,02	1,66±0,15	Traços
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101	6,91±0,08	2,37±0,20	6,14±0,75
DCL 007	6,77±0,06	1,72±0,22	Traços
DLC 008	6,82±0,01	1,97±0,26	Traços
DCL 011	7,26±0,05	1,54±0,19	15,11±3,72
SCU 029	7,06±0,01	2,69±0,14	13,87±1,69
SCU 031	7,05±0,01	2,99±0,25	31,77±2,57
SCU 063	7,05±0,02	2,92±0,27	35,41±6,59
SCU 066	7,03±0,02	2,90±0,27	33,83±8,10
SCU 074	7,03±0,01	1,45±0,25	13,74±6,50
SCU 086	7,07±0,02	2,74±0,23	12,28±1,79
ISO A	7,07±0,02	1,55±0,17	Traços
ISO B1	7,05±0,01	2,90±0,20	Traços
ISO B2	5,07±0,04	1,92±0,41	Traços
ISO C1	6,97±0,01	1,84±0,27	Traços
ISO C2	7,10±0,06	1,76±0,11	Traços
Controle	6,85±0,01	-	-

“–”: não detectado. Traços <5% da massa celular seca (MCS).

Pseudomonas sp. LFM046 apresentou um crescimento mais expressivo que aquele observado quando o melaço não hidrolisado foi suprido. Também foi detectada pequena quantidade de PHA_{MCL}, sendo o 3-hidroxidecanoato (3HD) o principal monômero detectado. Estes resultados são compatíveis com a incapacidade de *Pseudomonas sp.* LFM046 de consumir sacarose (Gomez, 2000). Após a hidrólise, a sacarose disponível no melaço foi convertida em glicose e frutose que são facilmente assimiláveis por *Pseudomonas sp.* LFM 046 (Diniz et al., 2004).

Para quatro linhagens (ISO B1, ISO C1, DCL 007 e DCL 008), detectou-se a produção de pequena quantidade de PHA_{MCL} (<5% da massa celular seca), caracterizado principalmente pela presença do monômero 3HD. Solaiman e colaboradores (2006) conseguiram a produção de PHA_{mcl} utilizando uma solução contendo carboidratos do melaço de soja como fonte de

carbono, porém o único açúcar do melaço que foi consumido foi sacarose. Embora em um dos cultivos esses autores tenham conseguido PHA correspondendo a 17% da massa seca celular, na maioria dos cultivos o teor de PHA foi de 5-7%. O principal constituinte detectado foi o 3HD, representando cerca de 40-50 mol%. Neste trabalho, os resultados foram qualitativamente similares, mas apenas após a hidrólise do melaço de soja, indicando que as linhagens de *Pseudomonas* analisadas neste trabalho não são capazes de consumir sacarose, como foi observado por Solaiman et al. (2006) para a linhagem de *P. corrugata*.

Burkholderia sacchari LFM101, por outro lado, não apresentou diferença significativa na massa celular seca total produzida a partir do melaço de soja hidrolisado ou não. Este resultado é compatível com a capacidade dessa bactéria em utilizar eficientemente tanto sacarose como glicose e frutose como fontes de carbono (Gomez et al., 1996).

Para três bactérias (ISO A, ISO B2 e ISO C2) que não se detectou a produção de P3HB a partir do melaço íntegro, foi detectada uma pequena produção (<5%), após a hidrólise. Para o isolado SCU 086 também não se detectou qualquer PHA utilizando o melaço íntegro, mas após a hidrólise este correspondia a 12,28% da massa seca celular.

Em quatro bactérias (DCL 011, SCU 031, SCU 063 e SCU 066), observou-se uma maior produção de P3HB após a hidrólise do melaço. Os três isolados SCU 031, SCU 063 e SCU 066 que se destacaram com a utilização do melaço íntegro para produção de P3HB, também apresentaram o melhor desempenho após a hidrólise. Vale destacar que esse desempenho foi superior a linhagem de referência *Burkholderia sacchari* LFM101, assim pelo menos três isolados apresentaram maior eficiência que a linhagem de referência (*B. sacchari* LFM101) na produção de P3HB a partir do melaço de soja hidrolisado ou não.

5.4 Análise dos carboidratos

Os sobrenadantes das culturas com melaço de soja hidrolisado e íntegro foram analisados por HPLC após 72 horas de cultivo para verificar a presença de carboidratos remanescentes. Foram utilizados padrões para os açúcares

sacarose, glicose, frutose e rafinose para análise preliminar dos sobrenadantes após cultivo.

Na Figura 6 são apresentados os resultados dos cultivos com melaço de soja íntegro e na Figura 7 com melaço de soja hidrolisado. Os cromatogramas dos diferentes cultivos ficaram parecidos, por isso são apresentados dois cromatogramas modelos que descrevem como foi o perfil dos açúcares após o cultivo. Cada um dos cromatogramas modelo representa um grupo de isolados que obtiveram resultados muito semelhantes. Foram utilizados como controle, meios de cultura não inoculados, mas incubados da mesma forma que as diferentes linhagens.

Os cromatogramas dos controles dos ensaios com melaço de soja hidrolisado e com o melaço íntegro podem ser vistos na Figura 4 deste trabalho. O grupo controle do grupo com o melaço de soja íntegro pode ser visto no cromatograma do tempo zero de hidrólise e o controle do cultivo com melaço hidrolisado é aquele com tempo de 60 minutos de hidrólise ácida.

Os resultados para o cultivo com melaço de soja íntegro mostram que as bactérias em geral consomem praticamente toda a frutose e glicose e então o diferencial entre as linhagens é a capacidade de hidrolisar ou não a sacarose.

As linhagens LFM 101, DCL 11, SCU 31, SCU 063, SCU 066 e SCU 074 foram capazes de utilizar a sacarose disponível no melaço, isto tem relação com a maior massa seca celular e a maior concentração de PHA que estas linhagens apresentaram.

Os isolados LFM 046, DCL 07, DCL 08, SCU 29, SCU 86, ISO A, ISO B1, ISO B2, ISO C1 e ISO C2 aparentemente não foram capazes de utilizar a sacarose disponível no meio, isto justifica o fato destas bactérias terem acumulado menos PHA em comparação com o grupo que consumiu, mesmo que em pequena quantidade.

Os isolados LFM 101, SCU 31, SCU 063, SCU 066 e SCU 074 tiveram praticamente o dobro de massa seca celular em gramas por litro do que os isolados que não foram capazes de utilizar a sacarose. A única exceção foi a linhagem DCL 11 que apresentou uma massa seca celular mais baixas que as demais, aproximadamente 1,7 gramas por litro e não foi capaz de acumular PHA em quantidades expressivas não chegando nem a 5% do total de massa seca celular.

Pelo fato de não ter sido detectada variação na concentração de rafinose em nenhum dos cultivos é muito provável que este açúcar não seja consumido por nenhuma das linhagens. Além disso, diversos picos observados nos cromatogramas não puderam ser identificados por falta de padrões adequados e pela metodologia utilizada não separar bem os picos apresentados pelo cromatograma.

Figura 6 – Perfil de carboidratos detectado no sobrenadante das culturas realizadas utilizando melão de soja íntegro como fonte de carbono após 72 horas de cultivo

O cromatograma obtido para o cultivo da linhagem LFM 046 é representativo do que foi observado nos cultivos das linhagens DCL 07 e a SCU 086 e aquele obtido no cultivo da linhagem SCU 031 é representativo dos cultivos das linhagens LFM 101 DCL 11 SCU 063, SCU 066 e SCU 074.

Nos ensaios utilizando o melaço de soja hidrolisado como única fonte de carbono, pôde-se verificar um aumento na produção de PHA em quase todas as linhagens, isto provavelmente está relacionado com a maior disponibilidade de monossacarídeos como glicose, frutose e galactose originadas da quebra dos di-, tri- e tetrassacarídeos do melaço de soja.

A diferença entre os perfis dos cromatogramas das amostras de carboidratos restantes no sobrenadante após as 72h de cultivo é muito discreta. Não foi possível ver grande diferença na análise qualitativa dos perfis de açúcar das diferentes linhagens. Ao disponibilizarmos mais monossacarídeos com o processo de hidrólise ácida do melaço de soja, os tetra-, tri- e dissacarídeos do meio podem ter sido quebrados liberando monossacarídeos. Todos os isolados utilizados neste trabalho, aparentemente, são capazes de utilizar consumir monossacarídeos isto justifica o fato dos cromatogramas apresentarem perfis semelhantes.

As análises dos sobrenadantes utilizando melaço de soja hidrolisado como fonte de carbono estão apresentadas na Figura 7, como foi dito anteriormente, é possível verificar que os resultados são bastante semelhantes. Uma diferença a ser apontada é que nos sobrenadantes dos isolados LFM 046, LFM 101, DCL 07, DCL 08, DCL 11, SCU 31 ISO A, ISO B2, ISO C1 E ISO C2 foi possível detectar um pequeno pico com 18 minutos de retenção referente à glicose. Já os isolados SCU 029, SCU 063, SCU 066, SCU 074, SCU 086 e ISO B1 não apresentaram nenhuma glicose residual.

Os isolados que não consumiram totalmente a glicose apresentaram massa celular seca e acúmulo de PHA inferiores aos isolados que consumiram toda a glicose. Houve apenas duas exceções: o isolado de referência *Burkholderia sacchari* LFM 101 e o isolado SCU 031, que apesar de não terem consumido toda a glicose disponível no meio, atingiram resultados de massa seca celular total e de acúmulo de PHA muito semelhantes aos atingidos pelos isolados que não apresentaram nenhum resíduo de glicose nos sobrenadantes dos seus cultivos.

Muito provavelmente, a linhagem LFM 101 consumiu uma parte da sacarose que não foi hidrolisada. A capacidade desta linhagem de consumir este dissacarídeo é conhecida e descrita na literatura (Gomez *et al.*, 1996) isto pode significar que o isolado SCU 031 também deve ser capaz de utilizar estes

dissacarídeos e por isso também apresentou resultados altos tanto para concentração de massa seca celular quanto para o teor PHA acumulado (% da massa seca celular).

SCU 31

SCU 63

Figura 7 – Perfil de carboidrato detectado no sobrenadante de cultivos utilizando melão de soja hidrolisado com fonte de carbono após 72 horas de cultivo

As linhagens LFM 046 e 101; DCL 7, 8 e 11; ISO A, B2, C1 e C2 se assemelham ao primeiro exemplo (SCU 31) onde há um pequeno pico de glicose residual. As linhagens SCU 029, 063, 066, 074, 086 e ISO B1 se assemelham ao segundo exemplo (SCU63) onde não há glicose residual.

5.5 Análise quantitativa da hidrólise do melaço de soja

Após realizar análise da efetividade da hidrólise ácida em tempos de zero a 180 minutos foi concluído que em 60 minutos já era possível obter a quebra pelo menos da sacarose presente no melaço de soja. Após alguns aperfeiçoamentos na técnica de detecção de carboidratos com HPLC e com a aquisição de novos padrões foi possível fazer uma análise mais acurada da variação das concentrações dos açúcares ao longo do processo de hidrólise.

Utilizando a fase móvel com HClO_4 ao invés de H_2SO_4 na temperatura de 20 °C foi possível separar melhor os picos. Então, após a aquisição do padrão para estaquiose, foram feitas análises mais detalhadas da hidrólise ácida.

Foram feitas análises dos carboidratos após 0, 5, 15, 30, 45 e 60 minutos de hidrólise ácida. No melaço de soja, foram detectados alguns sacarídeos já citados na literatura como: estaquiose, rafinose, sacarose, glicose, frutose e galactose. A presença de glicerol não foi detectada apesar de ser citado como um constituinte do melaço de soja pela empresa IMCOPA (Jocélia a Silva, comunicação pessoal).

Figura 8 – Perfil de carboidratos observado após diferentes tempos de hidrólise ácida.

Como pode ser observada na Figura 7, a concentração de rafinose não se altera ao longo da hidrólise ácida. A concentração de estaquiose diminui e não é mais detectada após 5 minutos de hidrólise. A concentração de sacarose diminui rapidamente nos primeiros cinco minutos de hidrólise e depois apenas lentamente, mas nunca chega à zero. As concentrações de glicose e frutose aumentam rapidamente nos primeiros 15 minutos de hidrólise, nos 15 minutos seguintes parece ocorrer um sutil aumento da concentração desses sacarídeos que se estabiliza ou até sofre um declínio nos 30 minutos seguintes de hidrólise.

A concentração molar de glicose formada é muito semelhante à concentração molar de sacarose hidrolisada pelo menos até 30 minutos de hidrólise, sugerindo que toda glicose provem da hidrólise da sacarose.

A concentração molar de frutose formada, por outro lado, não pode ser explicada considerando apenas a hidrólise da sacarose e parte dela deve provir da hidrólise de outro sacarídeo. Provavelmente, a concentração adicional de frutose detectada provém da hidrólise da estaquiose. Entretanto, apenas um dos sacarídeos da estaquiose deve estar contribuindo para compor o pico detectado como correspondendo à frutose, com base nas concentrações molares detectadas (Figura 7).

Duas hipóteses poderiam explicar este resultado: (i) o resíduo de galactose presente na extremidade da estaquiose é hidrolisado e compõem o pico detectado como frutose, já que não se observa diferença significativa nos tempos de retenção desses dois carboidratos na análise por HPLC ou (ii) o resíduo de frutose presente na estaquiose é hidrolisado.

A primeira hipótese é descartada, pois deveria levar a um aumento na concentração molar de rafinose após cinco minutos de hidrólise, que não se observa (Figura 7).

A segunda hipótese é mais compatível, entretanto, neste caso seria formado um trissacarídeo constituído por dois resíduos de galactose e um de glicose. Entretanto, a análise por HPLC não revela picos após 30 minutos de hidrólise que não eram detectados no melaço íntegro (Figura 8). Uma possível explicação é que o novo trissacarídeo apresente o mesmo tempo de retenção que a sacarose na análise por HPLC. Neste caso, a concentração de sacarose

detectada como não hidrolisada, corresponderia ao novo constituinte que foi formado pela hidrólise da estaquiose.

Os resultados demonstram que a adoção de um tempo de hidrólise de apenas trinta minutos seria mais eficiente, pois é possível obter maior concentração de glicose e frutose em um período de tempo menor.

0 min

30 min

Figura 9 – Perfil de carboidratos observados após diferentes tempos de hidrólise do melaço soja

Os resultados obtidos até o momento indicam que, além da hidrólise da sacarose, a hidrólise ácida permite a liberação apenas de um sacarídeo da estaquiose e não tem qualquer efeito sobre a rafinose. Assim, foi decidido utilizar o melaço íntegro para cultivo em biorreator.

Uma alternativa para o melaço de soja seria fazer uma hidrólise enzimática com enzimas apropriadas para quebrar seus tetra tri e dissacarídeos. Em um trabalho feito em 2006, Falkoski e colaboradores fizeram diversos experimentos de hidrólise enzimática utilizando farinha desengordurada de soja e melaço de soja. Nesse trabalho, eles purificaram enzimas α -Galactosidase de três organismos distintos (Soja [semente], *Aspergillus terreus* e *Penicillium griseoroseum*) e conseguiram resultados bastante significativos na hidrólise de estaquiose, rafinose e sacarose. Os ensaios de hidrólise enzimática mostraram que, após 4 horas de hidrólise, grande parte da rafinose e estaquiose já havia sido hidrolisada pelas enzimas α -Galactosidase da soja e de *P. griseoroseum* e a enzima de *Aspergillus terreus* foi capaz de hidrolisar 100% da estaquiose e da rafinose.

Possivelmente, ao utilizar o melaço de soja hidrolisado enzimaticamente como fonte de carbono para produzir produtos de interesse comercial como PHA, seria possível utilizar mais eficientemente a fonte de carbono, permitindo atingir maiores concentrações de produto final.

5.6 Análise das sequências de DNA

A análise de sequências de 16S rRNA é utilizada amplamente com o fim de explicar as afinidades taxonômicas de diversos tipos de taxa, é uma ferramenta extremamente útil e rápida para primeira investigação de onde está enquadrado na árvore da vida o organismo em estudo. O 16S rRNA possui regiões conservadas, o que facilita o alinhamento das sequências, assim como também contribui para diferenciar o organismo em estudo de outros grupos filogenéticos.(Baker et al., 2003; Prosser, 2002).

Com o objetivo de avaliar a similaridade do grupo taxonômico dos isolados SCU 74, SCU 66, SCU 63 e SCU 31, por serem os isolados que mais

produziram P3HB a partir do melaço de soja, foram analisadas as sequências dos genes do 16S rRNA. Para que o sequenciamento fosse feito, o gene que codifica o RNA ribossomal 16S foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos 27F e 1401R. Após serem amplificados, os fragmentos foram encaminhados para o sequenciamento com quatro oligonucleotídeos (27F, 782R, 926F e 1401R) no Centro de Estudos do Genoma Humano – USP.

Posteriormente gerada uma sequência consenso para cada um dos isolados a partir dos resultados do sequenciamento com o programa MAFFT. No Anexo B são apresentadas as sequências consenso de cada um dos isolados estudados.

As sequências consenso foram analisadas pela ferramenta BLASTN para a busca de sequências semelhantes na base de dados do GenBank localizada no National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). A busca foi realizada utilizando a sequência de cada uma das linhagens SCU 031, SCU 063, SCU 066 e SCU 074 e o 16S rRNA de todos os isolados apresentou a mais alta identidade com o mesmo gene de bactérias do gênero *Burkholderia* sp.

Sendo assim, as duas bactérias com maior grau de identidade como cada um dos isolados foram utilizadas para construir a árvore filogenética e estão listadas na Tabela 15.

Tabela 15 – Maiores identidades encontradas na base de dados GenBank com relação ao 16S rRNA dos isolados SCU 31, SCU 63, SCU 66, SCU 74.

Linhagem	Grau de identidade	Abreviação	Isolado utilizado no Blastn
<i>Burkholderia</i> sp. MAC25	99%	<i>B. sp. MAC25</i>	SCU 31, 63, 66
<i>Burkholderia stabilis</i> strain	99%	<i>B. stabilis</i>	SCU 74
<i>Burkholderia</i> sp. LLH-Slr-10 16S	99%	<i>B. sp. LLH</i>	SCU 74
<i>Burkholderia glumae</i> PG1	98%	<i>B. glumae</i>	SCU 66
<i>Burkholderia cepacia</i> NBRC 3739	99%	<i>B. cepacia</i>	SCU 31
<i>Burkholderia gladioli</i> strain UASWS1221	98%	<i>B. gladioli</i>	SCU 63

Tabela 16 – Linhagens de *Burkholderia* selecionadas para a construção da árvore filogenética. *Ralstonia eutropha* utilizada para enraizar a árvore.

Outras linhagens utilizadas na construção da árvore filogenética
<i>Burkholderia seminalis</i> G4
<i>Burkholderia</i> sp. MAC 015
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4
<i>Burkholderia ambifaria</i> MC 40-6
<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315
<i>Burkholderia multivorans</i> DDS
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400
<i>Burkholderia</i> sp. S3 MAC 011
<i>Burkholderia</i> sp. S3 TSA 016
<i>Ralstonia eutropha</i>

A árvore filogenética foi construída com as sequências do 16S rRNA de cepas de *Burkholderia* sp. listadas na Tabela 15. Além dessas, outras sequências do 16S rRNA de outras linhagens de *Burkholderia* (Tabela 15) que apresentaram ainda um alto grau de identidade com as sequências dos isolados e um grupo externo (*Ralstonia eutropha*) também foram utilizadas. A árvore foi construída com o programa TNT com os alinhamentos das sequências dos isolados SCU 74, SCU 66, SCU 63 e SCU 31 e de outras cepas cujas sequências foram recuperadas a partir de dados do GenBank.

Figura 10 – Árvore filogenética do 16S rRNA dos isolados SCU 031, SCU 063, SCU 066 e SCU 074

Analisando a árvore filogenética é possível concluir que os isolados muito provavelmente pertencem ao gênero *Burkholderia*. Algumas das cepas relacionadas com os isolados deste trabalho também não são identificadas no nível de espécie, e dentre elas, as cepas *Burkholderia* sp. MAC 25, 011 e 016 também são isolados de área de Mata Atlântica. Esta identificação dos isolados dentro gênero *Burkholderia* mostra que ainda devem existir muitas espécies de interesse biotecnológico que podem ser descobertas em biomas brasileiros.

As bactérias SCU 066 e SCU 031 ficaram separadas das outras linhagens utilizadas para construção da árvore filogenética. Isto pode ser positivo, pois muitas das bactérias que se encontram na árvore filogenética são patogênicas (Vermis, 2003). A identificação da linhagem SCU 031 no gênero *Burkholderia* não favorece a utilização deste organismo em processos de produção em larga escala devido a grande patogenicidade das espécies deste

gênero. Apesar de muitas das espécies de *Burkholderia* serem apenas patógenos oportunistas de todas as espécies utilizadas para gerar a árvore filogenética, apresentada na Figura 9, apenas a *B. xenovorans* não causa nenhuma doença em humanos ou plantas.

Além de *B. xenovorans* não ser patogênica, esta bactéria também possui alto potencial biotecnológico. Esta linhagem é capaz de degradar diversos compostos tóxicos e poluentes tirando sua toxicidade. A *B. xenovorans* mostra que dentro do gênero *Burkholderia* podem existir bactérias não patogênicas e de interesse biotecnológico.

O gênero *Burkholderia* pertence ao filo β -proteobactérias e é composto por bacilos retos, oxidase e catalase positivos, aeróbios e que apresentam coloração de Gram negativa. Os indivíduos deste gênero são comumente encontrados no solo e em ambientes aquáticos, possuem um flagelo polar, portanto são bactérias móveis. Algumas das espécies deste gênero são patógenos de plantas e também existem espécies que são patógenos oportunistas de seres humanos principalmente de pessoas que sofrem de fibrose cística (Coenye; Vandame, 2003; Lipuma; Miller; Parke, 2002).

O gênero *burhkolderia* desperta um grande interesse biotecnológico. Na literatura são citadas diversas linhagens de *Burkholderia* capazes de produzir produtos de interesse biotecnológico. Em 1990 Ramsay e colaboradores descreveram a produção de PHA neste gênero.

A espécie *Burkholderia sacchari* foi isolada a partir de solo de canavial e avaliada como boa produtora de PHA capaz de acumular altas quantidades do polímero (Gomez et al., 1994; 1996a; 1997). Esta espécie inclusive foi utilizada neste trabalho como linhagem de referência para a produção de PHA. Em 2014, Mendonça e colaboradores avaliaram a capacidade da *Burkholderia sacchari* incorporar outros monômeros além do 3HB, usando trinta diferentes fontes de carbono como co-substrato, além da glicose. A incorporação de monômeros 3HV atingiu até 65 mol% do co polímero com 3HB quando no cultivo foi fornecido ácido valérico como co-substrato. Utilizando outro co-substrato, o ácido hexanóico, foi produzido o copolímero P3HB-co-3HHx, mostrando que *Burkholderia sacchari* não é apenas uma boa produtora de P3HB, mas também é capaz de acumular copolímeros, mostrando o potencial

biotecnológico para obtenção de diferentes copolímeros (Mendonça et al., 2014)

A versatilidade nutricional destas bactérias fornece a capacidade de assimilar uma grande variedade de fontes de carbono (Gilardi 1973; Gillis et al., 1995; Stanier et al., 1966; Yabuuchi et al., 2000) incluindo compostos incomuns como ácido azelaico e triptamina (Burbage; Sasser, 1982).

Em um estudo realizado com 142 linhagens pertencentes ao complexo *Burkholderia cepacia*, testou-se a capacidade dessas bactérias em utilizar dez fontes de carbono incomuns (ácido azelaico, L-arabinose, D-celobiose, D-fucose, penicilina G, ftalato, salicina, L-treonina, D-trealose e triptamina) (Vermis, 2003). No estudo citado, foi confirmada a versatilidade metabólica destas bactérias muitas das linhagens consumiram compostos bastante incomuns como D-fucose e ftalato entre outros.

Analisando a literatura sobre o potencial de bactérias do gênero *Burkholderia* para a produção de produtos de interesse comercial e para o consumo de diferentes fontes de carbono é favorável para este trabalho a identificação do isolado SCU 031 como uma bactéria deste gênero. Apesar de que muitas bactérias deste gênero sejam conhecidas como agentes patológicos de vegetais e animais é notável a riqueza biotecnológica destes microrganismos. Ainda não temos indícios suficientes para indicar que o isolado SCU 031 faria parte do grupo de *Burkholderias* que são patógenos oportunistas, portanto este isolado ainda poderia ser alvo de muitos trabalhos com a utilização de fontes de carbono incomuns e de resíduos industriais para a fabricação de produtos de interesse biotecnológico.

5.7 Antibiógrama

Como o isolado selecionada para a produção em biorreator (SCU 031) é um isolado bacteriano que pode apresentar algum potencial de patogenicidade, foi realizado um teste para avaliar a resistência desse microrganismo a diferentes antibióticos.

A Tabela 16 mostra o resultado do antibiógrama feito com a linhagem SCU 031. Uma vez que o isolado foi identificado como pertencendo ao gênero *Burkholderia*, que é composto por bactérias Gram negativas, no teste foram utilizados antibióticos apropriados para bactérias com este fenótipo.

Assim como foi descrito no material e métodos deste trabalho o isolado SCU 31 foi estriado em Agar Müller-Hinton e então discos contendo diversos antibióticos e em diferentes concentrações foram colocados na superfície da placa contendo a linhagem estriada e então a placa foi incubada por 24 horas a 30 °C.

Após retirar a placa da estufa, foi verificado que vários dos discos contendo antibióticos impediram o crescimento do isolado SCU 31 ao seu redor. Em volta de alguns dos discos, era possível ver um halo no qual não havia crescimento bacteriano (Figura 11).

Figura 11 – Halos de ausência de crescimento da linhagem SCU 031 utilizando discos com diferentes antibióticos.

Foram medidos os diâmetros dos halos que se formaram na placa utilizando-se um paquímetro e foram analisados os resultados de acordo com o Manual Clinical and Laboratorial Standards Institute (CLSI) de 2011. Assim, o isolado SCU 31 foi classificado como resistente, intermediário ou sensível aos antibióticos.

Tabela 17 – Antibiógrama do isolado SCU 31.

Antibiótico	Código	Concentração	Halo (mm)	Resultado
Ertapenem	ETP	10 µg	14	Resistente
Gentamicina	GEN	10 µg	12	Resistente
Sulfametoxazol e Trimetoprim	SUT	25 µg	28	Sensível
Pefloxacina	PEF	5 µg	14	Resistente
Ciprofloxacina	CIP	5 µg	22	Sensível
Netilmicina	NET	30 µg	14	Intermediário
Cefotaxima	CTX	30 µg	8	Resistente
Tobramicina	TOB	10 µg	16	Sensível
Cloranfenicol	CLO	30 µg	20	Sensível
Imipenem	IPM	10 µg	12	Resistente
Norfloxacina	NOR	10 µg	18	Sensível
Aztreonam	ATM	30 µg	14	Resistente
Tetraciclina	TET	30 µg	12	Resistente
Doxiciclina	DOX	30 µg	26	Sensível
Ofloxacina	OFX	5 µg	8	Resistente
Estreptomicina	EST	10 µg	6	Resistente
Rifampicina	RIF	5 µg	16	Intermediário
Levofloxacina	LVX	5 µg	16	Intermediário
Ceftriaxona	CRO	30 µg	12	Resistente
Ceftazidima	CAZ	30 µg	26	Sensível
Tazobactam + Piperacilina	PPT	100/10 µg	34	Sensível
Amicacina	AMI	30 µg	24	Sensível
Cefepime	CPM	30 µg	20	Sensível

Dentro do gênero *Burkholderia* existem muitas linhagens patogênicas tanto de humanos quanto de plantas e outros animais. O complexo *Burkholderia cepacia* causa infecções de pulmão que podem ser letais para indivíduos com fibrose cística ou em pacientes em estado crítico. O tratamento de infecções causadas por estas bactérias é complicado, pois estas bactérias possuem diversas resistências intrínsecas a agentes microbianos.

Em um estudo realizado em 2002, Nzula e colaboradores testaram a resistência de 65 linhagens do complexo *Burkholderia cepacia* aos antibióticos ceftazidima, cloranfenicol, ciprofloxacina, tobramicina, tetraciclina, trimetoprim entre outros e apesar de todas apresentarem resistência a alguns, ou vários destes antibióticos havia muita variação entre o padrão de resistência. Em

especial as linhagens isoladas do meio ambiente eram mais sensíveis a, por exemplo, cloranfenicol do que os isolados clínicos de pacientes. Gerando uma evidência de que linhagens ambientais do gênero *Burkholderia* apresentam menor resistência aos agentes antimicrobianos. Neste trabalho, por exemplo, utilizamos isolados de solo e os resultados obtidos no antibiograma corroboram com a informação encontrada por Nzula et al. (2002). A linhagem SCU 031 apresentou sensibilidade a ceftazidima, cloranfenicol, ciprofloxacina, tobramicina, e trimetoprim mostrando que não é uma linhagem tão resistente quanto às linhagens isoladas de pacientes. No entanto, a linhagem SCU 031 ainda apresenta resistência à tetraciclina mostrando certa semelhança com o padrão de resistência de outras *Burkholderia*.

É amplamente encontrada na literatura informações da heterogeneidade do padrão de resistência aos antibióticos entre as bactérias do gênero *Burkholderia*. No caso da linhagem SCU 031 vemos algumas particularidades Vermis e colaboradores encontraram alta sensibilidade entre as linhagens do complexo *Burkholderia* a imipinem e rifampicina, porém a SCU 031 é resistente a imipinem e tem leve sensibilidade a rifampicina. Em contrapartida, mais de 60% das bactérias testada por Vermis e colaboradores eram resistentes a cloranfenicol e a linhagem SCU 031 apresentou sensibilidade a este antibiótico (Vermis et al., 2003).

Analisando o perfil de resistência a antibióticos do isolado SCU 031 observamos que esta linhagem apresenta resistência a dez dos antibióticos testados o que já é problemático para uma bactéria que pode ser um patógeno oportunista, isto dificultaria o uso desta linhagem para produções em larga escala. No entanto, a linhagem apresenta sensibilidade a diversos antibióticos que são ineficientes em bactérias patogênicas do complexo *Burkholderia cepacia*, o que torna possível o controle de possíveis infecções causadas por este isolado.

5.8 Produção de PHA a partir de melaço de soja em Biorreator

A linhagem SCU 31 foi o isolado que mais se destacou pela produção de PHA utilizando melaço de soja. Esta linhagem atingiu um acúmulo de P3HB em cultivos em agitador rotativo correspondendo a 32% da massa seca celular quando o melaço hidrolisado foi suprido como única fonte de carbono. Utilizando o melaço de soja hidrolisado, o desempenho do isolado SCU 31 não foi significativamente diferente dos isolados SCU 63 e SCU 66 (Tabela 13). Quando melaço de soja íntegro foi utilizado para produção de P3HB, a linhagem SCU 31 atingiu os maiores valores de massa seca celular total contendo cerca de 25% de P3HB. Estes valores foram levemente superiores àqueles atingidos pelo isolado SCU 63, mas significativamente maiores que o desempenho de outros isolados. Desta forma, a linhagem SCU 31 foi selecionada para a produção de P3HB em cultivo realizado em biorreator com o objetivo principal de verificar sua capacidade de utilização de diferentes carboidratos presentes no melaço de soja íntegro (sem ser hidrolisado).

No cultivo em biorreator (Figura 11), observou-se uma fase exponencial de crescimento de 2 a 8 horas de cultivo, com velocidade específica de crescimento de $0,30 \text{ h}^{-1}$ (Figura 12). De 0 a 2 horas de cultivo, se observa uma fase de aceleração da velocidade específica de crescimento, mas não propriamente uma fase lag. De 10 a 14-16 horas de cultivo ainda se observa um aumento da biomassa residual, mas não com crescimento exponencial, indicando que nesse intervalo de tempo o nutriente limitante já se encontra em concentrações que impedem o máximo crescimento celular. Após 14-16 horas de crescimento, observa-se a fase estacionária crescimento celular.

Durante as fases de aceleração do crescimento e exponencial (0-8 horas), pequena quantidade de P3HB foi produzida. A síntese de P3HB aumenta a partir de 8 horas de cultivo, indicando que, quando o nutriente limitante já impede o máximo crescimento, mas não foi completamente exaurido, o carbono consumido em excesso já é dirigido eficientemente para a síntese de P3HB. A velocidade de produção de P3HB entre 10 e 22 horas é de aproximadamente 250 mg/L.h . Considerando que entre 14-16 e 22 horas de cultivo a biomassa residual é constante e corresponde a aproximadamente 6,3

g/L, nesse intervalo temos uma velocidade específica de produção de P3HB correspondendo a aproximadamente 40 mg/g.h ($0,04 \text{ h}^{-1}$). Após 22-24 horas de cultivo, P3HB deixa de ser produzido e são atingidos os maiores valores de massa seca celular total, residual e P3HB, correspondendo, respectivamente, a aproximadamente 9,5; 6,3 e 3,2 g/L. O teor de P3HB acumulado ao final do cultivo corresponde, portanto, a 33,6% da massa seca celular.

As velocidades específicas de crescimento celular e de produção de P3HB atingidas pelo isolado SCU 31 são compatíveis para o desenvolvimento de processo de produção de PHA a partir de resíduos (Silva et al., 2014).

Figura 12 – Perfil cinético de produção de biomassa celular (total e residual) e P3HB pela linhagem SCU 31 cultivada em biorreator

PHB (polihidrobutilato), X (biomassa total) e Xr (massa celular total) – eixo y gramas/litros – eixo x horas

Figura 13 – Logaritmo neperiano de X_r (massa celular total) com linha de tendência do período de crescimento exponencial do cultivo. Equação da reta com coeficiente angular(0,3048) indicando a velocidade específica máxima.

Figura 14 – Perfil cinético da concentração molar de carboidratos detectados no sobrenadante do cultivo da linhagem SCU31 em biorreator suprida com melaço de soja com única fonte de carbono. As setas indicam o momento de alimentação da solução de melaço de soja.

A Figura 13 mostra o perfil cinético da concentração de carboidratos detectado no meio de cultura ao longo do cultivo em biorreator. Antes de começar a analisar e discutir esta Figura é preciso lembrar a composição dos

tetra-, tri-, di- e monossacarídeos que compõem o melaço de soja. A estaquiose é o tetrassacarídeo deste resíduo e é formada por duas galactoses e uma sacarose, o trissacarídeo rafinose possui apenas uma galactose ligada a uma sacarose, por sua vez a sacarose é composta por glicose e frutose. As estruturas da estaquiose, rafinose e sacarose foram apresentadas na Figura 1.

O perfil de concentrações de rafinose (Figura 13A) indica que esta não é consumida pela linhagem SCU 31, pois não se observa alteração na sua concentração nas primeiras 6 horas de cultivo. Além disso, claramente se observa um aumento na sua concentração com a alimentação da solução contendo melaço de soja ao longo do cultivo. Uma análise cuidadosa da variação na concentração de rafinose revela que a alimentação não é suficiente para explicar todo o aumento da sua concentração observado. A concentração de estaquiose, por outro lado, é diminuída ao longo do cultivo. Mesmo observando-se um aumento na concentração de estaquiose detectada após as alimentações de melaço de soja após 8 e 12 horas de cultivo, este aumento é inferior ao valor esperado com a alimentação, sendo também compatíveis com a ação da linhagem SCU 31 sobre a estaquiose. O aumento na concentração da rafinose, além das alimentações, é totalmente explicado por parte da redução na concentração de estaquiose (Figura 13A). Cerca de 40% da redução da concentração de estaquiose explicaria o aumento da concentração de rafinose além das alimentações. Assim, pelo menos parte da estaquiose estaria sofrendo a hidrólise, liberando uma galactose e uma rafinose. Este resultado é muito interessante e poderia ser um tópico para estudos futuros, na literatura é citado que para hidrolisar totalmente a estaquiose é necessária apenas a enzima α -galactosidase (Falkoski, 2006). Isto indica que a linhagem SCU 031 provavelmente utilizou outra enzima para liberar a galactose terminal da estaquiose.

Os outros 60% de redução na concentração de estaquiose podem ser decorrentes de sua completa hidrólise, liberando galactose, glicose e frutose; ou então sofrer hidrólise liberando frutose e um trissacarídeo contendo dois resíduos de galactose e um de glicose.

A concentração de sacarose diminui nas primeiras 8 horas de cultivo (Figura 13B), demonstrando claramente que a linhagem SCU 31 é capaz de hidrolisar este dissacarídeo. A partir de 10 horas de cultivo, a concentração de

sacarose aumenta (Figura 13B), entretanto, o aumento da concentração seria maior que o observado considerando o total de melaço de soja alimentado no cultivo, indicando que a sacarose continuou sendo consumida mesmo neste período que se observa aumento de sua concentração.

Ao final do cultivo, ainda se observa uma alta concentração de sacarose, Em parte, o aumento na concentração de sacarose pode ser decorrente de algum sacarídeo que apresenta o mesmo tempo de retenção que a sacarose, como por exemplo, aquele contendo dois resíduos de galactose e um de glicose. Neste caso, este trissacarídeo não seria hidrolisado pela linhagem SCU 31.

Glicose e frutose/galactose também são claramente consumidas pela linhagem SCU 031 (Figura 13B). A glicose foi completamente consumida. Já frutose/galactose não foram totalmente consumidas. Na literatura é descrito que bactérias do gênero *Burkholderia* são capazes de consumir diferentes tipos de carboidratos, dentre eles, galactose e frutose (Alisi et al. 2005; Vermis et al., 2003; KEEG traduzido do inglês: Enciclopédia de genes e genomas de Quioto -<http://www.kegg.jp/kegg/atlas/?01100>). Portanto, a sobra de galactose ou frutose apontada pelos resultados obtidos através da análise dos sobrenadantes do cultivo pode ser referente a algum tipo de subproduto da degradação da estaquiose.

O consumo de carboidratos pelo isolado SCU 31 parou após 22-24 horas de cultivo, momento em que também se observou o fim da produção de P3HB. A concentração total de carboidratos (cerca de 15-20 g/L) não parece ser suficiente para promover uma inibição do acúmulo de P3HB. Assim, existem duas possibilidades de explicar o final do acúmulo de P3HB: (i) atingiu-se a capacidade máxima da linhagem SCU 31, que seria muito pequena, pois correspondeu a menos de 35% da massa seca celular; (ii) os carboidratos detectados não são de fato consumidos pela linhagem SCU 31.

Os resultados obtidos até o momento indicam que estudos adicionais serão de grande relevância para o desenvolvimento de tecnologia de produção de P3HB a partir de melaço de soja. O uso de enzimas para hidrolisar os tetra- e trissacarídeos poderão representar uma estratégia promissora. Ampliar a capacidade de degradação dos tetra e trissacarídeos por linhagens bacterianas promissoras representará outra estratégia relevante. Estudos adicionais serão

necessários para avaliar todo o potencial enzimático presente na linhagem SCU 31 em relação à capacidade de utilizar carboidratos.

6 Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- O tratamento ácido do melaço de soja permite hidrolisar a sacarose em glicose e frutose. Rafinose não sofre qualquer ação neste processo de hidrólise. Estaquiose é hidrolisada, mas provavelmente apenas frutose e um trissacarídeo, contendo dois resíduos de galactose e um de glicose, são gerados.
- As bactérias mais eficientes na conversão de melaço de soja íntegro ou hidrolisado foram identificadas como pertencendo ao gênero *Burkholderia*.
- A eficiência de produção de PHA aumenta com a hidrólise do melaço de soja, como consequência da disponibilização de maiores quantidades de carboidratos assimiláveis pelas bactérias.
- O isolado mais promissor para produção de PHA a partir de hidrolisado de soja apresentou um perfil de resistência/sensibilidade a antibióticos compatível com bactérias do gênero *Burkholderia* de origem ambiental.
- Cultivo em biorreator revelou que o isolado SCU 31 é capaz de utilizar sacarose, glicose e frutose para produção de P3HB. Rafinose não foi utilizada por esta linhagem, mas a estaquiose foi parcialmente hidrolisada.
- Nos cultivos em biorreator, atingiu-se velocidades específicas de crescimento e produção de P3HB de $0,30 \text{ h}^{-1}$ e $0,04 \text{ h}^{-1}$, respectivamente, compatíveis para o desenvolvimento de bons processos de produção de PHA a partir de resíduos.

Referências *

- Abe H, Doi Y, Fukushima T, Eya H. Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp 61-3. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1994;16(3):115-9.
- Alisi C, Lasinio GJ, Dalmastri C, Sprocati AR, Tabacchioni S, Bevivino A, Chiarin L. Metabolic profiling of *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia ambifaria*, and *Burkholderia pyrrocinia* isolates from maize rhizosphere. *Microb. Ecol.*, 2005;50:385-95.
- Alonso DM, Wettstein SG, Dumesic JA. Gamma-valerolactone, a sustainable platform molecule derived from lignocellulosic biomass. *Green Chemistry*, 2013;15:584-95.
- Amirul AA, Ahmad RMY, Sudesh K, Azizan MNM, Majid MIA. Isolation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) producer from Malaysian environment using γ -butyrolactone as carbon source. *World J. Microb. Biot.*, 2009;25(7):1199-206.
- Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiol. Rev.*, 1990;54:450-72.
- Andrebreben B, Taylor N, Steinbüchel A. Poly(3-hydroxypropionate): A promising alternative to fossil fuel-based materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014;80(21):6574-82.
- Aouf C, Nouailhas H, Fache M, Caillol S, Boutevin B, Fulcrand H. Multi-functionalization of gallic acid. Synthesis of a novel biobased epoxy resin. *Eur. Polym. J.*, 2013;49:1185-95.
- Baker G, Smith J, Cowan D. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Micro. Meth.*, 2003;55(3):541-55.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. clin. Pathol.* 1
- Beckman, W., Lessie TG. Response of *Pseudomonas cepacia* to β -lactam antibiotics: utilization of penicillin G as the sole carbon source. *Journal of Bacteriology*, 1979;140:1126-8.
- Bonatto D, Matias F, Lisboa MP, Bogdawa HM, Henriques JAP. Production of short side chain-poly(hydroxyalkanoate) by a newly isolated *Ralstonia picketti* strain. *World Journal of Microbiology*, 2004;20(4):395-403.
- Brandl, H., R. A. Gross, R. W. Lenz & R. C. Fuller. *Pseudomonas oleovorans* as a source of Poly(β -Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Disponível em: <http://www.icmje.org> [2011 jul 15].

Biodegradable Polyesters. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988;54:1977-82.

Brandl H, Gross RA, Lenz RW. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible and biodegradable polyesters. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 1990;41:77-93.

Brämer CO, Silva LF, Gomez JCG, Priefert H, Steinbüchel A. Identification of the 2-methyleitrate pathway involved in the catabolism of propionate in the polyhydroxyalkanoate-producing strain *Burkholderia sacchari* IPT101 and analysis of a mutant accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate content. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002;68(1):271-9.

Bruijninx PCA, Weckhuysen BM. Shale Gas Revolution: An Opportunity for the Production of Biobased Chemicals. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2013;52(46):11980-7.

Burbage, DA., Sasser, M. A medium selective for *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology*, 1982;76:706.

Caspeta L, Buijs NAA, Nielsen J. The role of biofuels in the future energy supply. *Energy & Environmental Science*, 2013;6:1077-82.

Climent MJ, Corma A, Iborra S, Conversion of biomass platform molecules into fuel additives and liquid hydrocarbon fuels. *Green Chemistry*, 2014 v. 16, p. 516–547.

Chen JY, Song G, Chen CQ. A lower specificity PhaC2 synthase from *Pseudomonas stutzeri* catalyses the production of copolyesters consisting of short-chain-length and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2006;89:157-67.

Coenye T, Vandame P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol.*, 2003;5(9):719-29.

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

Doi Y, Kanesawa Y, Kunioka M, Saito T. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules*, 1990;23(1):26-31.

Doi Y. Microbial synthesis, physical properties and biodegradability of polyhydroxyalkanoates. *Macromolecular Symposia*, 1995;98(1):585-599.

Dusselier M, Van Wouwe P, Dewaele A, Makshina E, Sels BF. Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis. *Energy & Environmental Science*, 2013; 6:1415-42.

Dusselier M, Sels B. Selective catalysis for cellulose conversion to lactic acid and other α -hydroxy acids. In Nicholas KM, editor. *Selective Catalysis for Renewable Feedstocks and Chemicals*. Springer International Publishing; 2014. ch. 540, vol. 353, p. 85-125.

Esposito D, Antonietti M. Redefining biorefinery: The search for unconventional building blocks for material. *Chem soc rev.*, 2015;44;5821-35.

Falkoski DL, Guimarães VM, Callegari CM, Reis AP, Barros EG, Rezende ST. Processing of Soybean Products by Semipurified Plant and Microbial α -Galactosidases. *J. Agric. Food Chem.*, 2006;54:10184-90

Fukui T, Doi Y. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *Journal of Bacteriology*, 1997;179:4821-30.

Fukui T, Doi Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998;49:333-6.

Full TD, Jung DO, Madigan MT. Production of poly- β -hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. *Applied Microbiology*, 2006; 43:377-84.

Galbe M, Zacchi G. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002;59:618-28

Gilardi, GL. Nonfermentative gram-negative bacteria encountered in clinical specimens. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1973; 39:229-42.

Gillis M, Van VanT, Bardin R, Goor M, Hebbar P, Willems A, Segers P, Kersters K. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1995;45:274-89.

Giribet G. Efficient tree searches with Available Algorithms. *Evolutionary Bioinformatics*, 2007;3:341-56.

Goloboff P, Farris JF, Nixon K. TNT a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 2008;24:1-14.

Gomez JGC. Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos. [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)] Instituto de pesquisa e tecnologia, Universidade de São Paulo, 1994.

Gomez JGC, Bueno Netto CL. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. *Revista Brasileira de Engenharia Química*, 1997;17:24-9.

Gomez JGC, Rodrigues MFA, Alli RCP, Torres BB, Bueno Netto CL, Oliveira MS, As Silva LF. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Applied microbiology and biotechnology*, 1996;45;6:785-791

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. [dissertação (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de pesquisa e tecnologia, Universidade de São Paulo; 2000

Gomez JGC, Silva LF, Taciro MK, Rodrigues MFA, Silva ES, Bonomi A, Simões DA, Bueno Netto CL, Pradella JGC. Production of biodegradable polymer from sugar cane in Brazil. In: 12th World Clean Air and Environment Congress and Exhibition; 2001; Seoul. Seoul: World Clean Air and Environment; 2001 p. 32.

Gomez JGC, Bueno Netto CL. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. *Revista Brasileira de Engenharia Química*, 1997;17:24-9.

Holmes PA. Applications of PHB – microbial produced biodegradable thermoplastic. *Physics Technology*, 1985;16:32-6.

Hossain KMZ, Hasan MS, Boyd D, Rudd CD, Ahmed I, Thielemans W. Effect of cellulose nanowhiskers on surface morphology, mechanical properties, and cell adhesion of melt-drawn polylactic acid fibers. *Biomacromolecules*, 2014;15: 1498-1506.

Ibrahim MHA, Steinbüchel A. *Zobellella dentrificans* strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol, *Journal of Applied Microbiology*, 2010;108(1):214-225.

Kahar P, Tsuge T, Taguchi K, Doi Y. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability*, 2003;83:79-86.

Kamm B, Kamm M. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004;64:137-45.

Kato M, Bao HJ, Kang CK, Fukui T, Doi Y. Production of a novel copolyester of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas* sp. 61-3 from sugars. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996a;45:363-70.

Kato M, Fukui T, Doi Y. Biosynthesis of polyester blends by *Pseudomonas* sp. 61-3 from alkanolic acids. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1996b;69:515-20.

Katoh K, Standley DM. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 2013;30(4):771–80.

Keenan TM, Tanenbaum SW, Stipanovic AJ, Nakas JP. Production and characterization of poly--hydroxyalkanoate copolymers from *B. cepacia* utilizing xylose and levulinic acid. *Biotechnol. Prog.*, 2004;20:1697-1704.

Kim DY, Kim HW, Chung MG, Rhee YH. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial médium-chain-lenght polyhydroxyalkanoates. *J. Microbiol.*, 2007;45(2):87-97.

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. In: Doi Y, Fukuda K, editors. *Biodegradable Plastics and Polymers*. Amsterdam: Elsevier; 1994 p. 410-6.

Lageveen RG, Huisman GW, Preusting H, Ketelaar P, Eqqink 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-Hydroxyalkanoates. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988;54;12;2924-2932.

Liebergesell M, Steinbüchel A. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyric acid) biosynthesis genes of *Thiocystis violácea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993a;38:493-501.

Liebergesell M, Mayer F, Steinbüchel A. Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxtgenic phototrophic bacteria reveal synthesis of a polyester exhibiting na unusual composition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993b;40:292-300.

Loo CY, Lee WH, Tsuge T, Doi Y, Sudesh K. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant. *Biotechnology Letters*, 2005;27:1405-10.

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

Lu Q, Han J, Zhou L, Xiang H. Genetic and biochemical characterization of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthase in *Haloferax mediterranei*. *Journal of Bacteriology*, 2008;90(12):4173-80.

Macedo IC, Seabra JEA, Silva JEAR. Green houses gases emissions in production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. *Biomass & Bioenergy*, 2008;32:582-95.

Mai C, Kues U, Mililz H. Biotechnology in the wood industry. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2004;63:477-94.

Martindale, W. Carbon, food and fuel security – will biotechnology solve this irreconcilable trinity? *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2010; 27(1):115-34.

Matias F, Lisbôa MP, Bonatto D, Henriques JAP. Analysis and characterization of new PHA-producing actinomycetes strains from different types of soils. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia; 2001; Foz do Iguaçu. Foz do Iguaçu: Congresso Brasileiro de Microbiologia; 2001. p. 251.

Matias F, Bonatto D, Padilla G, Rodrigues MFA, Henriques JAP. Polyhydroxyalkanoates production by actinobacteria isolated from soil, 2009 *Canadian Journal of Microbiology*;55:790-800.

Matsuda TS. Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

Matsumoto K, Takase K, Aoki E, Doi Y, Tagushi S. Synergistic Effects of Glu130asp substitution in the type II polyhydroxyalkanoate (PHA) sintase: Enhancement of PHA production and alteration of polymer molecular weight, 2005 *Biomacromolecules*. v. 6, n. 1, p. 99-104.

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.

Meier MAR. *Green Polymerization Methods*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011:9-27.

Mendonça TT. Avaliação do potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) P(3HB-co-3HHx). [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

Mendonça TT, Gomez JG, Buffoni E, Sánchez RJ, Schripsema J, Lopez MCG, Silva L. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce poly(hydroxyalkanoates). *Journal of Applied Microbiology*, 2014;116:815-29.

Miller SC, Lipuma JJ, Parke JL. Culture-based and on-growth-dependent detection of the *Burkholderia cepacia* complex in soil environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002;68(8):3750-8.

Montovani D. Estudo da recuperação e hidrólise de isoflavonoides e carboidratos obtidos a partir do melão de soja. [dissertação (Doutorado em Engenharia de alimentos)] Curitiba : Setor de tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2013

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard Fifth Edition. M7-A5 20(2). Wayne, PA: NCCLS; 2001a.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Eleventh Informational Supplement. M100-S11 21(1). Wayne, PA: NCCLS; 2001b.

Nomura CT, Taguchi K, Gan ZH, Kuwabara K, Tanaka T, Takase K, Doi Y. Expression of 3-ketoacyl-acyl Carrier protein reductase (fabG) genes enhances production of polyhydroxyalkanoate copolymer from glucose in recombinant *Escherichia coli* JM109. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005;71:4297-4306.

Nonato RV, Mantelatto PE, Rossell CEV. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001;57(1-2): 1-5.

Normi YM, Hiraish T, Taguchi S, Sudesh K, Najimudin N, Doi Y. Site-directed saturation mutagenesis at residue F420 and recombination with another beneficial mutation of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase. *Biotechnology Letters*, 2005a;27:705-12.

Normi YM, Hiraish 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*, 2005b;5:197-206.

Nzula S., Vandamme P. and Govan, JRW. Influence of taxonomic status on the in vitro antimicrobial susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2002;50:265-9.

Park SJ, Lee SY. Systems biological approach for the production of various polyhydroxyalkanoates by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Macromolecular Symposia*, 2005;224:1-9.

Preusting JCG. *Pseudomonas oleovorans* as a source of bioplastics: production and characterization of poly(3-hydroxyalkanoates). Gröningen; 1992. 101 p.

Pitt TL, Kaufmann ME, Patel PS, Bengtson LCA, Gaskin S, Livermore DM. Type characterisation and antibiotic susceptibility of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland. *Journal of Medical Microbiology*, 1996;44:203-210.

Prosser, J. Molecular and functional diversity in soil microorganisms. *Plant and Soil*, 2002;244(2):9-17.

Ramsay BA, Juliana A, Cooper DG. Production of Poly-3-Hydroxyalkanoic Acid by *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989;55:584-9.

Reddy CSK, Ghai R, Rashmi, Kalia VC. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour. Technol.*, 2003; 87:137-46.

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

Rehm BHA. Polyester synthases: natural catalysis for plastics. *Biochem. J.*, 2003;376:15-33.

Riis V, Mai W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *J. Chromatogr.*, 1988;445:285-9.

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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995;43:880-6.

Rossel CEV, Mantelatto PE, Agnelli JAM, Nascimento J. Sugarbased biorefinery – Technology for integrated Production of poly(3-hydroxybutyrate), sugar and ethanol. In: Kamm B, Kamm M, Gruber PR. *Biorefineries – Industrial Processes and Products. Status Quo and Future Direction*. Weinheim, Alemanha: Wiley-VCH; 2006. vol. 1, p. 209-26.

Shen L, Worrel E, Patel M. Present and future development in plastics from biomass. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 2010;4:25-40.

Silva, L. et al. Freeze-drying of industrial yeast strains: influence of growth conditions, cooling rates and suspending media on the viability of recovered cells. *Rev. Microbiol*, 1992;23(2):117-22.

Silva, LF, et al. Processo de produção de PHB e seu copolímero PHB-*co*-HV a partir de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar: Patente, PI0207356-0 A2 depositado no INPI em 24/09/2002, sob nº 004350 2002.

Silva LF, Taciro MK, Michelin L, Ramos ME, Carter, JM, Pradella JGC, GOMEZ, JGC. Process development of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugar cane bagasse hydrolysate, 2004 *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*;31:245-54.

Silva LF, Rocha RCS, Taciro MK, Pradella JGC, GOMEZ JGC. Produção biotecnológica de polihidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Química Nova*, 2007;30(7):1732-43.

Silva LF, Rocha RCS, Taciro, Raicher G, Piccoli RAM, Mendonça TT, Lopes MSG, Gomez JGC. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. *International Journal of biological macromolecules*, 2014;71:2-7

Silva LF, Gomez JGC, Oliveira MS, Torres BB. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia sp.*. Journal of biotechnology, 2000;76;2;165-174

Simon J, Olsson JV, Kim H, Tenney IF, Waymouth RM. Semicrystalline Dihydroxyacetone Copolymers Derived from Glycerol. Macromolecules, 2012;45:9275-81.

Siqueira PF, Karp SG, Igashiyama, AH, Wietzikoski FG, Medeiros ABP; Soccol, CR. Production of Bio-ethanol from Soybean Molasses by *Saccharomyces cerevisiae*: Process Scale-up. In: Anais Sinaferm. Curitiba: GRAFFIT, 2007. 1 CD-ROM. [XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos; 2007; Curitiba].

Siqueira PF, Karp SG, Carvalho JC, Rodrigues-León JA, Tholozan, JL, Singhanian RR, Pandey A, Soccol CR. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. Bioresource Technology, 2008;99:8156-63.

Solaiman DKY, Ashby RD, Foglia TA, Marmer WN. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoate). Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006;91;783-789.

Spangler SK, Visalli MA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Susceptibilities of non-*Pseudomonas aeruginosa* gram-negative nonfermentative rods to ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, D-ofloxacin, sparfloxacin, ceftazidime, piperacillin, piperacillin/tazobactam, trimethoprim-sulphamethoxazole, and imipenem. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996;40:772-5.

Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M. The aerobic Pseudomonads: a taxonomic study. Journal of General Microbiology, 1996;43:159-271.

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

Steinbüchel A, Valentim HE. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. FEMS Microbiol Lett, 1995;128:219-228.

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

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

Taciro, MK. Processo contínuo de produção de polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHAMCL) sob limitação múltipla de nutrientes. [tese (Doutorado em Biotecnologia) São Paulo: Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de São Paulo, 2008. 100 f.

Titirici MM, Antonietti M. Chemistry and materials options of sustainable carbon materials made by hydrothermal carbonization. *Chem. Soc. Rev.*, 2010;39:103-16.

Vermis K, Vandamme PAR, Nelis HJ. Burkholderia cepacia complex genomovars: utilization of carbon sources, susceptibility to antimicrobial agents and growth on selective media. *Journal of Applied Microbiology*, 2003;95:1191-9.

Verstraete W. Microbial ecology and environmental technology (*Commentary*). *The ISME Journal*, 2007;1:4-8.

Xie WP, Chen GQ. Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4ak4 harboring genes phaPCJ. *Biochemical Engineering Journal*, 2007;38:384-9.

Yabuuchi E, Kawamura Y, Ezaki T, Ikeda M, Dejsirilert S, Fujiwara N, Naka T, Kobayashi K. *Burkholderia ubonensis* sp. nov., L arabinose-assimilating but different from *Burkholderia thailandensis* and *Burkholderia vietnamiensis*. *Microbiology Immunology*, 2000;44:307-17.

Whittaker RH, Likens GE. The biosphere and man. In: Lieth H, Whittaker RH, editors. *Primary productivity of the biosphere*. Berlin; New York: Springer; Heidelberg, 1975. p 305-28.

Zakzeski J, Bruijnincx PCA, Jongerius AL, Weckhuysen BM. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chem. Rev.*, 2010;110:3552-99

Anexo A

Alinhamento do 16S rRNA(região 750-1.500) dos isolados SCU 031, 063, 066, 074 mais sequencia de consenso.

	751				800
SCU_31	ACTAGTTGAC	ATCGTTTAGG	GCGTGGACTA	CCAGGGTATC	TAATCCTGTT
SCU66	ACTAGTTGAC	ATCGTTTAGG	GCGTGGACTA	CCAGGGTATC	TAATCCTGTT
SCU63		TGCA	TCGACGGCAG	CACGGGTGCT	TGCACCTGGT
SCU74		GCAG	TCGACGGCAG	CACGGGTGCT	TGCACCTGGT
Consensus		tgcaG	tCGacGgCag	CacGGGTgct	TgcaCCTGgT
	801				850
SCU_31	TGCTCCCCAC	GCTTTCGTGC	ATGA.GCGTC	AGTATTGGCC	CAGGGG.CTG
SCU66	TGCTCCCCAC	GCTTTCGTGC	ATGA.KCGTC	AGTATTGGCC	CAGGGGGCTG
SCU63	GGCGAGTGGC	GAACGGGTGA	GTAATACATC	GGAACATGTC	CTGTAGTGGG
SCU74	GGCGAGTGGC	GAACGGGTGA	GTAATACATC	GGAACATGTC	CTGTAGTGGG
Consensus	gGCgagtggC	GaacggGTGa	gTaAtaCaTC	gGaAcatGtC	CtGtaGtggG
	851				900
SCU_31	CCTTCGCCAT	CGGTATTCCT	CCACATCTCT	ACG..CATT	CACTGCTACA
SCU66	CCTTCGCCAT	CGGTATTCCT	CCACATCTCT	ACG..CATT	CACTGCTACA
SCU63	GGATAGCCCCG	GCGAAAGCCG	GATTAATACC	GCATACGATC	TAYGGATGAA
SCU74	GGATAGCCCCG	GCGAAAGCCG	GATTAATACC	GCATACGATC	TACGGATGAA
Consensus	ggaTaGCCcg	gcGaAagCCg	gattAataCc	gCataCgaTc	tAcgGaTgaA
	901				950
SCU_31	CGTGGAA.TT	CTACCCCCCT	CTGCCATACT	CTAGCTTGCC	AGTCACCAAT
SCU66	CGTGGAA.TT	CTACCCCCCT	CTGCCATACT	CTAGCTTGCC	AGTCACCAAT
SCU63	AGCGGGGGAC	CTTCGGGCCT	C.GCGCTA.T	AGGGTTGGCC	GATGGCTGAT
SCU74	AGCGGGGGAC	CTTCGGGCCT	C.GCGCTA.T	AGGGTTGGCC	GATGGCTGAT
Consensus	aGcGggggac	CTtCgggCCT	C.GCgcTA.T	aggGtTgGCC	gaTggCtgAT
	951				1000
SCU_31	GCAGTTCCCA	GGTTGAGCCC	GGGGATTTC	CATCGGTCTT	A.ACAAACCG
SCU66	GCAGTTCCCA	GGTTGAGCCC	GGGGATTTC	CATCGGTCTT	ATACAAACCG
SCU63	.TAGCTAGTT	GGTGGGGTAA	AGGCCTACCA	AGGCGACGAT	CAGTAGCTGG
SCU74	.TAGCTAGTT	GGTGGGGTAA	AGGCCTACCA	AGGCGACGAT	CAGTAGCTGG
Consensus	.tAGcTagtt	GGTgGgGtaa	aGGccTacCA	aggCGacgaT	cagtAgctgG

	1001				1050
SCU_31	CCTGCGCACG	CTTTACGCC.	CAGTAATTCC	GATTAACG..	CTTGCAACCCT
SCU66	CCTGCGCACG	CTTTACGCC.	CAGTAATTCC	GATTAACG..	CTTGCAACCCT
SCU63	TCTGAGAGGA	CGACCAGCCA	CACTGGGACT	GAGACACGGC	CCAGACTCCT
SCU74	TCTGAGAGGA	CGACCAGCCA	CACTGGGACT	GAGACACGGC	CCAGACTCCT
Consensus	tCTGaGagga	CgaccaGCCa	CAcTgggaCt	GAgacACGgc	CcaGactCCT
	1051				1100
SCU_31	ACGTATTACC	GCGGCTGCTG	GCACGTAGTT	AGCCGGTGCT	TATTCTTCCG
SCU66	ACGTATTACC	GCGGCTGCTG	GCACGTAGTT	AGCCGGTGCT	TATTCTTCCG
SCU63	ACGGGAGGCA	GCAGTGG..G	GAATTTTGGA	CAATGG.GCG	AAAGC...CT
SCU74	ACGGGAGGCA	GCAGTGG..G	GAATTTTGGA	CAATGG.GCG	AAAGC...CT
Consensus	ACGggaggCa	GCaGtgG..G	GaAttTtGga	caatGG.GCg	aAagC...Ct
	1101				1150
SCU_31	GTACCGTCAT	CCCCTCAAGG	TATTAGCCCA	AAGGTTTTCT	TTCCGGACAA
SCU66	GTACCGTCAT	CCCCTCAAGG	TATTAGCCCA	AAGGTTTTCT	TTCCGGACAA
SCU63	GATCCAGCAA	TGCCGCGTGT	GTGAAG....	AAGGCCTTCG	GGTTGTAAAG
SCU74	GATCCAGCAA	TGCCGCGTGT	GTGAAG....	AAGGCCTTCG	GGTTGTAAAG
Consensus	GatCCagCAa	tgCCgCgtGt	gtgaAG....	AAGGccTTCg	ggttGtAaAg
	1151				1200
SCU_31	AAGTGCTTTA	CAACCCGAAG	GCCTT....C	TTCACACACG	CGGCATTGCT
SCU66	AAGTGCTTTA	CAACCCGAAG	GCCTT....C	TTCACACACG	CGGCATTGCT
SCU63	CACTTTTGTC	CGGAAAGAAA	ACCTTTGGGC	TAATACCTTG	AGGGGATGAC
SCU74	CACTTTTGTC	CGGAAAGAAA	TCCTTGTTTC	TAATATAGCC	GGGGGATGAC
Consensus	cAcTttTgTc	CggaaaGAAa	.CCTT.g..C	Taata.c.cg	.GGggaTGac
	1201				1250
SCU_31	GGATCAGGCT	TTCGCCCATT	GTCCAAAATT	CCCCACTGCT	GCCTCCCGTA
SCU66	GGATCAGGCT	TTCGCCCATT	GTCCAAAATT	CCCCACTGCT	GCCTCCCGTA
SCU63	GGTACCGGAA	GAATAAGCAC	CGGCTAACTA	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA
SCU74	GGTACCGGAA	GAATAAGCAC	CGGCTAACTA	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA
Consensus	GGtaCcGGaa	gaataagcac	cggCtAAcTa	CgtgcCaGCa	GCCgCggtaA

	1251				1300
SCU_31	GGAGTCTGGG	CCGTGTCTCA	GTCCCAGTGT	GGCTGGTCGT	CCTCTCAGAC
SCU66	GGAGTCTGGG	CCGTGTCTCA	GTCCCAGTGT	GGCTGGTCGT	CCTCTCAGAC
SCU63	TACGTAGGGT	GCAAGCGTTA	ATC..GGAAT	TACTGGGCGT	AAAGCGTGCG
SCU74	TACGTAGGGT	GCGAGCGTTA	ATC..GGAAT	TACTGGGCGT	AAAGCGTGCG
Consensus	tacGTagGGt	gCgaGcgTtA	aTC..gGaaT	taCTGGgCGT	aaagcgtGcg
	1301				1350
SCU_31	CAGCTACTGA	TCGTCGCCTT	GGTAGGCCTT	TACCCACCA	ACTAGCTAAT
SCU66	CAGCTACTGA	TCGTCGCCTT	GGTAGGCCTT	TACCCACCA	ACTAGCTAAT
SCU63	CAG..GCGGT	TTGTTA....	...AGACCGA	TGTGAAATCC	CCGGGCT...
SCU74	CAG..GCGGT	TTGCTA....	...AGACCGA	TGTGAAATCC	CCGGGCT...
Consensus	CAG..gCgGt	TtGtta....	...AGaCCga	TgtgaaAtCc	cCggGCT...
	1351				1400
SCU_31	CAGCCATCGG	CCAACCCTAT	AGCGCGAGGC	CCGAAGGTCC	CCCGCTTTCA
SCU66	CAGCCATCGG	CCAACCCTAT	AGCGCGAGGC	CCGAAGGTCC	CCCGCTTTCA
SCU63	CAACCTGGGA	ACTGCATT..	GGTGA	CTGG.....	CAAGCTAGAG
SCU74	CAACCTGGGA	ACTGCATT..	GGTGA	CTGG.....	CAGGCTAGAG
Consensus	CAaCctggGa	aCtgCatT..	GgtGa	CtGg.....	Ca.GCTagag
	1401				1450
SCU_31	TCCRTAGATC	GTATGCGGTA	TTAATCCGGC	TTTCGCCGGG	CTATCCCCCA
SCU66	TCCRTAGATC	GTATGCGGTA	TTAATCCGGC	TTTCGCCGGG	CTATCCCCCA
SCU63	TA...TGGCA	GAGGGGGGTA	GAATTCCACG	TGTAGCAGTG	AAATGCGTAG
SCU74	TA...TGGCA	GAGGGGGGTA	GAATTCCACG	TGTAGCAGTG	AAAKGCGTAG
Consensus	Ta...tGgca	GaggGgGGTA	gaAtTCCacg	TgTaGCaGtG	aaAtgCgtag
	1451				1500
SCU_31	CTACA.GGAC	ATGTTCCGAT	GTATTACTCA	.CCCGTTTCGC	CACTCGCCAC
SCU66	CTACA.GGAC	ATGTTCCGAT	GTATTACTCA	.CCCGTTTCGC	CACTCGCCAC
SCU63	AGATGTGGAG	GAATACCGAT	GGCGAAGGCA	GCCCCTGGGC	CAAACCTGACG
SCU74	AGATGTGGAG	GAATACCGAT	GGCGAAGGCA	GCCCCTGGCC	
Consensus	agAtgtGGAg	gaaTaCCGAT	GgcgaAggCA	gCCCcTgggC	ca..c.....
	1501			1534	
SCU_31	CAGGTGCAAG	CACC.CGTGC	TGCCGTCGAC	TGC.	
SCU66	CAGGTGCAAG	CACC.CGTGC	TGCCGTCGAC	TGCA	
SCU63	CTCATGCACG	AAGCGTGGGG	AGCAAMAGGA	TTA.	
SCU74					
Consensus	c...tgca.g	.a.c..g.g.	.gc....g..	t...	

Anexo B

Sequenciamento dos isolados SCU 031, 063, 066 e 074.

```

SCU31 -----CG CTCATGCACG AAAGCGTGGG -AGCAAACAG 50
SCU31 GATTAGATRC CTGGTAGTCC ACGCCCTAAA CGATGTCAAC TAGTTGTTGG 100
SCU31 GGATTCATTT CCTTAGTAAC GTAGCTAACG CGTGAAGTTG ACCGCCTGGG 150
SCU31 GAGTMCGGTM GCAAGATTTT GGTGTGTWAG AGAC-CCGGG AACGTATTCA 200
SCU31 C-CGCGGCAT GCTGATCCGC GATTACTAGC GATTC---CA GCTTCACGCA 250
SCU31 CTCGAGTTGC AGAGTGCGAT CCGGACTACG ATCGGTTTTT TGGGATTAGC 300
SCU31 TCCCCCTCGC GGGT----- TGGCGACCCT CTGTTCCGAC CATTGTATGA 350
SCU31 CGTGTGAAGC CCTACC-CAT AAGGGCCATG AGGACTTGAC GTCATCCCCA 400
SCU31 CCTTCCTCCG GTTTGTCACC GGCAGTCTCC TTAGAGTGCT CTTGCGTAGC 450
SCU31 AACTAAGGAC AAGGGTTGCG CTCGTTG-CG GGA CTTAACC CAACATCTCA 500
SCU31 CGACACGAGC TGACGACAGC CATGCAGCAC CTGTGCGCCG GTTCTCTTTC 550
SCU31 GAGCACTCCC ACCTCTCAGC GGGATTCCGA CCATGTCAAG GGTAGGTAAG 600
SCU31 GTT--TTTCG CGTTGCATCG AATTAATCCA CATCATCCAC CGCTTGTGCG 650
SCU31 GGTCCCCGTC AATTCCTTTG AGTTTTAATC TTGCGACCGT ACTCCCCAGG 700
SCU31 CGGTCAACTT CACGCGTTAG CTACGTTACT AAGGAAATGA ATCCCCAACA 750
SCU31 ACTAGTTGAC ATCGTTTAGG GCGTGGACTA CCAGGGTATC TAATCCTGTT 800
SCU31 TGCTCCCCAC GCTTTCGTGC ATGA-GCGTC AGTATTGGCC CAGGGG-CTG 850
SCU31 CCTTCGCCAT CGGTATTCCCT CCACATCTCT ACG--CATTT CACTGCTACA 900
SCU31 CGTGGA--TT CTACCCCCCT CTGCCATACT CTAGCTTGCC AGTCACCAAT 950
SCU31 GCAGTTCCCA GGTGAGCCC GGGGATTTCA CATCGGTCTT A-ACAAACCG 1000
SCU31 CCTGCGCACG CTTTACGCC- CAGTAATTCC GATTAACG-- CTTGCACCCT 1050
SCU31 ACGTATTACC GCGGCTGCTG GCACGTAGTT AGCCGGTGCT TATTCTTCCG 1100
SCU31 GTACCGTCAT CCCCTCAAGG TATTAGCCCA AAGGTTTTCT TTCCGGACAA 1150
SCU31 AAGTGCTTTA CAACCCGAAG GCCTT----C TTCACACACG CGGCATTGCT 1200
SCU31 GGATCAGGCT TTCGCCCATT GTCCAAAATT CCCCCTGCT GCCTCCCGTA 1250
SCU31 GGAGTCTGGG CCGTGTCTCA GTCCCAGTGT GGCTGGTCGT CCTCTCAGAC 1300
SCU31 CAGCTACTGA TCGTCGCCTT GGTAGGCCTT TACCCACCA ACTAGCTAAT 1350
SCU31 CAGCCATCGG CCAACCTAT AGCGCGAGGC CCGAAGGTCC CCCGCTTTCA 1400
SCU31 TCCRTAGATC GTATGCGGTA TTAATCCGGC TTTCGCCGGG CTATCCCCCA 1450
SCU31 CTACA-GGAC ATGTTCCGAT GTATTACTCA -CCCGTTCGC CACTCGCCAC 1500
SCU31 CAGGTGCAAG CACC-CGTGC TGCCGTCGAC TGC- 1534

```

SCU66 CCCCTGGGCC AATACTGACG CTCATGCACG AAAGCGTGGG GAGCAAACAG 50
 SCU66 GATTAGATAC CTGGTAGTCC ACGCCCTAAA CGATGTCAAC TAGTTGTTGG 100
 SCU66 GGATTCATTT CCTTAGTAAC GTAGCTAACG CGTGAAGTTG ACCGCCTGGG 150
 SCU66 GAGTACGGTC GCAAGATTAA AACTCAAAGG AATWRACGGG GACCCGCACA 200
 SCU66 AGCGGTGGAT GATGTGGATT AATTCGATGC AACGCGAAAA ACCTTACCTA 250
 SCU66 CCCTTGACAT GGTCGGAATC CCGCTGAGAG GTGGGAGTGC TCGAAAGAGA 300
 SCU66 ACCGGCGCAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT 350
 SCU66 TGGGTAAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCT TGTCCTTAGT TGCTACGCAA 400
 SCU66 GAGCACTCTA AGGAGACTGC CGGTGACAAA CCGGAGGAAG GTGGGGATGA 450
 SCU66 CGTCAAGTCC TCATG--GCC CTTATGGGTA GGGCTTCACA CGTCATACAA 500
 SCU66 TGGTCGGAAC AGAGGGTCGC CA-----AC CCGCGAGGGG GAGCTAATCC 550
 SCU66 CAGAAAACCG ATCGTAGTCC GGATCGCACT CTGCAACTCG AGTGCGTGAA 600
 SCU66 GCTGGAATCG CTAGTAATCG CG--GATCAG CAT--GCCGC GGTGAATACG 650
 SCU66 TTCCCGGGTC TGTWCCACAC CGA---AATC TTGCGACCGK ACTCCCCAGG 700
 SCU66 CGGTCAACTT CACGCGTTAG CTACGTTACT AAGGAAATGA ATCCCCAACA 750
 SCU66 ACTAGTTGAC ATCGTTTAGG GCGTGACTA CCAGGGTATC TAATCCTGTT 800
 SCU66 TGCTCCCCAC GCTTTCGTGC ATGA-KCGTC AGTATTGGCC CAGGGGGCTG 850
 SCU66 CCTTCGCCAT CGGTATTCCT CCACATCTCT ACG--CATTT CACTGCTACA 900
 SCU66 CGTGGA--TT CTACCCCCCT CTGCCATACT CTAGCTTGCC AGTCACCAAT 950
 SCU66 GCAGTTCCCA GGTGAGCCC GGGGATTTCA CATCGGTCTT ATACAAACCG 1000
 SCU66 CCTGCGCAG CTTTACGCC- CAGTAATTCC GATTAACG-- CTTGCACCCT 1050
 SCU66 ACGTATTACC GCGGCTGCTG GCACGTAGTT AGCCGGTGCT TATTCTTCCG 1100
 SCU66 GTACCGTCAT CCCCTCAAGG TATTAGCCCA AAGGTTTTCT TTCCGGACAA 1150
 SCU66 AAGTGCTTTA CAACCCGAAG GCCTT----C TTCACACACG CGGCATTGCT 1200
 SCU66 GGATCAGGCT TTCGCCATT GTCCAAAATT CCCCCTGCT GCCTCCCGTA 1250
 SCU66 GGAGTCTGGG CCGTGTCTCA GTCCCAGTGT GGCTGGTCGT CCTCTCAGAC 1300
 SCU66 CAGCTACTGA TCGTCGCCTT GGTAGGCCTT TACCCACCA ACTAGCTAAT 1350
 SCU66 CAGCCATCGG CCAACCCATAT AGCGCGAGGC CCGAAGGTCC CCCGCTTTCA 1400
 SCU66 TCCRTAGATC GTATGCGGTA TTAATCCGGC TTTCGCCGGG CTATCCCCCA 1450
 SCU66 CTACA-GGAC ATGTTCCGAT GTATTACTCA -CCCGTTCGC CACTCGCCAC 1500
 SCU66 CAGGTGCAAG CACC-CGTGC TGCCGTCGAC TGCA 1534

```

SCU63 ----- 50
SCU63 ----- 100
SCU63 ----- 150
SCU63 ----- 200
SCU63 ----- 250
SCU63 ----- 300
SCU63 ----- 350
SCU63 ----- 400
SCU63 ----- 450
SCU63 ----- 500
SCU63 ----- 550
SCU63 ----- 600
SCU63 ----- 650
SCU63 ----- 700
SCU63 ----- 750
SCU63 -----TGCAG TCGACGGCAG CACGGGTGCT TGCACCTGGT 800
SCU63 GGCGAGTGGC GAACGGGTGA GTAATACATC GGAACATGTC CTGTAGTGGG 850
SCU63 GGATAGCCCG GCGAAAGCCG GATTAATACC GCATACGATC TAYGGATGAA 900
SCU63 AGCGGGGGAC CTTCTGGGCCT C-GCGCTA-T AGGGTTGGCC GATGGCTGAT 950
SCU63 -TAGCTAGTT GGTGGGGTAA AGGCCTACCA AGGCGACGAT CAGTAGCTGG 1000
SCU63 TCTGAGAGGA CGACCAGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT 1050
SCU63 ACGGGAGGCA GCAGTGG--G GAATTTTGGGA CAATGG-GCG AAAGC---CT 1100
SCU63 GATCCAGCAA TGCCGCGTGT GTGAAG---- AAGGCCTTCG GGTGTGTAAG 1150
SCU63 CACTTTTGTC CGGAAAGAAA ACCTTTGGGC TAATACCTTG AGGGGATGAC 1200
SCU63 GGTACCGGAA GAATAAGCAC CGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA 1250
SCU63 TACGTAGGGT GCAAGCGTTA ATC--GGAAT TACTGGGCGT AAAGCGTGCG 1300
SCU63 CAG--GCGGT TTGTTA---- ---AGACCGA TGTGAAATCC CCGGGCT--- 1350
SCU63 CAACCTGGGA ACTGCATT-- -----GGTGA CTGG----- CAAGCTAGAG 1400
SCU63 TA---TGGCA GAGGGGGGTA GAATTCCACG TGTAGCAGTG AAATGCGTAG 1450
SCU63 AGATGTGGAG GAATACCGAT GGCGAAGGCA GCCCCTGGGC CAAACTGACG 1500
SCU63 CTCATGCACG AAGCGTGGGG AGCAAMAGGA TTA- 1534

```



```

SCU74 ----- 50
SCU74 ----- 100
SCU74 ----- 150
SCU74 ----- 200
SCU74 ----- 250
SCU74 ----- 300
SCU74 ----- 350
SCU74 ----- 400
SCU74 ----- 450
SCU74 ----- 500
SCU74 ----- 550
SCU74 ----- 600
SCU74 ----- 650
SCU74 ----- 700
SCU74 ----- 750
SCU74 -----GCAG TCGACGGCAG CACGGGTGCT TGCACCTGGT 800
SCU74 GGCGAGTGGC GAACGGGTGA GTAATACATC GGAACATGTC CTGTAGTGGG 850
SCU74 GGATAGCCCG GCGAAAGCCG GATTAATACC GCATACGATC TACGGATGAA 900
SCU74 AGCGGGGGAC CTTCTGGGCCT C-GCGCTA-T AGGGTTGGCC GATGGCTGAT 950
SCU74 -TAGCTAGTT GGTGGGGTAA AGGCCTACCA AGGCGACGAT CAGTAGCTGG 1000
SCU74 TCTGAGAGGA CGACCAGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT 1050
SCU74 ACGGGAGGCA GCAGTGG--G GAATTTTGGG CAATGG-GCG AAAGC---CT 1100
SCU74 GATCCAGCAA TGCCGCGTGT GTGAAG---- AAGGCCTTCG GGTGTGTAAG 1150
SCU74 CACTTTTGTC CGGAAAGAAA TCCTTGTTTC TAATATAGCC GGGGGATGAC 1200
SCU74 GGTACCGGAA GAATAAGCAC CGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA 1250
SCU74 TACGTAGGGT GCGAGCGTTA ATC--GGAAT TACTGGGCGT AAAGCGTGCG 1300
SCU74 CAG--GCGGT TTGCTA---- ---AGACCGA TGTGAAATCC CCGGGCT--- 1350
SCU74 CAACCTGGGA ACTGCATT-- -----GGTGA CTGG----- CAGGCTAGAG 1400
SCU74 TA---TGGCA GAGGGGGGTA GAATTCCACG TGTAGCAGTG AAKGCGTAG 1450
SCU74 AGATGTGGAG GAATACCGAT GGCGAAGGCA GCCCCTGGCC ----- 1500
SCU74 ----- 1534

```